

**Charakterisierung potentiell positiver Regulatoren der  
Phagozytose in *Dictyostelium discoideum* und deren  
Funktion in einem Signalweg zwischen endosomaler Ver-  
dauung und Partikelaufnahme**

---

Inaugural-Dissertation

Zur Erlangung des akademischen Grades  
eines

Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

im Fachbereich Mathematik und Naturwissenschaften  
der Universität Kassel

vorgelegt von:

**Frauke Hänel**

Kassel im Juni 2011  
Datum der Disputation: 05.09.2011

## **1 Erklärung**

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und andere als die in der Dissertation angegebenen Hilfsmittel nicht benutzt habe. Alle Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder unveröffentlichten Schriften entnommen sind, habe ich als solche kenntlich gemacht. Kein Teil dieser Arbeit ist in einem anderen Promotions- oder Habilitationsverfahren verwendet worden.

Hamburg, den

Frauke Hänel

## 2 Danksagung

Hiermit danke ich an erster Stelle Prof. Dr. Markus Maniak für die Möglichkeit, meine Doktorarbeit in der Abteilung Zellbiologie anfertigen zu können. Ich danke ihm für seine Betreuung und Hilfestellungen während dieser Jahre und dafür, dass er immer schnell und zuverlässig Texte oder Präsentationen korrigiert und konstruktiv kritisiert hat. Ich danke Prof. Dr. Wolfgang Nellen, dass er sich als Zweitgutachter dieser Dissertation zur Verfügung gestellt hat.

Ich bedanke mich bei meinen Kollegen der Abteilung Zellbiologie für die vielen hilfreichen Tipps, Kritiken, das rege Austauschen von Erfahrungen und die gute Zusammenarbeit. Ich danke Harald Rühling, der immer dafür gesorgt hat, dass die Technik im Labor einwandfrei funktioniert und genügend Verbrauchsmaterialien auf Lager sind. Ich danke vor allem Susan Claußner für die schöne gemeinsame Zeit im Studium und in der Wissenschaft und dass ich mit ihr im Labor „groß“ werden durfte. Ich danke Heike Otto für die Unterstützung, wenn die Zeit mal knapp wurde und für ihr offenes Ohr, nicht nur beim Thema „fachgerechte Entsorgung“. Ich danke Peggy Paschke, die fleißig und hilfsbereit auch am Wochenende oft kleine Tätigkeiten für mich mit übernommen hat. Ich danke Xiaoli Du für die gute Kooperation an Laborgeräten und ihr Verständnis für den straffen Zeitplan bei der Durchführung von Phagozytoseexperimenten. Desweiteren möchte ich den Ehemaligen Caroline Barisch, Gleb Konotop und Ralf Rethmeier ebenfalls für ihre Unterstützung, Kritik und den Erfahrungsaustausch danken.

Der Abteilung Genetik und Biochemie möchte ich danken, da ohne ihre Leihgaben und die „Tauschgeschäfte“ mit Chemikalien und Verbrauchsmaterialien so manches Experiment nie oder erst Wochen später hätte durchgeführt werden können. Dabei danke ich der Abteilung Genetik vor allem für den *E. coli*-Stamm BL21. Der Abteilung Biochemie danke ich für den GST-Expressionsvektor pGEX-4T-3.

Ich danke Balint Földesi für seine fachliche und seelische Unterstützung während dieser langen, manchmal auch frustrierenden Zeit und sein Verständnis für meine schlecht eingeteilten Zeitpläne. Mein besonderer Dank geht an meine Eltern, die durch ihre finanzielle Unterstützung mein Studium und damit die Promotion ermöglicht haben.

Ich danke auch der Deutschen Forschungsgemeinschaft, dass sie dieses Forschungsprojekt finanziell unterstützt haben.

### 3 Zusammenfassung

*Dictyostelium discoideum* ernährt sich in seinem natürlichen Habitat, dem Waldboden, vorwiegend von Bakterien. Diese werden aus der Umgebung über Phagozytose aufgenommen und unter anderem mit Hilfe von Lysozymen verdaut. Eines dieser Lysozyme, AlyA, wurde bereits in vorhergehenden Arbeiten detailliert untersucht. Sein Fehlen resultierte in einer zeitabhängigen Vergrößerung der Fresshöfe in Bakterienrasen. Zusätzlich waren in diesen *Knockout*-Mutanten auch die Phagozytoserate und die Expression eines zweiten lysosomalen Enzyms (Gp70) erhöht. Die Überexpression dieser Esterase in wildtypischen Zellen bewirkte ebenfalls, dass Partikel aus der Umgebung effektiver aufgenommen werden konnten. Da die AlyA-Mutanten und die Gp70-Überexprimierer ähnliche Phänotypen zeigten, die Proteine aber in unterschiedlichen lysosomalen Vesikeln lokalisieren, müssen weitere Proteine an der Ausbildung der Phänotypen beteiligt sein. Aus diesem Grund wurden die Genexpressionen beider Mutanten verglichen. Über *Microarray*-Analysen sollten auf diese Weise weitere Proteine identifiziert werden, die eine Weiterleitung des Signals von AlyA über Gp70 bis hin zur Plasmamembran vermitteln. Einigen der potentiellen Kandidaten konnte anhand der Untersuchung von Mutanten bereits eine Weiterleitung des Signals zwischen Gp70 und der erhöhten Phagozytose an der Plasmamembran zugeordnet werden.

Um jedoch mehr über die Signalkette oberhalb von Gp70 zu erfahren, wurden im Rahmen dieser Arbeit drei Proteine untersucht. Die Expression von DD3-3, SSD673 und SSD485 war in den AlyA-Mutanten erhöht, in den Gp70-Überexprimierern jedoch unverändert. Durch Herstellung und Untersuchung von überexprimierenden Mutanten wurde die Wirkung jedes Proteins auf die Gp70-Expression, das Phagozytoseverhalten und den Durchmesser der Fresshöfe analysiert. Die Markierung der Kandidaten mit dem Myc-Epitop sollte deren subzelluläre Lokalisation klären. Für DD3-3-überexprimierende Klone konnte in dieser Arbeit allerdings keine Veränderung gegenüber wildtypischen Zellen festgestellt werden. Sie zeigt allerdings, dass Medium von SSD673-überexprimierenden Zellen die Phagozytoserate wildtypischer Zellen leicht erhöht. Eine starke SSD673myc-Expression führte auch zu einer verstärkten Aufnahme von Hefezellen. Die Gp70-Expression in Gesamtzelllysaten der SSD673-Mutanten blieb jedoch unverändert. Wurde in Wildtypzellen hingegen SSD485 im Übermaß exprimiert, so führte dies zu einer verstärkten Partikelaufnahme. Diese entwickelte sich ähnlich den AlyA-*Knockout*-Mutanten in Abhängigkeit der Zeit und ging mit einer erhöhten Gp70-Expression einher. In dieser Arbeit konnte folglich zwei von drei Proteinen eine positive Wirkung auf die Phagozytose nachgewiesen werden. SSD485-Mutanten erfüllten darüber hinaus die Bedingungen für eine Weiterleitung des AlyA-Signals von SSD485 auf Gp70 bis hin zu einer erhöhten Phagozytose.

## 4 Inhaltsverzeichnis

1	Erklärung.....	2
2	Danksagung.....	3
3	Zusammenfassung .....	4
4	Inhaltsverzeichnis.....	5
5	Abkürzungsverzeichnis.....	10
6	Einleitung.....	13
6.1	<i>Dictyostelium discoideum</i> als Modell.....	13
6.2	Der Weg eines Endosoms in <i>Dictyostelium discoideum</i> .....	15
6.2.1	Die Internalisierung von Partikeln und Flüssigkeiten.....	15
6.2.2	Die Ansäuerung des Endosomenlumens.....	19
6.2.3	Die Neutralisierung des Endosoms und Exozytose von unverdaulichem Material.....	20
6.3	Der Transport lysosomaler und sekretorischer Proteine.....	22
6.4	Zwei lysosomale Enzyme beeinflussen in <i>D. discoideum</i> die Phagozytose.....	23
6.4.1	Das Lysozym AlyA.....	23
6.4.2	Die Esterase Gp70.....	24
6.5	<i>Microarray</i> -Analysen bilden die Grundlage für die Entschlüsselung eines Signalweges und die Identifizierung von Regulatoren der Phagozytose .....	24
6.6	Zielsetzung dieser Arbeit.....	27
7	Materialien.....	29
7.1	Geräte.....	29
7.2	Verbrauchsmaterialien .....	31
7.3	Kits.....	31
7.4	Chemikalien.....	32
7.5	Puffer und Lösungen .....	34
7.6	Antibiotika .....	38
7.7	Nährmedien.....	38
7.7.1	Nährmedien für <i>E. coli</i> .....	38
7.7.2	Nährmedien für <i>D. discoideum</i> .....	39
7.8	Enzyme .....	39
7.9	Enzympuffer .....	40
7.10	Antikörper.....	40
7.10.1	Monoklonale Primärantikörper (aus der Maus).....	40

7.10.2	Polyklonale Primärantikörper (aus dem Kaninchen) .....	41
7.10.3	Sekundärantikörper .....	41
7.11	Fluoreszenzfarbstoffe .....	41
7.12	Größenstandards .....	41
7.13	Bakterienstämme.....	41
7.14	Hefestämme.....	42
7.15	<i>Dictyostelium</i> -Stämme.....	42
7.16	Oligonukleotide.....	42
7.17	Plasmide .....	43
7.17.1	Plasmide anderer Arbeiten .....	43
7.17.2	Plasmide dieser Arbeit .....	43
7.17.3	Plasmidkarten.....	46
7.18	Datenbanken und Programme.....	47
8	Methoden .....	48
8.1	Zellbiologische Methoden.....	48
8.1.1	Kultivierung von <i>Escherichia coli</i> .....	48
8.1.2	Kultivierung von <i>Dictyostelium discoideum</i> .....	49
8.2	Proteinbiochemie.....	56
8.2.1	Isolation von Proteinen .....	56
8.2.2	Bestimmung von Proteinmengen .....	58
8.2.3	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	58
8.2.4	Coomassiefärbung.....	60
8.2.5	Westernblot .....	60
8.2.6	Immundetektion .....	60
8.3	Molekularbiologische Methoden .....	61
8.3.1	Polymerasekettenreaktion (PCR) .....	61
8.3.2	Agarosegelelektrophorese .....	63
8.3.3	Aufreinigung von DNA-Fragmenten.....	64
8.3.4	Phosphorylierung von PCR-Produkten .....	64
8.3.5	Ligation von DNA-Fragmenten .....	64
8.3.6	Plasmidpräparationen .....	64
8.3.7	Spaltung von DNA mittels Restriktionsendonukleasen .....	66
8.3.8	Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten .....	66

8.3.9	Isolation von genomischer DNA aus <i>Dictyostelium discoideum</i> .....	67
8.3.10	RNA-Isolation aus <i>Dictyostelium discoideum</i> .....	68
8.3.11	Herstellung DNA-freier RNA.....	69
8.3.12	cDNA-Synthese.....	69
8.4	Mikroskopische Methoden.....	70
8.4.1	Fluoreszenzmikroskopie lebender Zellen.....	70
8.4.2	Fixierung von Zellen mittels Paraformaldehyd.....	70
8.4.3	Fixierung von Zellen mittels Methanol.....	71
8.4.4	Indirekte Immunfluoreszenz.....	71
8.4.5	Herstellung von Einbettmedium.....	72
8.4.6	Untersuchung und Dokumentation von fluoreszenzmarkierten Zellen.....	72
9	Ergebnisse.....	74
9.1	DD3-3 (DDB0231683, EST: VSI664).....	74
9.1.1	DD3myc3 kolokalisiert mit der Proteindisulfidomerase im Endoplasmatischen Retikulum.....	75
9.1.2	Überexpression von unmarkiertem DD3-3.....	78
9.1.3	Eine Rückkopplung von überexprimiertem DD3-3 auf die Lysozymaktivität erfolgt nicht.....	80
9.1.4	Durch eine Überexpression von DD3-3 und DD3myc3 kann die Expression der Esterase Gp70 nicht erhöht werden.....	81
9.1.5	Die Überexpression von DD3myc3 und DD3-3 führt nicht zu einer Erhöhung der Phagozytose.....	82
9.1.6	Die Ausbildung der Fresshöfe von DD3-3- und DD3myc3-Exprimierern ist überwiegend wildtypähnlich.....	85
9.2	DDB0237660 (EST: SSD673).....	88
9.2.1	SSD673myc lokalisiert im Endoplasmatischen Retikulum und in dem Golgi-Apparat ähnlichen Strukturen.....	89
9.2.2	Überexpression von nichtmarkiertem SSD673.....	90
9.2.3	Die Überexpression von SSD673, bzw. SSD673myc hat keine Auswirkungen auf die Lysozymaktivität.....	92
9.2.4	Eine erhöhte Gp70-Expression ist in Gesamtzelllysaten von SSD673-überexprimierenden Zellen nicht nachweisbar.....	93
9.2.5	Stark SSD673myc überexprimierende Zellen internalisieren mehr Hefezellen als wildtypische <i>Dictyostelium</i> -Zellen.....	93
9.2.6	Konditioniertes Medium ermöglicht wildtypischen Zellen eine leicht effizientere Partikelaufnahme.....	95

9.2.7	Bakterielle Überexpression von GST-SSD673 (oL).....	97
9.2.8	Bakteriell synthetisiertes GST-SSD673 (oL) verringert konzentrationsabhängig die Phagozytose von AX2-Zellen .....	99
9.2.9	Die Größe und Morphologie der Fresshöfe von SSD673-überexprimierenden und SSD673myc-exprimierenden Zellen bleibt unverändert .....	101
9.3	DDB0218583 (EST: SSD485) .....	104
9.3.1	Die Lokalisation von SSDmyc485 verteilt sich auf das Endoplasmatische Retikulum, die Plasmamembran und vesikelähnliche Strukturen in der Zellperipherie.....	105
9.3.2	Isolation von drei unabhängigen SSD485-überexprimierenden Klonen.....	110
9.3.3	Die Lysozymaktivität bleibt von der SSD(myc)485-Überexpression unbeeinflusst .....	112
9.3.4	Überexprimiertes SSD485 führt zu einem Anstieg in der Gp70-Expression .....	113
9.3.5	Die Überexpression von SSD485- oder SSDmyc485 führt zu einem Anstieg in der Phagozytose, der jedoch abhängig von der Kultivierungszeit ist .....	114
9.3.6	Die erhöhte Expression von SSD485 hat keine Auswirkungen auf die <i>Plaque</i> -Durchmesser .....	119
10	Diskussion .....	122
10.1	Die Überexpression von DD3-3 .....	122
10.1.1	Eine Lokalisation von DD3myc3 im ER ist wahrscheinlich .....	122
10.1.2	Eine Beteiligung von DD3-3 an der Signalkaskade AlyA – Gp70 – Partikelaufnahme kann ausgeschlossen werden.....	124
10.1.3	Die Expression von DD3-3 ist in Mutanten mit Entwicklungsdefekten, aber auch in <i>E. coli</i> -stimulierten Wildtypzellen verändert .....	124
10.2	SSD673 – ein sekretorisches Protein? .....	127
10.2.1	Die Sekretion von SSD673 erfolgt über den Standardweg.....	127
10.2.2	Wird SSD673 sekretiert, so wirkt es autokrin auf die Phagozytose der sezernierenden Zelle .....	128
10.2.3	Die Blockade eines Rezeptors könnte die reduzierte Phagozytose durch GST-SSD673 (oL) erklären .....	130
10.2.4	SSD673 ist ein positiver Regulator der Phagozytose .....	130
10.3	SSD485 als positiver Regulator der Phagozytose .....	132
10.3.1	SSD485 wird in das ER translatiert und über den Golgi-Apparat an die Plasmamembran transportiert .....	132
10.3.2	Die Aufnahme von Partikeln wird positiv von SSD485 beeinflusst, welches unterhalb von AlyA und oberhalb von Gp70 wirkt.....	134
10.3.3	Ein Vergleich zwischen der Kompensation von AlyA- und SSD485-Mutanten...	136

10.4	Der AlyA-Gp70-Signalweg.....	137
11	Referenzen.....	139

## 5 Abkürzungsverzeichnis

$\alpha$ -	Anti-
ADP	Adenosindiphosphat
AlyA	<i>Amoeba Lysozyme A</i>
AMP	Adenosinmonophosphat
amp	Ampicillin
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammonuimpersulfat
Asn	Asparagin
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	Bicinchoninsäure
BCIP	5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat
bp	Basenpaare
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
ca.	circa
CF	<i>counting factor</i>
CIP	<i>Calf Intestine Phosphatase</i>
CLSM	<i>Confocal Laser Scanning Microscope</i>
CMF	<i>Conditioned Medium Factor</i>
COPI	<i>coat protein complex I</i>
CP	<i>capping protein</i>
CV	<i>contractile vacuole</i>
<i>D. discoideum</i>	<i>Dictyostelium discoideum</i>
DABCO	1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octan
ddH <sub>2</sub> O	zweifach destilliertes Wasser
DEPC	Diethylpyrocarbonate
DL	Durchlicht
DMF	N,N-Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA (c-, g-)	<i>Desoxyribonucleic Acid (complementary, genomische)</i>
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure

EP	Elektroporation
ER	Endoplasmatisches Retikulum
EST	<i>Expressed Sequence Tag</i>
EtOH	Ethanol
EZ	extrazellulär
<i>g</i>	Erdschwerebeschleunigung
g	Gramm
G418	Geneticin
GFP	Grün Fluoreszierendes Protein
GPI	Glykosylphosphatidylinositol
GST	Glutathion-S-Transferase
GTC	Guanidiniumthiocyanat
h	Stunden
HA	Hemagglutinin
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinyl)-Ethansulfonsäure
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-Thiogalaktopyranosid
IR	Infrarot
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
KDEL	Lysin-Asparaginsäure-Glutaminsäure-Leucin
KKXX	Lysin-Lysin-XX
l	Liter
LB	<i>Lysogeny Broth</i>
LKRL	Leucin-Lysin-Arginin-Leucin
M	Molar
mA	Milliampere
MCS	<i>Multiple Cloning Site</i>
MHCK A	<i>Myosin Heavy Chain-Kinase A</i>
min	Minute
mRNA	<i>messenger RNA</i>
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
OD	Optische Dichte
OL	<i>overlay</i>
PAA	Polyacrylamid

PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAK	p21 <i>activated kinase</i>
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDI	Proteindisulfidisomerase
PEG	Polyethylenglykol
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinasen
PIP <sub>2</sub>	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate
PIP <sub>3</sub>	Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat
PIPES	1,4-Piperazindiethansulfonsäure
PKA	Proteinkinase A
PLC	Phospholipase C
PM	Plasmamembran
PNK	Polynukleotidkinase
PP	Protonenpumpe
P-Puffer	Soerensen-Phosphat-Puffer
PTK	Proteintyrosinkinase
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i>
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur (22 °C)
RT-PCR	Reverse Transkriptase-PCR
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde
SRP	<i>Signal Recognition Particle</i>
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA
TE	Tris-EDTA
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TGN	<i>trans</i> -Golgi-Netzwerk
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TRITC	Tetramethylrhodaminisothiocyanat
u	<i>Unit</i>
UV	Ultraviolett
V	Volt
YFP	<i>Yellow Fluorescent Protein</i>

## 6 Einleitung

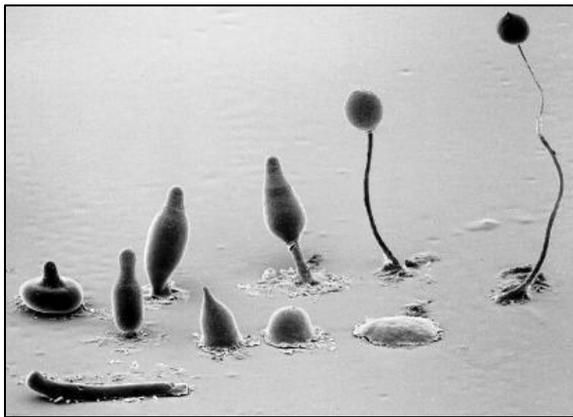
### 6.1 *Dictyostelium discoideum* als Modell

Die phylogenetische Einordnung von Organismen kann aufgrund von unterschiedlichen Merkmalen erfolgen. Es können morphologische, die Individualentwicklung betreffende oder molekulare Vergleiche zwischen den Arten gezogen werden. Die Abstammung von *Dictyostelium discoideum* wurde zuletzt mit der vollständigen Sequenzierung seiner sechs Chromosomen verifiziert. Eichinger *et al.* [33] konnten 2005 anhand von Genomanalysen bestätigen, dass sich *D. discoideum* stammesgeschichtlich nach der Aufspaltung von Pflanzen und anderen Eukaryoten, aber noch vor Trennung der Pilze und Metazoen entwickelt hat [7]. *Dictyostelium discoideum* gehört damit zu den Amoebozoen und wird der Untergruppe der Myzetozoen zugeordnet.

Die einzelligen Amöben bevorzugen den Waldboden als ihr natürliches Habitat. Dort teilen sie sich mitotisch und können sich von verschiedenen Bakterien [90] aus ihrer Umgebung ernähren. Diese können sie über Phagozytose aufnehmen [71], über spezialisierte Enzyme verdauen [77] und anschließend das unverdauliche Material wieder nach außen abgeben [85]. Für eine Reihe von humanen Krankheitserregern wie *Legionella pneumophila* oder *Mycobacterium marinum* ist allerdings bekannt, dass sie sich in *D. discoideum* vermehren können und der Verdauung in den Amöben entgehen (zusammengefasst in [108]). Dies macht *Dictyostelium* zu einem Modell für Untersuchungen der Wirkmechanismen pathogener Bakterien.

Eine Besonderheit dieses Organismus ist sein Entwicklungszyklus (Abbildung 1). Neben einer Existenz als einzelne Zelle (vegetatives Stadium) kann *D. discoideum* auch vielzellige Strukturen bilden. Sobald die Nahrungsquelle erschöpft ist, signalisieren hunderttausende Zellen über die pulsierende Abgabe des Signalmoleküls cAMP den Hungerzustand [40]. Dies bewirkt, dass die einzelnen Amöben sich zu einem Aggregat zusammenfinden. Diese multizelluläre Struktur wächst zu einem Pseudoplasmodium (*Slug*) heran, welches die Möglichkeit besitzt, sich photo- und thermotaktisch fortzubewegen [13]. Auf diese Weise findet er die Oberfläche des Waldbodens, wo sich die Zellen des Aggregats weiter zu einem Fruchtkörper differenzieren. Sie bilden dabei zwei Zelltypen: die Sporenzellen und die Stielzellen. Beide sind bereits im *Slug* determiniert [112]. Der posteriore Bereich des *Slugs* besteht aus Vorläufern der Sporenzellen (*prespore region*), während sich anteriore Zellen in einem deutlich kleineren Bereich später zu Stielzellen entwickeln (*prestalk cells*). Die Vorläuferstielzellen konnten anhand von Genexpressionsmustern [66] in weitere Bereiche unterteilt werden (*pstA*, *pstB*, *pstO*). Einen bis dahin unbekanntem Zelltyp (*S cells*) konnten 2007 Chen *et al.* [22] beschreiben. Dabei handelt es sich um Helferzellen, die im *Slug* Bakterien und Toxine aufnehmen, um eine Art Immunabwehr zu bilden.

Die unterschiedlichen Zellschicksale resultieren schließlich in einem Fruchtkörper. Er setzt sich aus einer Basalplatte, einem Stiel und der die Sporen enthaltenden Sporenkapsel zusammen (Abbildung 1). Nach Verbreitung durch den Wind und bei gutem Nahrungsangebot können nur die Sporen erneut auskeimen. Alle anderen Zellen erleiden eine Form des programmierten Zelltods (Apoptose) [56]. Seit Januar 2011 ist bekannt, dass *Dictyostelium* in seinem Fruchtkörper Bakterien einschließen kann. Diese werden dann mit den Sporen verbreitet und in nahrungsarmen Regionen als Nahrungsquelle „ausgesät“ [15].



**Abbildung 1: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der zeitlich nacheinander entstehenden Entwicklungsstadien von *Dictyostelium discoideum*.** Innerhalb von 24 h differenzieren sich einzellige Amöben zu unterschiedlichen Zelltypen, um einen mehrzelligen Fruchtkörper auszubilden. © Mark Grimson und Larry Blanton, Electron Microscopy Laboratory, Department of Biological Sciences, Texas Tech University

*D. discoideum* mit seinem Entwicklungszyklus ermöglicht es, viele grundlegende Prozesse wie die Phagozytose, Chemotaxis, Zell-Zell-Kommunikation, Zelldifferenzierung oder Signaltransduktionen zu erforschen. Sein 34 Mb großes und haploides Genom lässt sich mit etablierten molekulargenetischen Methoden leicht manipulieren und die Auswirkungen unter anderem direkt am Entwicklungszyklus ablesen. Die Haltung von *D. discoideum* wurde mit der Isolation des Laborstammes AX2 [120] noch unkomplizierter. Dieser konnte, wie auch die Laborstämme AX3 und AX4, vom freilebenden Stamm NC-4 [89] durch Mutagenese abgeleitet werden und ist befähigt, auch in axenischem, d.h. bakterienfreiem Medium zu wachsen [111, 120]. Dort nimmt er das standardisierte Flüssigmedium 60-mal effektiver auf als NC-4 [1], wobei die Fähigkeit zur Phagozytose von Bakterien unverändert bleibt. Obwohl es sich bei AX2 nicht um das Freilandisolat handelt, wird er im Folgenden stets als Wildtyp bezeichnet.

Eine Besonderheit in der Verdauung von *Dictyostelium* macht ihn für die Erforschung lysosomaler Krankheiten attraktiv. Die Lysosomen der meisten Säugerzellen sind Sackgassen. Das bedeutet, sie nehmen Material auf, zersetzen es und speichern Unverdauliches teilweise bis zum Lebensende der Zelle oder des Organismus. Die Folge einer Fehlfunktion sind daher häufig vergrößerte Lysosomen oder Anhäufungen von toxischen Substanzen. Dies führt je nach Zelltyp letztlich zu Störungen im Nerven- oder Organsystem [72]. *Dictyostelium* scheidet unverdautes Material hinge-

gen wieder aus [71]. Dadurch fallen Phänotypen in den Amöben wesentlich milder aus. Lethale Mutationen im Säuger können so alternativ in *D. discoideum* untersucht werden.

## 6.2 Der Weg eines Endosoms in *Dictyostelium discoideum*

Eukaryotische Zellen besitzen die Fähigkeit, durch die Bildung von Vesikeln Partikel oder Flüssigkeiten aus der Umgebung aufzunehmen. Dieser Vorgang wurde erstmals von De Duve 1963 [29] als Endozytose bezeichnet. Häufig dient die Endozytose der Nahrungsaufnahme. Die Entsorgung von abgestorbenen oder kranken Zellen sowie die Verteidigung gegenüber Mikroorganismen kann ebenfalls über diesen Vorgang gewährleistet sein. Grundsätzlich lassen sich zwei Formen der Endozytose unterscheiden: die Phagozytose und die Pinozytose. Erstere beschreibt die Aufnahme von Partikeln aus der Umgebung. Sie wird vor allem von Neutrophilen und Makrophagen, aber auch von *Dictyostelium discoideum* professionell betrieben. Als Pinozytose wird hingegen die Aufnahme von Flüssigkeit und darin gelösten Makromolekülen bezeichnet. Sie wird von fast allen Zelltypen durchgeführt. In Abhängigkeit der Größe der entstehenden Vesikel kann die Flüssigkeitsaufnahme zusätzlich in Makropinozytose und (Mikro-)Pinozytose unterteilt werden. Die molekularen Prozesse der Phago- und Makropinozytose sind sehr ähnlich. Beide Prozesse sind abhängig vom Aktinzytoskelett. Die Mikropinozytose hingegen findet in Abhängigkeit des Proteins Clathrin statt und unterscheidet sich stark von den erst genannten Prozessen.

Der Weg eines Nahrungsvesikels in *Dictyostelium discoideum* kann in vier Stationen unterteilt werden. Das Vesikel, auch Endosom genannt, wird zuerst durch die Internalisierung von Partikeln oder Flüssigkeiten an der Plasmamembran gebildet. Durch Fusion mit kleineren Vesikeln wird das Endosom im Anschluss angesäuert, um die Aktivität lysosomaler Enzyme zu gewährleisten (Endolysosom). In einem dritten Schritt erfährt das Endosom durch Abschnürung kleiner Vesikel eine Neutralisierung (Postlysosom), bevor es schließlich erneut mit der Plasmamembran verschmilzt und seinen Inhalt in den extrazellulären Raum entlässt (Exozytose). Dieser endozytotische Transit ist auf molekularer Ebene teilweise sehr gut untersucht und wird im Folgenden detaillierter dargestellt.

### 6.2.1 Die Internalisierung von Partikeln und Flüssigkeiten

Bevor ein Partikel in eine Zelle aufgenommen werden kann, muss dieses an der Plasmamembran vorerst über einen Rezeptor erkannt werden. Für *Dictyostelium* werden mindestens zwei Rezeptorsysteme vermutet. Während eines bevorzugt hydrophobe Oberflächen von Latexkügelchen erkennt, bindet ein weiteres System Glukosereste auf der Außenseite von *E.coli*-Zellen. Anhand von Mutanten mit gestörtem Phagozytoseverhalten konnten Vogel *et al.* dies bereits 1980

belegen [118]. Im Jahre 2000 identifizierten Cornillon *et al.* in *Dictyostelium* einen Rezeptor mit neun Transmembrandomänen (Phg1p). Dessen *Knockout*-Mutante wies ebenfalls Defekte in der Phagozytose unterschiedlicher Partikel auf. Während Latexkügelchen und *E. coli*-Zellen von den Mutanten phagozytiert wurden, konnten *Klebsiella aerogenes*-Bakterien nicht aufgenommen werden [27]. Mit SibA, einem Transmembranprotein des Typs I, wurde ein Adhäsionsmolekül identifiziert, dessen Inaktivierung in einer reduzierten Adhäsion an Partikel resultierte [26] und ebenfalls als Phagozytoserezeptor fungieren könnte. Weitere Rezeptoren konnten bislang nicht identifiziert werden. Diese Beispiele machen deutlich, dass die Erkennung des Partikels durch Rezeptoren in *Dictyostelium* noch nicht vollständig verstanden ist.

Eine Interaktion zwischen dem potentiellen Rezeptor SibA und einem Effektor unterhalb der Plasmamembran konnte jedoch nachgewiesen werden, denn die zytosolische Domäne von SibA bindet an TalinA (TalA) [26]. Bei TalA handelt es sich um ein Protein, welches in Metazoen bei der Adhäsion an die extrazelluläre Matrix (*Focal Adhesions*) den Kontakt zum Aktinzytoskelett herstellt [28]. In *Dictyostelium* häuft es sich neben anderen mit Aktin interagierenden Proteinen (VASP, Formin) in den Filopodien an [58]. Die Partikelbindung findet also bevorzugt an den Spitzen von Filopodien statt. TalA-Nullmutanten zeigen darüber hinaus einen deutlichen Defekt bei der Substratadhäsion, Zell-Zell-Adhäsion und der Phagozytose. Die adhäsionsunabhängige und ohne Stimulus ausgelöste Makropinozytose bleibt hingegen unverändert [81].

Ein Signal, dass das Partikel an den Rezeptor gebunden hat, wird also über membranassoziierte Proteine wie Talin in das Zellinnere weitergeleitet. Es ist bisher jedoch unklar, wie dies im Detail in *Dictyostelium* zur Bildung eines Endosoms durch die Polymerisation von Aktinfilamenten führt. Da die Signalwege sehr umfangreich und für *Dictyostelium* noch längst nicht vollständig entschlüsselt sind, werden hier nur Eckpunkte der Signalkette beschrieben.

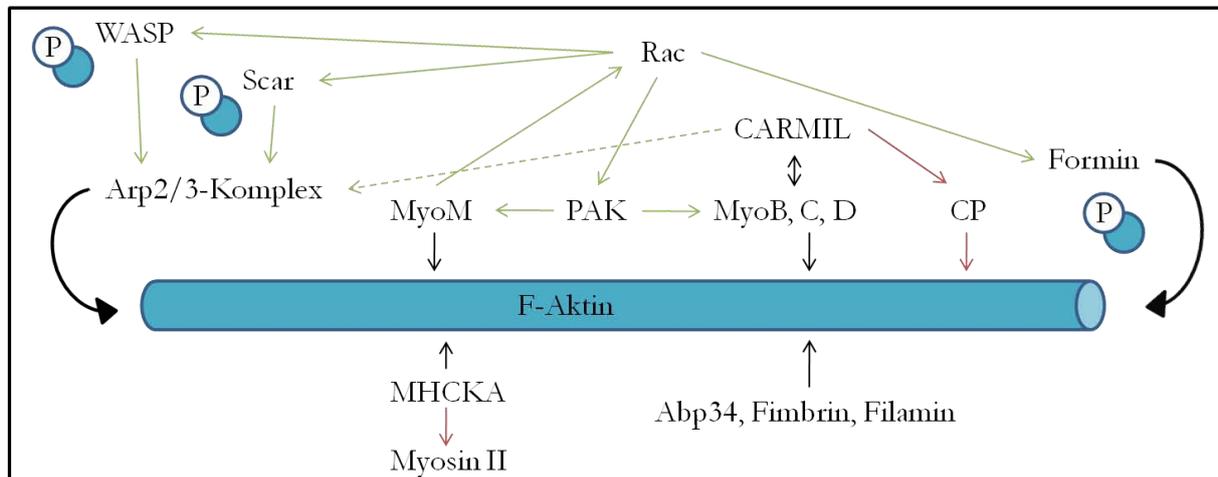
Damit ein Partikel in die Zelle aufgenommen werden kann, wird die Membran durch gezielte Polymerisation von F-Aktin vorgeschoben. Es bilden sich sogenannte *Phagocytic Cups*, bzw. *Crowns* bei der Makropinozytose. Es wird vermutet, dass das Signal zur Bildung der *Cups* über heterotrimere G-Proteine weitergeleitet wird [87]. Der Verlust der einzigen in *Dictyostelium* vorkommenden  $\beta$ -Untereinheit reduzierte die Phagozytose der Mutanten drastisch. G-Proteine sind für eine Aktivierung weiterer Enzyme wie der Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) oder der Phospholipase C (PLC) zuständig. Werden beide Enzyme über einen Inhibitor gehemmt, reduziert sich die Phagozytose der betroffenen Zellen ebenfalls [32, 87]. Diese Ergebnisse implizieren, dass sowohl die PI3K als auch die PLC eine Funktion in der Regulation phagozytotischer Prozesse besitzen. Das Substrat von PI3K und PLC ist Phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphat (PIP<sub>2</sub>). Die PI3K bildet daraus ein dreifach phosphoryliertes Inositid (PIP<sub>3</sub>), welches sich zeitweise am

entstehenden Phagosom und am Makropinosom anhäuft [32] und das Signal als *Second Messenger* weiterleiten kann.

Eine entscheidende Rolle in der Phagozytose spielt die kleine Rho GTPase RacC. Ihre Überexpression führte in *Dictyostelium* zu einer erhöheten Phagozytose, während die Makropinozytose unbeeinflusst blieb [103]. Ihre Wirkung auf andere Proteine und Regulatoren der Partikelaufnahme sind in Abbildung 2 stark vereinfacht zusammengefasst. RacC wirkt dabei über Kinasen der PAK-Familie auf das unkonventionelle Myosin MyoM, welches in einer Rückkopplung Rac wiederum aktivieren kann [84]. Über MyoM ist bisher wenig bekannt, aber gekoppelt an ein grün fluoreszierendes Protein (GFP) konnte es in sich bildenden Makropinosomen beobachtet werden [84]. Von Rac und auch PIP<sub>2</sub> sind außerdem Proteine der WASP/Scar-Familie abhängig. WASP bindet *in vitro* PIP<sub>2</sub> [79] und hat in RacC seinen Hauptregulator [44]. Sowohl WASP als auch Scar gelten als positive Regulatoren der Aktinpolymersiation [79, 102]. Sie binden Aktinmonomere und können mit dem Arp2/3-Komplex interagieren [78]. Eine Scar-Nullmutante zeigt eine um 80 % reduzierte Phagozytoserate und mit einer Reduktion von 40 % eine ineffizientere Aufnahme von Flüssigkeit [102]. Scar lokalisiert vorwiegend im Zytoplasma [102] und nur wenig im Zellkortex. Diese Verteilung ist ähnlich der des Arp2/3-Komplexes. Er lokalisiert in *Dictyostelium* ebenfalls im Zytoplasma und akkumuliert gelegentlich im Zellkortex und den makropinozytotischen *Crowns* [51]. Durch seine den Aktinmonomeren nachempfundene Struktur kann er dort die Neubildung von Aktinfilamenten hervorrufen [78]. Profilin, die den Austausch von ADP zu ATP der Aktinmonomere katalysieren, stellen dabei dem Arp2/3-Komplex am entstehenden Phagosom [61] leicht assoziiierende Monomere zur Verfügung. Neben den bisher genannten sind noch zahlreiche weitere Proteine am Internalisierungsprozess des Partikels beteiligt. CARMIL, zum Beispiel, gilt wie WASP und Scar ebenfalls als Initiator für die Aktinfilamentbildung [94]. Es hemmt das *Capping Protein* (CP) und ermöglicht so die Verlängerung der Aktinfilamente [125]. CARMIL bildet vermutlich mit Klasse I Myosinen (MyoB, MyoC) und Arp2/3 einen Komplex [55], um eine effektive Verlängerung und Anordnung der Aktinfilamente zu gewährleisten. Die Klasse I Myosine übernehmen dabei vermutlich vor allem eine Funktion in der Aufrechterhaltung der Membranspannung [101].

Mit fortschreitender Internalisierung ermöglichen die wachsenden Aktinfilamente, dass die Membran sich weiter um das Partikel schiebt. Dabei wird das Aktinnetzwerk von zahlreichen Molekülen stabilisiert, die die Filamente quervernetzen können. Darunter fallen unter anderem ABP34, Fimbrin und Filamin, die alle im Zellkortex und den Filopodien lokalisieren [54, 83, 88]. Myosin II wurde in isolierten frühen Phagosomen [93] und Pinosomen [80] gefunden, doch seine Funktion bei der Endozytose ist noch unklar. In *Dictyostelium* spielt es unter anderem eine Rolle in der Chemotaxis, Zytokinese und Zellbewegung. Es wird von der *Myosin Heavy Chain*-Kinase A

(MHCK A) phosphoryliert und inaktiviert. Die MHCK A lokalisiert ebenfalls in Bereichen, in denen Vorstülpungen der Membran aufgrund von Aktin erfolgen und verhindert dort vermutlich die Bildung von Myosin II-Filamenten [94]. Die bisher dargestellten Zusammenhänge zeigt Abbildung 2.



**Abbildung 2: Vereinfachtes Schema der Regulation des polymerisierenden Aktinzytoskeletts während der Internalisierung eines Partikels.** Dieses Modell ist sehr stark vereinfacht und zeigt nur Eckpunkte der Interaktionen zwischen dem Aktinskelett und seinen Regulatoren. Ebenso darf die zentrale Rolle von Rac nicht überbewertet werden (blaue Kreise: Aktinmonomere, P: Profilin, grüne Pfeile: Aktivierung, rote Pfeile: Inhibition; modifiziert nach F. Rivero, 2008 [94])

Mit zunehmender Ausstülpung der Plasmamembran wird die Depolymerisierungsmaschinerie aktiviert. Dabei kommt es zuerst zu einer Inaktivierung des Arp2/3-Komplexes an der Basis des Phagosoms. Dies geschieht durch die Aktivität von aktinbindenden Coroninproteinen. 1991 konnten De Hostos *et al.* erstmals ein 55 kDa schweres Coroninprotein aus *Dictyostelium discoideum* aufreinen [30]. Es akkumuliert in Bereichen wie den *Crowns* bei der Phagozytose oder den makropinozytotischen *Cups* [30] in denen Neustrukturierungen von Aktin stattfinden. Das Fehlen von Coronin in *Dictyostelium* führt daher sowohl zu einer Reduktion in der Phagozytose [73] als auch Makropinozytose [43]. Das Homolog der Hefe Crn1 reguliert den Arp2/3-Komplex über seine *coiled-coil*-Domäne [50]. Erst 2011 konnten Liu *et al.* zeigen, dass Crn1 *in vitro* und vermutlich *in vivo* den Arp2/3-Komplex nicht nur inhibieren, sondern auch aktivieren kann. Aktivierung und Inhibition werden dabei in Abhängigkeit der Coroninkonzentration reguliert [64]. Die Regulation des Komplexes durch Coronin erfolgt also wesentlich feiner, als man bisher angenommen hatte. Mit der Inaktivierung des Komplexes wird der Abbau des Aktinnetzwerkes nach und nach eingeleitet. Das bis dahin gehemmte *Capping Protein* (CP) wird durch eine Inaktivierung von CARMIL aktiv und verhindert, dass weitere Aktinmonomere an Filamente angebaut werden [94]. Eine depolymerisierende Funktion wird unter anderem den Proteinen Cofilin und Severin zugeschrie-

ben. Beide setzen durch den Abbau von Aktinfilamenten die monomeren Aktinmoleküle erneut frei. Die Wirkung von Cofilin wird dabei vom aktininteragierenden Protein Aip verstärkt [2].

Zeitgleich mit der Depolymerisierung und dem Rückzug des Aktinnetzwerkes schließt sich die Membran um das Partikel oder die Flüssigkeit und entlässt das Vesikel ins Cytoplasma. Coronin verbleibt noch bis zu einer Minute auf dem Phagosom [73], bevor es mit Aktin vollständig dissoziiert. Das Endosom ist damit bereit für den nächsten Reifungsprozess.

### 6.2.2 Die Ansäuerung des Endosomenlumens

Nachdem das Aktinzytoskelett und Coronin von der Oberfläche des Endosoms entfernt wurde, können kleine Vesikel mit diesem fusionieren. Über diese Vesikel werden unterschiedliche Proteine zum Endosom transportiert, die die unterschiedlichen Reifestadien des Endosoms charakterisieren. Eines der ersten Proteine, welches nach der Dissoziation von Aktin auf dem jungen Endosom zu finden ist, ist Rab7. Diese kleine GTPase konnte, gekoppelt an GFP, auf frühen und späten Endosomen lokalisiert werden [96]. Dort scheint sie die Rekrutierung lysosomaler Enzyme an das Endosom zu beeinflussen. Diese Erkenntnisse basieren auf der Entdeckung, dass in aufgereinigten Phagosomen einer dominant-negativen Rab7-Mutante keine  $\alpha$ -Mannosidase und nur sehr geringe Mengen des lysosomalen integralen Membranproteins LmpA nachgewiesen werden konnten [96].

Um lysosomalen Enzymen ihr bevorzugtes Milieu bieten zu können, wird das Endosom nach Aufnahme eines Partikels oder auch Flüssigkeit in Sekunden angesäuert [69-70]. Für diese Ansäuerung ist vor allem die  $H^+$ -ATPase zuständig [93]. Transportiert wird sie über kleine Vesikel, die mit dem Endosom verschmelzen [25]. Dadurch kann sie Protonen in das Lumen des Endosoms pumpen, wodurch sich das Milieu auf einen pH von 5 reduziert [4]. Wie wichtig die Ansäuerung für die Endozytose ist, zeigen Experimente, in denen die Aktivität dieser Protonenpumpe herabgesetzt wurde. Der Einsatz von spezifischen Inhibitoren [114] und eine Mutation in einer der  $H^+$ -ATPase-Untereinheiten [65] konnte zeigen, dass die Endozytose der betroffenen Zellen stark reduziert war. Der pH-Wert des nun auch als Endolysosom bezeichneten Kompartiments scheint außerdem Fusionen von Phagosomen mit anderen Vesikeln zu regulieren [97].

Neben Rab7 und der ATPase werden außerdem Cysteinproteasen mit einer N-Acetylglucosamin-1-Phosphat- (GlcNAc-1-P) Modifikation zum Endosom transportiert. Souza *et al.* konnten zeigen, dass die Anlieferung von Enzymen mit solchen Modifikationen innerhalb der ersten drei Minuten nach der Internalisierung von Bakterien stattfindet [107]. Nach 15 Minuten hingegen trägt das saure Endosom lysosomale Enzyme mit einer Mannose-6-Phosphat- (Man-6-P) Modifikation [107]. Darunter fallen die bereits erwähnte  $\alpha$ -Mannosidase aber auch  $\beta$ -Glukosidasen. Ein

weiteres Enzym, Gp70, wird ebenfalls während der sauren Phase ins Endosom transportiert. Gp70 ist eine Esterase, die sowohl auf Phagosomen lokalisiert als auch mit Lysosomen in Verbindung gebracht wird [127]. Aufgereinigtes Gp70 zeigte *in vitro* eine Hydrolyseaktivität gegenüber Bestandteilen von Lipiden und Lipopolysacchariden. Außerdem führten Mutationen zu einer veränderten Phagozytoserate [127]. All dies spricht dafür, dass auch Gp70 am Verdau von Bakterien in Phagosomen beteiligt ist.

Die Zusammensetzung des Endolysosoms wird zeitlich stark reguliert und jedes Enzym-Set kann nur in einem bestimmten Zeitfenster im Endosom reagieren. Diese Zeitfenster sind durch den An- und Abtransport der Enzyme begrenzt. Der Transport wird über Fusionen zwischen Vesikeln und Endosom gewährleistet. Für die Regulation dieser Fusionen sind Proteine wie die vesikelassoziierte Kinase VSK3 zuständig [36]. Fang *et al.* konnten VSK3-YFP an der Peripherie von intrazellulären Vesikeln lokalisieren und die Fusionsrate zwischen Phagosomen und Lysosomen war in VSK3-Nullzellen stark eingeschränkt.

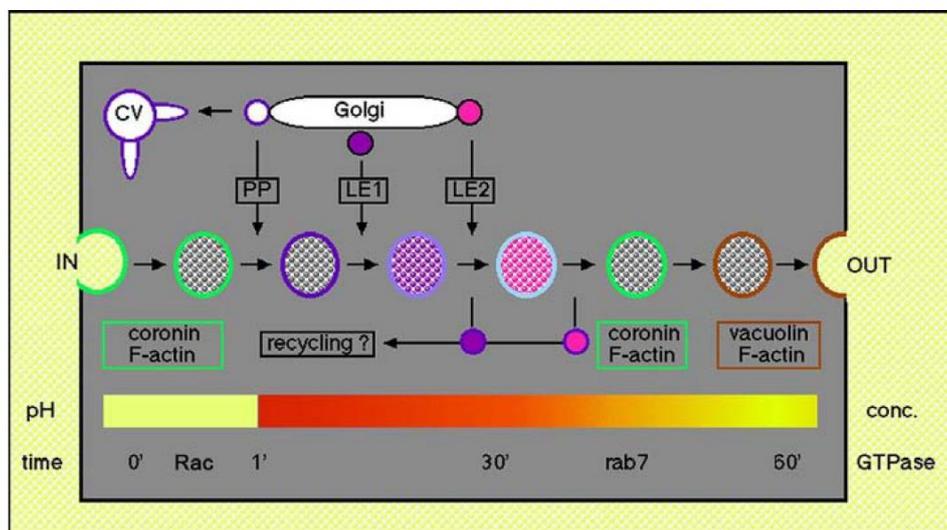
Der Rück- und Abtransport der Enzyme vom Endosom wird unter anderem über Myosin IB gewährleistet. Neuhaus *et al.* konnten in *Dictyostelium*-Zellen zeigen, dass sowohl das Fehlen, als auch die Hemmung von MyoB eine Anhäufung von Markern und Oberflächenproteinen der Plasmamembran in endozytotischen Vakuolen zur Folge hat [80]. Beim Rücktransport lysosomaler Enzyme ist ebenfalls die kleine GTPase Rab7 beteiligt. Sie reguliert den Transport kleiner Vesikel von Postlysosomen zurück zu frühen Lysosomen [17]. Mit dem Rücktransport der H<sup>+</sup>-ATPase zu frühen Endosomen [25] wird der nächste Reifungsprozess und schließlich die Exozytose eingeleitet.

### **6.2.3 Die Neutralisierung des Endosoms und Exozytose von unverdaulichem Material**

Das Recycling, bzw. der Abtransport der Protonenpumpe ist am sogenannten Postlysosom durch das Protein Dynamin gekennzeichnet [123], welches bei der Abschnürung von Vesikeln beteiligt ist. Der Verlust der H<sup>+</sup>-ATPase führt, ungefähr 45 Minuten nach der Aufnahme eines Partikels an der Plasmamembran [25], zu einem Anstieg des pH-Werts im Endosomenlumen [97]. Dieser neutrale pH-Wert ist vermutlich Voraussetzung für homotypische Fusionen, die in einem großen, mehrere Partikel enthaltenen Phagosom resultieren [97]. Die Regulatoren dieses Vorgangs sind die GTPase RabD und die nachgeschaltete PI3K. Zellen, die eine konstitutiv aktive oder dominant negative Form von RabD exprimieren, zeigen eine erhöhte oder verminderte Fusionsrate ihrer Phagosomen [46]. Die erhöhte Rate ließ sich darüber hinaus mit einem spezifischen Inhibitor für die PI3K retten [46].

Nachdem die Fusionen zwischen den Endosomen abgeschlossen sind, ist um das Phagosom erneut filamentöses Aktin nachweisbar [60]. Mit Aktin werden zudem die bereits beschriebenen aktinbindenden Proteine wie der Arp2/3-Komplex [51], Scar [102] und Coronin [91] ans Endosom rekrutiert. Letzteres wird allerdings zunehmend durch Vacuolin B ersetzt, was in Lokalisationsstudien nachweisbar war [53]. Für Vacuolin B-Mutanten konnten Jenne *et al.* zeigen, dass die Endozytoserate der Mutanten unverändert blieb. Die Fähigkeit, Endosomen zu neutralisieren und deren Inhalt über die Exozytose in die Umgebung auszuschleiden war jedoch stark reduziert. Vacuolin-Nullzellen wiesen zusätzlich vergrößerte und sehr wenige Postlysosomen auf [53]. Vacuolin B scheint daher zusätzlich die Fusionen zwischen diesen Kompartimenten verhindern zu können.

Die Ausscheidung von unverdaulichem Material in die Umgebung erfolgt ca. 60 bis 90 Minuten nach der Endozytose [91]. Sie unterscheidet *Dictyostelium* stark von Säugerzellen, bei denen nicht weiter verwertbare Endprodukte in Lysosomen gespeichert werden. Werden lysosomale Enzyme in *Dictyostelium* nicht rechtzeitig recycelt, werden auch sie über die Exozytose ausgeschieden [31]. Der Weg eines Endosoms von der Aufnahme zur Exozytose ist in Abbildung 3 übersichtlich dargestellt.



**Abbildung 3: Schematische Darstellung des endozytotischen Transits in *Dictyostelium discoideum*.** Der Transit beginnt mit der Endozytose (IN) und endet mit der Exozytose (OUT). Die verschiedenen Farben beschreiben die beteiligten Proteine: Coronin (hellgrün); vakuoläre H<sup>+</sup>-ATPase, konzentrationsabhängig (dunkelblau bis hellblau); Vacuolin (braun). Abkürzungen: CV = Kontraktile Vakuole, PP = Protonenpumpe (vakuoläre H<sup>+</sup>-ATPase); LE1 = lysosomale Enzyme mit GlcNAc-1-P-Modifikationen; LE2 = lysosomale Enzyme mit Man-6-P-Resten (aus: Maniak, 1999 [68])

### 6.3 Der Transport lysosomaler und sekretorischer Proteine

Sowohl lysosomale als auch sekretorische Proteine tragen eine N-terminale Signalsequenz, die sie für das Endoplasmatische Retikulum (ER) markieren. Diese aus ungefähr 15-35 meist hydrophoben Aminosäuren bestehenden Sequenzen werden noch während der Translation am Ribosom von einem RNA-Protein-Komplex erkannt. Dieses *Signal Recognition Particle* (SRP) bindet die Signalsequenz am Protein und blockiert das translatierende Ribosom. In der ER-Membran befindet sich der SRP-Rezeptor. Dieser bindet das SRP und durch die Nähe zu einer Pore in der ER-Membran wird das Protein kotranslational ins Lumen oder in die Membran des ERs transportiert (zusammengefasst in [128]). Im ER wird die Signalsequenz abgespalten und die Proteine anschließend gefaltet und modifiziert. Die meisten Proteine, die kotranslational ins ER gelangen erhalten Zuckermodifikationen an ihren Asparaginen (N-Glykosylierung). Diese Modifikationen dienen zunächst der Kontrolle des Faltungsstatus (zusammengefasst in [3]). Ebenfalls im ER kann das Protein kovalent mit einem Lipidanker (Glykosylphosphatidylinositol-Anker = GPI-Anker) am C-Terminus versehen werden. Die Verankerung ermöglicht ein Abspalten des Proteins über Phospholipasen und kann unter anderem als Regulator für die Zelladhäsion fungieren [126]. In *Dictyostelium* ist das Zelladhäsionsmolekül csA über einen GPI-ähnlichen Anker in der Plasmamembran verankert. Wird die Wirkung der GPI-spezifische Phospholipase D durch 1,10-Phenanthrolin gehemmt, resultiert daraus eine stark eingeschränkte Entwicklung der Zellen [126]. Nach der Faltung und Kontrolle des Proteins im ER wird es über sogenannte ER *Exit Sites* in Vesikeln zum *cis*-Golgi transportiert. Im Golgi-Apparat trennen sich die Wege eines lysosomalen von einem sekretorischen Protein. Die Sortierung lysosomaler Enzyme wird weiter über Zuckermodifikationen gewährleistet. Die N-gebundenen Mannosereste der sauren Hydrolasen ( $\alpha$ -Mannosidase,  $\beta$ -Glukosidase etc.), die zum Lysosom transportiert werden sollen, werden im *cis*-Golgi phosphoryliert wodurch ein Mannose-6-Phosphatrest (Man-6-P) entsteht. Dieser kann beim Menschen im *trans*-Golgi-Netzwerk (TGN) vom Man-6-P-Rezeptor erkannt werden [119] und transportiert darüber die Hydrolasen spezifisch über ein Vesikel zum Lysosom. In *Dictyostelium* ist die Sortierung lysosomaler Enzyme ähnlich wie im Menschen sowohl von Clathrin [98] als auch dem Adaptor Protein 1 (AP1)-Komplex [62] abhängig. Für *Dictyostelium* konnte allerdings bisher kein homologer Man-6-P-Rezeptor gefunden werden [19], der diese Sortierung initiieren könnte. Die Erkennung lysosomaler Enzyme in *Dictyostelium* könnte also über einen bisher unbekanntem Rezeptor ablaufen. Eine weitere Möglichkeit ist eine AP1-unabhängige Sortierung über GGAs (*Golgi-localized  $\gamma$ -ear-containing Arf-binding proteins*) wie sie auch in vielen anderen Organismen erfolgt [62].

Die Vesikel, in denen sich die Hydrolasen zusammenfinden, werden am TGN mit Clathrin besetzt abtransportiert und verschmelzen mit dem Lysosom. Der im Lysosom herrschende, niedrige pH-Wert führt zu einer Dissoziation des Rezeptors vom Enzym. In diesem sauren Milieu werden viele lysosomale Enzyme erst proteolytisch prozessiert, um in ihre aktive Form überzugehen [41].

Ein sekretorisches Protein wird im Golgi-Apparat auf dem sekretorischen Standardweg weiter transportiert. Dabei wird es ebenfalls im Golgi-Apparat sortiert und über Vesikel direkt zur Plasmamembran gebracht. Plasma- und Vesikelmembran fusionieren, so dass membranständige Proteine in die Plasmamembran inseriert werden. Lösliche Proteine werden vom Vesikellumen in den extrazellulären Raum entlassen. Es wird davon ausgegangen, dass es in unpolarierten Zellen keines Signals für den sekretorischen Standardweg bedarf. Vielmehr werden Proteine, die nicht zur Plasmamembran sortiert werden sollen, mit Signalsequenzen ausgestattet und somit von sekretorischen Proteinen unterschieden (zusammengefasst in [3, 48]).

#### **6.4 Zwei lysosomale Enzyme beeinflussen in *D. discoideum* die Phagozytose**

Der effektive Verdau eines Bakteriums oder anderer Partikel ist abhängig vom Transport lysosomaler Enzyme zum Endosom. Die vorhergehende Aufnahme dieses festen Materials aus der Umgebung wird ebenfalls durch lysosomale Enzyme beeinflusst. Dabei spielen in *Dictyostelium* zwei Proteine eine entscheidende Rolle: das Lysozym AlyA und die Esterase Gp70.

##### **6.4.1 Das Lysozym AlyA**

Lysozyme zeichnen sich durch ihre enzymatische Aktivität gegenüber Bestandteilen der bakteriellen Zellwand aus. Sie ist aus einem Netzwerk von N-Acetylmuraminsäure und N-Acetylglukosamin aufgebaut. Diese Polysaccharide sind über eine  $\beta$ -(1,4)-glykosidische Bindung miteinander verbunden und sind vor allem in grampositiven, aber auch in gramnegativen Bakterien der Angriffspunkt für Lysozyme [86]. Wird die Bindung durch Hydrolyse zerstört, so resultiert eine Permeabilisierung der Zellwand, was schließlich zum Tod des Bakteriums führt. Lysozyme werden von einer Vielzahl eukaryotischer Organismen gebildet und dienen meist dem Schutz vor bakteriellen Infektionen. Da *Dictyostelium discoideum* Bakterien als Nahrungsquelle bevorzugt, nutzt er Lysozyme ebenfalls für den Verdau dieser Mikroorganismen. Das Genom von *Dictyostelium* enthält elf potentielle Lysozyme, die in vier Klassen unterteilt werden können. Neben der Lysozymklasse der T4-Bakteriophagen, der Klasse C aus dem Hühnereiweiß und den Homologen der *Entamoeba histolytica*-spezifischen Lysozyme, enthält die vierte Klasse die für *Dictyostelium discoideum* spezifischen Enzyme. Dieser Klasse gehören vier Lysozyme an, die als Amöben

Lysozyme (Aly) A bis D bezeichnet werden. AlyA wird dabei am stärksten exprimiert und konnte bereits aufgereinigt werden [77]. Das isolierte Protein zeigte beim Verdau von *Micrococcus luteus* ein Aktivitätsoptimum zwischen pH 4,5 und pH 6 [77] und konnte von I. Müller auf Phagosomen und bis dahin unbekannt kleinen Vesikeln nachgewiesen werden [77]. Das Fehlen von AlyA resultierte in kleineren Durchmessern der Fresshöfe (*Plaques*) auf Bakterienrasen, die jedoch mit der Zeit in kompensiert werden konnten [77]. So zeigten *AlyA-Knockout-Zellen* zu Beginn Fresshöfe, die nur 60 % der Größe von wildtypischen Zellen entsprachen, aber bereits nach 60 Tagen Durchmesser von 130 % aufwiesen. Dieser Anstieg stabilisierte sich nach 90 Tagen auf 180 %. Die Phagozytoserate der Mutanten war ebenfalls fast doppelt so hoch wie die der Vergleichszellen. Die Aufnahme von Flüssigkeiten blieb in den *AlyA-Knockout-Zellen* hingegen unverändert [77]. Weitere Veränderungen konnten bei der Untersuchung der Expressionslevel von anderen lysosomalen Proteinen festgestellt werden. Die Expression der Esterase Gp70 konnte anhand von Westernblotanalysen als in den *AlyA-Knockout-Zellen* stärker exprimiert nachgewiesen werden [75].

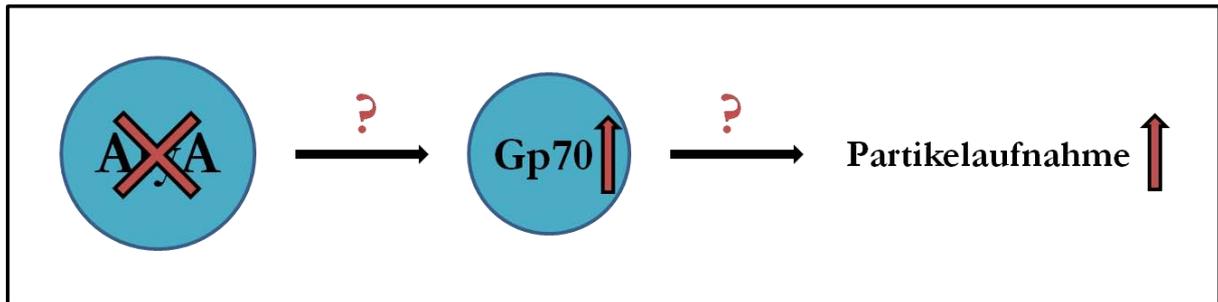
#### **6.4.2 Die Esterase Gp70**

1990 identifizierten Bomblies *et al.* ein 69 kDa schweres Protein, welches Hauptbestandteil von kristallinen Strukturen in *Dictyostelium discoideum* war [12]. Diese membranumhüllten Kristalle wurden als Esterosomen bezeichnet, da das entdeckte Protein eine hohe Sequenzübereinstimmung zu Esterasen zeigte. Neben einer aktinbindenden Eigenschaft wurde ebenfalls die Esteraseaktivität für Gp70 postuliert [23]. Wie das Lysozym AlyA konnte auch Gp70 von Yuan und Chia auf Phagosomen lokalisiert werden [127]. Eine Kolokalisation mit den von AlyA-GFP angefärbten Vesikeln konnte I. Müller für die Esterase jedoch nicht nachweisen [77]. Das Aktivitätsoptimum für Gp70 liegt im sauren Bereich [127]. Dies lässt vermuten, dass auch Gp70 an der Degradation von endozytiertem Material beteiligt ist. Wird Gp70 im Übermaß exprimiert, so resultiert daraus eine um 22 % erhöhte Phagozytose [127]. Yuan und Chia konnten außerdem vergrößerte Durchmesser der Fresshöfe verzeichnen. Während der Phagozytosedefekt der Gp70-Überexprimierer von I. Müller in unabhängigen Klonen mit einer Phagozytoseerhöhung von 40 % nahezu bestätigt werden konnte, ließen sich die veränderten *Plaque*-Durchmesser von ihr nicht reproduzieren [76].

#### **6.5 *Microarray*-Analysen bilden die Grundlage für die Entschlüsselung eines Signalweges und die Identifizierung von Regulatoren der Phagozytose**

Mit dem Lysozym AlyA und der Esterase Gp70 konnten zwei Proteine identifiziert werden, die in ähnlichen Phänotypen resultieren. Wurde die Synthese von AlyA unterbunden oder die Ex-

pression von Gp70 erhöht, zeigten die Mutanten eine erhöhte Phagozytose gegenüber wildtypischen Zellen. Hervorzuheben ist außerdem, dass die Gp70-Expression in den *AlyA-Knockout*-Zellen selbst erhöht war. Dies führte zu der Annahme, dass beide Proteine Bestandteil eines gemeinsamen Signalweges sind. Da die Proteine jedoch nicht in den gleichen Kompartimenten anzutreffen sind, müssen weitere Faktoren den Signalweg zwischen beiden Proteinen vervollständigen. Abbildung 4 beschreibt übersichtlich diese Zusammenhänge.



**Abbildung 4: Schematische Darstellung der Zusammenhänge zwischen dem Lysozym AlyA, der Esterase Gp70 und der Partikelaufnahme an der Plasmamembran.** Die Lokalisation von AlyA und Gp70 in unterschiedlichen Kompartimenten setzt weitere Faktoren (rote Fragezeichen) voraus, die die Signale zwischen AlyA und Gp70 bis hin zur Plasmamembran übertragen können.

Um diese Hypothese genauer zu untersuchen, unterzog I. Müller beide Mutanten einer cDNA-*Microarray*-Analyse. Bei dieser Analyse wurden 5423 ESTs (*Expressed Sequence Tags*) auf einem Chip immobilisiert. Diese entstammten den cDNA-Analysen von Urushihara *et al.* [117] und repräsentierten etwa die Hälfte aller Gene von *Dictyostelium*. Die ESTs wurden anschließend mit cDNA der *AlyA-Knockout*-Mutante oder dem Gp70-Überexprimierer hybridisiert und über Fluoreszenzsignale mit wildtypischen Expressionsmustern verglichen. I. Müller konnte auf diese Weise fast 50 verschieden regulierte Gene in den beiden Mutanten feststellen. Davon waren einige sowohl in der *AlyA*-Mutante als auch in den Gp70-überexprimierenden Zellen signifikant verändert, andere hingegen nur in der *AlyA*-Mutante. Die Tabelle 1 zeigt eine Übersicht der veränderten Gene beider Mutanten.

**Tabelle 1: Übersicht über die signifikant veränderten Genexpressionen in AlyA- und Gp70-Mutanten (verändert nach Müller, 2006 [76]).**

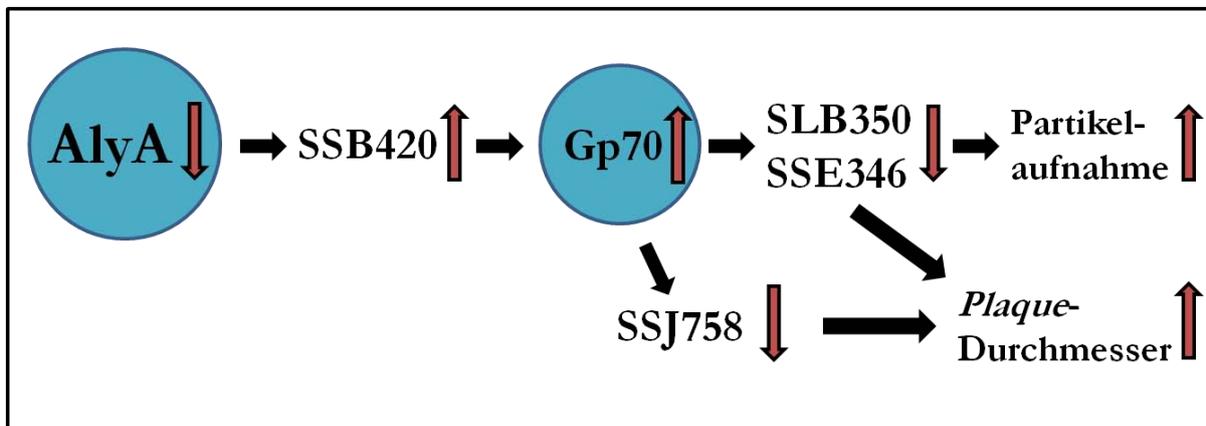
	AlyA- <i>Knockout</i>	Gp70-Überexprimierer
positiv signifikant reguliert	V4, H5, Discoidin, NDPK, SSB420, SSL793, SSH819, VSI664, SSD673, SSD485 und 12 weitere Gene	Gp70 und vier weitere Gene
negativ signifikant reguliert	Lysozym (SSF615), tipD, SLB350, SSB389, SSE346, SSJ758, alp, SSL845, VSI401 und vier weitere Gene	V4, Discoidin, tipD, SLB350, SSB389, SSE346, SSJ758, alp, SSL845, VSI401 und acht weitere Gene

Viele der in den *Microarray*-Analysen identifizierten Gene zeigten sowohl eine verringerte Expression in den AlyA- wie auch in den Gp70-Mutanten (vgl. Tabelle 1). Diese Proteine könnten Faktoren sein, die in einem Signalweg unterhalb von AlyA und nach Gp70 eine Funktion ausüben und somit die Phagozytose negativ regulieren. Um die verringerte Expression nachzuahmen, wurden bereits von I. Müller *Knockout*-Mutanten für die Gene SSE346 und SSJ758 hergestellt und ihre Phänotypen in Bezug auf die Phagozytose untersucht. Tatsächlich zeigten SSE346-*Knockouts* eine erhöhte Phagozytose und vergrößerte *Plaque*-Durchmesser [76]. Das Ausschalten von SSJ758 hingegen resultierte nur in einem vergrößerten Hofdurchmesser [76].

G. Konotop konnte zeigen, dass der Verlust von SLB350 ebenfalls zu einer erhöhten Aufnahme von Partikeln führt [57]. Die SLB350-*Knockout*-Mutanten zeigten allerdings keine Veränderung in der Ausbildung der Fresshöfe auf Bakterienrasen. Mit diesen Ergebnissen wird deutlich, dass das von AlyA ausgehende Signal über Gp70 nicht zwangsläufig die Phagozytose und den *Plaque*-Durchmesser in gleicher Weise reguliert. Eine veränderte Phagozytoserate in den Mutanten kann von der Fähigkeit, sich durch einen Bakterienrasen zu fressen, entkoppelt sein. SLB350 gilt trotzdem als negativer Regulator der Phagozytose.

Proteine, die in den Lysozymmutanten hochreguliert, aber im Gp70-Überexprimierer nicht verändert waren, könnten ebenfalls Regulatoren der Phagozytose sein. Mit der Überexpression von SSB420 in wildtypischen Zellen konnte G. Konotop nachweisen, dass die Phagozytoserate in den Mutanten ansteigt [57]. Der *Plaque*-Durchmesser erhöhte sich sogar ähnlich dem der AlyA-Mutanten um ca. 200 %. Da SSB420 oberhalb von Gp70 wirkt, zeigten die Mutanten außerdem die erhöhte Gp70-Expression [57]. SSB420 passt damit eindeutig in den Signalweg von AlyA

über Gp70 bis hin zu einer erhöhten Partikelaufnahme und gilt als positiver Regulator der Phagozytose. Die Proteine, die bisher in den Signalweg integriert werden konnten, zeigt Abbildung 5.



**Abbildung 5: Darstellung der Abfolge von bisher erfolgreich in den AlyA-Gp70-Signalweg eingeordneten Proteinen der *Microarray*-Analysen.** Durch die herabgesetzte AlyA-Menge wird die Expression von SSB420 hochreguliert und das Signal über Gp70 an SSJ758 und an SSE346 oder SLB350 weitergeleitet. In welcher Reihenfolge die beiden Letzteren angesprochen werden und welche zusätzlichen Faktoren für die Weiterleitung des Phagozytosesignals benötigt werden, ist bisher unklar. Die Veränderung der *Plaque*-Durchmesser wird von SSE346 sowie SSJ758 beeinflusst.

Neben den bisher genannten Kandidaten wurden noch weitere Proteine untersucht. Für H5, SSL793, SSH819, SSB389 und TipD konnten in den entsprechenden Mutanten jedoch keine Phänotypen nachgewiesen werden, die für eine Teilnahme am Signalweg gesprochen hätten. Die Mutanten zeigten entweder keine Auswirkungen der Manipulation oder Phänotypen, die nicht dem Signalweg entsprachen. Dies zeigt, dass nicht von allen Kandidaten, die aus den Expressionsvergleichen hervorgegangen waren, eine Funktion unterhalb von AlyA zu erwarten ist. Eine genaue Untersuchung weiterer Gene der oben dargestellten Liste ist daher unerlässlich.

## 6.6 Zielsetzung dieser Arbeit

Bei der Erforschung der Signalkette konnten bisher deutlich mehr Informationen unterhalb von Gp70 gewonnen werden als oberhalb. Aus diesem Grund sollten im Rahmen dieser Arbeit weitere potentielle Regulatoren untersucht werden, die die Phagozytose oberhalb von Gp70 positiv beeinflussen könnten. VSI664, SSD673 und SSD485 bildeten interessante Kandidaten. Um ihren Einfluss auf die Phagozytose zu untersuchen, mussten vorerst Mutanten hergestellt werden, die die Proteine im Übermaß exprimierten. Diese sollten auf ihr Phagozytoseverhalten, die Ausbildung von *Plaques* und vor allem ihre Gp70-Expression untersucht werden. Darüber hinaus mussten Lokalisationsstudien durchgeführt werden, um zu analysieren, in welchem Bereich der Zelle die Proteine wirken und wie dies mit einer Funktion in der Signalkaskade zu vereinbaren ist.

Diese Vorgehensweise sollte schließlich die Einordnung der Proteine in die Signalkette ermöglichen. Dies könnte den bisher noch recht unverstandenen Signalweg, ausgehend von einer Reduktion eines Lysozyms in Endosomen bis hin zur Partikelaufnahme an der Plasmamembran einen Schritt weiter entschlüsseln.

## 7 Materialien

### 7.1 Geräte

Autoklav	Zirbus, Bad Grund
Blot-Kammern	Biometra, Göttingen
Elektrophorese-Kammern	MPI Martinsried
Fireboy (eco)	Integra Bioscience, Fernwald
Fluoreszenzspektrometer:	
- Fluorometer SFM 25	Kontron Instruments, Eichingen
- Hitachi F-2700 FL	Tokyo, Japan
Gefrierschrank (-70°C)	Heraeus, Osterode
Gefrierschränke (-20°C)	Liebherr, Ochsenhausen
GelDoc II	Biometra, Göttingen
Gelkammern	Metallwerkstatt, Uni Kassel
	MPI, Martinsried
GenePulser®	Biorad, Kanada
Gaspipetten	Hirschmann, Deutschland
Glaswaren	Schott, Mainz
Hamiltonspritze	Hamilton, Schweiz
Impföse	Schuett, Göttingen
Inkubationsrad	Schuett, Göttingen
Kühlschränke (4°C)	Liebherr, Ochsenhausen
Küvetten (Quarz)	Hellma, Müllheim
Leuchttisch	Messinginstrumentebau, Erlangen
Magnetrührer mit Heizplatte	IKA, Staufen im Breisgau
Metallspatel	Schuett, Göttingen
Mikroskope und Zusatzgeräte:	
- Binokular	Zeiss, Göttingen
- CLSM, TCS SP2	Leica, Bensheim
- Fluoreszenzmikroskop (invers), DM IRB	Leica, Bensheim
- Kaltlichtquelle KL1500 electronic	Leica, Bensheim
- Kamera DFC 480	Leica, Bensheim
- M3Z Stereozoom Mikroskop	Wild Heerbrugg, Schweiz
Mikrowelle	Daewoo, Korea
Multipette®	Gilson, Frankreich

PCR-Thermocycler:	
- PCR-Express	Hybaid, Heidelberg
- PCR TGradient	Biometra, Göttingen
pH-Meter 523	WTW, Weilheim in OB.
Pipetboy (acu, comfort)	Integra Bioscience, Fernwald
Pipetten (2 µl; 20 µl; 200 µl; 1000 µl)	Gilson, Frankreich
Photometer Ultrospec 3000pro	Amersham Pharmacia, Freiburg
Schüttelinkubatoren Lab Shaker	Adolf Kühner AG, Schweiz
	Infors AG, Bottmingen
	GFL, Burgwedel
Schwenkplatte (Taumler)	Biometra, Göttingen
Spannungsgeräte	Amersham Pharmacia, Freiburg
	Biometra, Göttingen
	Werkstatt, MPI Martinsried
Speed Vac Concentrator 5301	Eppendorf, Hamburg
Sterilbänke	Holten, Dänemark
Thermomix <sup>®</sup> ME	B. Braun, Melsungen
Thermomixer (comfort, compact)	Eppendorf, Hamburg
Ultraschallbad	Bandelin electronic, Berlin
Ultraschallprozessor (UP 200S)	Dr. Hielscher, Hamburg
Vacuboy	Integra Bioscience, Fernwald
Vacuumpumpe	KNF Neuberger, New Jersey, USA
Vortex	Bender & Hobein AG, Zürich, Schweiz
Waagen	Sartorius, Göttingen
	Mettler, Giessen
Wasserbad	LAUDA, Lauda-Königshofen
Zellzähler	Beckman Coulter, Krefeld
Zentrifugen:	
- Biofuge (stratos, fresco, pico)	Heraeus, Osterode
- Centrifuge 5415 C, 5424, 5810 R	Eppendorf, Hamburg
- MiniSpin	Eppendorf, Hamburg
- Rotanta/R	Hettich, Tuttlingen
- Rotina 48R	Hettich, Tuttlingen

## 7.2 Verbrauchsmaterialien

Chromatographiesäulen	Biorad, München
Deckgläser	Menzelgläser, Braunschweig
Einmalhandschuhe (Latex, Nitril)	Noba Verbandmittel, Wetter
Einwegspritzen	Henke Sass Wolf, Tuttlingen
Einwegtücher	Kimberly-Clark, England
Filterpapier 3MM	Whatman, Göttingen
Indikatorstäbchen	Roth, Karlsruhe
Injektionsnadeln	B. Braun, Melsungen
Kryogefäße (1,5 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Kulturplatten (24-Loch)	Sarstedt, Nümbrecht
Küvetten (Einmal-)	Ratiolab, Dreieich
	Sarstedt, Nümbrecht
Küvetten (EP-)	Biorad, München
Membran-Filter	Millipore GmbH, Schwalbach
Objektträger	Menzelgläser, Braunschweig
Parafilm M	American National Can, USA
Petrischalen (Ø 10 cm; Ø 5 cm)	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen	Gilson, Frankreich
Reaktionsgefäße (0,2 ml; 0,5 ml; 1,5ml, 2ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Skalpelle	C. Bruno Bayha GmbH, Tuttlingen
Sterilfilter (0,45µm)	Sarstedt, Nümbrecht
Transfermembran Nitrocellulose PROTRAN®	Schleicher & Schuell, Dassel
Zahnstoßer	Fackelmann, Hersbruck
Zentrifugenröhren (15 ml; 50 ml)	Sarstedt, Nümbrecht

## 7.3 Kits

BCA Protein Assay Kits:	
- Novagen®	Merck KGaA, Darmstadt
- Pierce®	Thermo Scientific, Illinois, USA
NucleoSpin® Extract II –	
PCR clean-up & Gel extraction Kit	Macherey-Nagel, Düren
NucleoSpin® Plasmid QuickPure –	
Plasmid DNA Purification	Macherey-Nagel, Düren

PureLink™ HiPure – Plasmid DNA Purification Kit	Invitrogen, USA
Protino® Glutathione Agarose 4B	Macherey-Nagel, Düren
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
Roti®-Quant (Bradford-Proteinbestimmung)	Roth, Karlsruhe

#### 7.4 Chemikalien

Agarose	Invitrogen, USA
Ammoniumsulfat	Merck, Darmstadt
APS	Roth, Karlsruhe
ATP	Fermentas, St. Leon-Rot
Bacto–Agar	Difco
Bacto-Trypton	Difco
BCIP	Roth, Karlsruhe
β-Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe
Brillant Blau R-250	AppliChem, Darmstadt
Borsäure	Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
BSA	Sigma-Aldrich, München
Calciumchlorid (CaCl <sub>2</sub> )	Roth, Karlsruhe
DABCO	Sigma-Aldrich, München
Diethylpyrocarbonate (DEPC)	Roth, Karlsruhe
Dikaliumhydrogenphosphat (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	Roth, Karlsruhe
Dimethylformamid (DMF)	Roth, Karlsruhe
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth, Karlsruhe
Dinatriumhydrogenphosphat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	Roth, Karlsruhe
dNTPs	Fermentas, St. Leon-Rot
EDTA	Roth, Karlsruhe
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
Fischgelatine (G7765, 45%)	Sigma-Aldrich, München
Gelvatol Typ II	Sigma-Aldrich, München
Glucose (D-)	Roth, Karlsruhe

Glutathion	Sigma-Aldrich, München
Glycerin	Sigma-Aldrich, München
Glycin	Roth, Karlsruhe
Guanidiniumthiocyanat	Roth, Karlsruhe
Hefeextrakt	Oxoid, England
HEPES	Roth, Karlsruhe
Immersol	Zeiss, Jena
IPTG	Roth, Karlsruhe
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
Kaliumacetat (KAc)	Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid (KCl)	Roth, Karlsruhe
Kaliumhydrogenphosphat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	Roth, Karlsruhe
Kalziumchlorid ( $\text{CaCl}_2$ )	Roth, Karlsruhe
Lithiumchlorid (LiCl)	Roth, Karlsruhe
Lysozym	Roth, Karlsruhe
Magnesiumchlorid ( $\text{MgCl}_2$ )	Roth, Karlsruhe
	Fermentas, St. Leon-Rot
Magnesiumsulfat ( $\text{MgSO}_4$ )	Roth, Karlsruhe
Methanol	Roth, Karlsruhe
Milchpulver (blotting grade)	Roth, Karlsruhe
Natriumacetat (NaAc)	Merck, Darmstadt
Natriumazid ( $\text{NaN}_3$ )	Roth, Karlsruhe
Natriumcarbonat ( $\text{NaCO}_3$ )	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid (NaCl)	Roth, Karlsruhe
Natriumcitrat	Roth, Karlsruhe
Natriumdihydrogenphosphat ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ )	Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxidplättchen (NaOH)	Roth, Karlsruhe
Natriumlauroylsarcosin	USB, Ohio, USA
NBT	Roth, Karlsruhe
NP 40	Calbiochem, La Jolle
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt
PEG4000	Fermentas, St. Leon-Rot
Pepton aus Casein	Merck, Darmstadt
Phosphorsäure	Roth, Karlsruhe
Pikrinsäure	Merck, Darmstadt

PIPES	Roth, Karlsruhe
Polyvinylalkohol	Roth, Karlsruhe
Protease Tabletten	Roche, Mannheim
Protease-Pepton	Oxoid, England
Repel-Silane ES	Amersham, Freiburg
Rotiphorese <sup>®</sup> Gel 30	Roth, Karlsruhe
Roti-Quant	Roth, Karlsruhe
Saccharose	Roth, Karlsruhe
Salzsäure (HCl)	Merck, Darmstadt
SDS	Roth, Karlsruhe
Stickstoff (flüssig)	Messer Griesheim, Krefeld
TEMED	Roth, Karlsruhe
Trinatriumcitratdihydrat	Roth, Karlsruhe
Tris	Roth, Karlsruhe
Trypanblau	Sigma-Aldrich, München
Tween <sup>®</sup> 20	Roth, Karlsruhe
Wasser (ddH <sub>2</sub> O)	Abteilung Genetik, Universität Kassel
Wasser ( <i>HPLC Gradient Grade</i> )	Roth, Karlsruhe
Xylencyanol	Roth, Karlsruhe
Zitronensäure	Roth, Karlsruhe

## 7.5 Puffer und Lösungen

BCIP	50 mg/ml DMF
Blockierlösung	5 % Milchpulver [w/v] in 1 x PBS Spatelspitze NaN <sub>3</sub>
CaCl <sub>2</sub> -Puffer (pH 7,0)	60 mM CaCl <sub>2</sub> 15 % Glycerol 10 mM PIPES (autoklavieren)
Carbonatpuffer (pH 10,2)	0,1 M Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>

Coomassie-Färbelösung	2 % [v/v] Phosphorsäure 6 % [w/v] Ammoniumsulfat 0,1 % [w/v] Brilliant Blau R-250
DNA-Auftragspuffer (pH 7,6, 6x)	10 mM TrisHCl 60 % Glycerin [v/v] 60 mM EDTA 0,03 % Bromphenolblau [w/v] 0,03 % Xylencyanol [w/v]
Elektroporationspuffer	10 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 50 mM Saccharose ddH <sub>2</sub> O ad 1 l (sterilfiltrieren)
Ethidiumbromidlösung	10 mg/10 ml
Elutionspuffer (pH 8)	50 mM TrisHCl 10 mM Glutathion
Laemmlipuffer (pH 6,8, 10x) [59]	0,2 M TrisHCl 33 % Glycin [v/v] 6,7 % SDS [w/v] 16,7 % β-Mercaptoethanol [v/v] 10 mg/ml Bromphenolblau
LyB-Puffer (pH 8,3) [20]	10 mM Tris 50 mM KCl 2,5 mM MgCl <sub>2</sub> 0,45 % NP 40 0,45% Tween20
NBT	75 mg/ml in 70 % DMF

PAA Laufpuffer (10x)	0,25 M TrisHCl 1,9 M Glycin 1 % SDS
PBG	0,5 % BSA 0,045 % Fischgelatine in 1x PBS
PBS (pH 7,4, 10x)	1,37 M NaCl 27 mM KCl 81 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> oder Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·x2H <sub>2</sub> O 15 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> in ddH <sub>2</sub> O
PBS (pH 7,3, 1x) (siehe 8.2.1.2)	140 mM NaCl 2,7 mM KCl, 10 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 1,8 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> in ddH <sub>2</sub> O
PBS/Glycin	100 mM Glycin in 1x PBS
Puffer 1(pH 8,0)	50 mM TrisHCl 10 mM EDTA 100 µg/ml RNase A
Puffer 2	200 mM NaOH 1 % SDS
Puffer 3 (pH 5,5)	3 M Kaliumacetat
SDS-Sammelgelpuffer (pH 6,8, 4x)	0,5 M TrisHCl 0,4 % SDS

SDS-Trenngelpuffer (pH 8,8, 4x)	1,5 M TrisHCl 0,4 % SDS
Semidry-Blotpuffer (pH 8,2 - 8,4)	48 mM Tris 39 mM Glycin 0,0375 % SDS 20 % Methanol
Soerensen-Phosphat-Puffer [67]	2 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 15 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (autoklavieren)
Solution D complete (pH 7,0)	4 M Guanidiniumisothiocyanat 25 mM NaCitrat 5 % Natriumlauroylsarcosin 0,1 M β-Mercaptoethanol
TBE (5x) (pH 8,3)	0,5 M TrisHCl 415 mM Borsäure 10 mM EDTA
TE-Puffer (pH 8,0)	10 mM TrisHCl 1 mM EDTA
Trypanblau-Lösung (pH 4,4)	150 mM NaCl 20 mM Trinatriumcitratdihydrat 2 mg/ml Trypanblau (pH mit gesättigter Citronensäure einstellen, sterilfiltrieren)

Zellysepuffer	20 mM HEPES (pH 7,5) 40 mM MgCl <sub>2</sub> 20 mM KCl 5 % Saccharose (14 mM β-Mercaptoethanol, nach dem Auto- klavieren zugeben)
---------------	--

## 7.6 Antibiotika

Ampicillin	Sigma-Aldrich, München
Blasticidin S	PAA, Österreich
Geneticindisulfat (G418)	PAA, Österreich
Penicillin/Streptomycin	PAA, Österreich

## 7.7 Nährmedien

### 7.7.1 Nährmedien für *E. coli*

LB-Medium [9] (pH 7,0)	10 g Bacto-Trypton 5 g Hefeextrakt 5 g NaCl ddH <sub>2</sub> O ad 1 l
LB <sub>Amp</sub> -Medium	LB-Medium + 50 µg/ml Ampicillin
LB-Agar	LB-Medium + 13 g/l Agar-Agar
LB <sub>Amp</sub> -Agar	LB-Agar + 50 µg/ml Ampicillin

### 7.7.2 Nährmedien für *D. discoideum*

HL5-Medium [120]

(pH 6,7)

2,5 g Bacto-Trypton

2,5 g Pepton aus Casein

5 g Protease-Pepton

5 g Hefeextrakt

10 g D-Glucose

1,2 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$

0,35 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

ddH<sub>2</sub>O ad 1 l

G<sub>0</sub>-Medium

AX-Medium

+ 100 U/ml Penicillin

+ 100 µg/ml Streptomycin

G<sub>10</sub>-Medium

G<sub>0</sub>-Medium

+ 10 µg/ml Geneticin (G418)

SM-Agarplatten [105]

(pH 6,5)

15 g Bacto-Agar

10 g Pepton

10 g D-Glucose

1 g Hefeextrakt

1 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

2,2 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$

1 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$

ddH<sub>2</sub>O ad 1 l

*E. coli* (B/2)-Platten

mit *E. coli* (B/2)-bewachsene SM-Platte

Phosphatagarplatten

(pH 6,0)

15 g Bacto-Agar

Soerensen-Phosphatpuffer ad 1 l

### 7.8 Enzyme

Restriktionsendonukleasen

Fermentas, St. Leon-Rot

<i>Taq</i> -Polymerase (rekombinant)	Abteilung Genetik, Universität Kassel
KOD	Merck, Darmstadt
T4 PNK	Fermentas, St. Leon-Rot
ProteinaseK	Roth, Karlsruhe
FastAP	Fermentas, St. Leon-Rot
T4 Ligase	Fermentas, St. Leon-Rot
RNaseA	Roth, Karlsruhe

## 7.9 Enzypuffer

Puffer Tango (10x)	Fermentas, St. Leon-Rot
Puffer R (10x)	Fermentas, St. Leon-Rot
Puffer G (10x)	Fermentas, St. Leon-Rot
Puffer O (10x)	Fermentas, St. Leon-Rot
Puffer BamHI (10x)	Fermentas, St. Leon-Rot
<i>Taq</i> -Puffer	Fermentas, St. Leon-Rot
KOD-Puffer	Merck, Darmstadt
T4-PNK-Puffer	Fermentas, St. Leon-Rot
Ligasepuffer	Fermentas, St. Leon-Rot

## 7.10 Antikörper

### 7.10.1 Monoklonale Primärantikörper (aus der Maus)

Name	Nummer	Hersteller
$\alpha$ -Comitin	190-340-8	Weiner, 1993 [121]
$\alpha$ -Coronin	176-3D-6	De Hostos, 1991 [30]
$\alpha$ -GFP	264-449-2	Chemicon, Temecula, USA
$\alpha$ -Gp70	130-80-2	Bomblies, 1990 [12]
$\alpha$ -Myc	9E10	Evan, 1985 [35]
$\alpha$ -PDI	221-64-1	Monnat, 1997 [74]
$\alpha$ -Porin	70-100-1	Troll, 1992 [116]

### 7.10.2 Polyklonale Primärantikörper (aus dem Kaninchen)

Name	Nummer	Hersteller
$\alpha$ -Myc	#2272	Cell Signaling Technology, USA
$\alpha$ -GST	sc-459	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg

### 7.10.3 Sekundärantikörper

Bezeichnung	Nummer	Hersteller/Vertrieb
Alkalische Phosphatase gekoppelter Kaninchen- $\alpha$ -Maus IgG	315-055-003	Dianova, Hamburg
Alkalische Phosphatase gekoppelter Ziege- $\alpha$ -Kaninchen IgG	111-055-003	Dianova, Hamburg
Cy3-gekoppelter Kaninchen- $\alpha$ -Maus IgG	315-165-003	Dianova, Hamburg
Cy3-gekoppelter Ziege- $\alpha$ -Kaninchen IgG	111-165-003	Dianova, Hamburg
Oregon Green 488-gekoppelter Ziege- $\alpha$ -Maus IgG	O-6380	Invitrogen, Darmstadt

### 7.11 Fluoreszenzfarbstoffe

AlexaFluor 488-Phalloidin	Invitrogen, Darmstadt
IR- <i>Beads</i> (Fluoresbrite® Carboxylate Microspheres 1.75 $\mu$ m - Ex: 641nm)	Polysciences Europe, Eppelheim
TRITC	Sigma-Aldrich, München

### 7.12 Größenstandards

GeneRuler™ 1kb DNA Ladder	#SM0311	Fermentas, St. Leon-Rot
Prestained Protein Molecular Weight Marker	#SM0441	Fermentas, St. Leon-Rot
PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder	#SM1811	Fermentas, St. Leon-Rot

### 7.13 Bakterienstämme

<i>Escherichia coli</i> - TopTen	Invitrogen, Darmstadt
<i>Escherichia coli</i> - JM109	Leihgabe, Abt. Genetik, Universität Kassel
<i>Escherichia coli</i> - BL21 (DE3)	Promega, Mannheim
<i>Escherichia coli</i> - B/2	Leihgabe, Abt. Genetik, Universität Kassel
<i>Micrococcus luteus</i>	Sigma-Aldrich, München

## 7.14 Hefestämme

*Saccharomyces cerevisiae*

Sigma-Aldrich, München

## 7.15 *Dictyostelium*-Stämme

Wildtyp	AX2	Watts & Ashworth, 1970 [120]
Lysozym- <i>Knockout</i>	AlyA138a	Müller, 2002 [75]

## 7.16 Oligonukleotide

Name	Nr.	Sequenz (5' → 3')
5'-SSD485	#308	CGCATAAGCTTATGGCAAAAGTTTITAGC
3'-SSD485	#309	CGCATTCTAGACTAAAAGACACCTCC
5'-myc SSD485	#310	ATTTTCAGAAGAAGATTTAAATAACTATTACCAAGGTCC
3'-myc SSD485	#311	TAATTTTTTGTTCACTAGAGTCATCAGATCTTGCG
5'-SSD673	#312	CGCATGGTACCATGAAATTTTCATTTAAATC
3'-SSD673	#313	CGCATGGATCCTGGGTAAATACGCAAGC
3'-SSD673+STOP	#355	CGCATGGATCCTTATGGGTAAATACGCAAGC
5'-SSD485 NEU	#410	CGCATGAATTCAAAATGGCAAAAGTTTITAGC
3'-SSD485 NEU	#411	CGCATAAGCTTCTAAAAGACACCTCC
5'-SSD673 NEU	#412	CGCATGAATTCAAAATGAAATTTTCATTTAAATC
3'-myc HindIII	#413	CGCATAAGCTTCTAATTTAAATCTTCTTCTG
Oligo(dT)18	#418	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTT
5'-DD3-3	#557	CAAGTTTAATTATTTTATTAATTATCACC
3'-DD3-3	#558	TTAAACTAATCTCTTGAGACCTGG
5'-SSD673 (oL) BamHI	#563	CGCATGGATCCAACAATCAAGTTACTCCAG
3'-SSD673 STOP+XhoI	#564	CGCATCTCGAGCTATGGGTAAATACGCAAGC
3'-DD3-3 BamHI	#577	CGCATGGATCCAACTAATCTCTTG
3'-DD3-3 myc	#578	TAATTTTTTGTTCACTAGAAAGTCTAGTTTCCATATCGGC
3'-DD3-3 Stop+BamHI	#579	CGCATGGATCCTTAAACTAATCTCTTG
5'-DD3-3 BglII	#580	GCGATAGATCTAAAATGAGATTTTATCAAG
5'-DD3-3 myc	#582	ATTTTCAGAAGAAGATTTAAATAGATTCGCTAGACTTGCC
5'-DD3-3 ClaI LANG	#587	CGCATATCGATAAAAATGAGATTTTATCAAGTTAATTATT TTATTAATTATCACC

## 7.17 Plasmide

### 7.17.1 Plasmide anderer Arbeiten

Die folgenden Vektoren entstammen fremden Arbeiten oder wurden bei kommerziellen Herstellern erworben. Sie wurden in ihrem Ursprungszustand oder zur Herstellung eigener Plasmide verwendet.

Name	Nummer	Konstrukteur/Herkunft
pDex RH	#1	Faix, 1994
A15 gfp w/o ATG	#48	Hanakam, ~1996
pB15	#151	Manstein, 1997
pICmyc	#296	Drengk, 2000
pDex MCS	#362	Pawolleck, 2004
pGEX-4T-3	#754	Leihgabe der Abteilung Biochemie, Universität Kassel

### 7.17.2 Plasmide dieser Arbeit

Folgende Vektoren sind Bestandteil dieser Dissertation und wurden von mir angefertigt.

#### #575 pB15 SSDmyc485

Expressionsvektor für SSDmyc485 (fehlerhaft!) – Die genomische DNA wurde mit Hilfe der KOD-Polymerase und den *Primerpaaren* #308/#311 bzw. #309/#310 amplifiziert. Das Fragment #308/#311 ließ sich im Anschluss mit dem Restriktionsenzym HindIII und das Fragment #309/#310 mit XbaI schneiden. Um beide Fragmente gleichzeitig mit dem Vektor pB15 (#151) ligieren zu können, mussten beide Fragmente vorerst mit der T4-Polynukleotidkinase an ihren 5'-Enden phosphoryliert werden. Der Vektor #575 enthält auf diese Weise kloniert kein Triple-Adenin (AAA) vor dem Startcodon.

#### #579 pB15 SSD485

Expressionsvektor für SSDmyc485 (fehlerhaft!) – Mit Hilfe der *Taq*-Polymerase und den *Primern* #308 und #309 wurde eine PCR auf genomische DNA des Stamms AX2 durchgeführt, das entstandene Fragment danach mit den Enzymen HindIII und XbaI verdaut und in den Vektor pB15 (#151) ligiert. Der Vektor #579 wurde so ohne Triple-Adenin (AAA) vor dem Startcodon kloniert.

### **#590 pB15 SSD673myc**

Expressionsvektor für SSD673myc (fehlerhaft!) – Dieser Vektor entstand aus einer PCR auf genomische DNA mit den *Primern* #312 und #313. Die Fragmente wurden anschließend mit den Restriktionsenzymen Acc65I und BamHI geschnitten, in den auf gleiche Weise behandelten Vektor pIC myc (#296) kloniert, und später über die SacI-Schnittstelle mit dem Vektor pB15 (#151) ligiert. Dieserart kloniert resultiert der Vektor #590 in einem Protein mit SSD673-fremden Aminosäuren am sowohl N- als auch C-Terminus.

### **#592 pB15 SSD673**

Expressionsvektor für SSD673 (fehlerhaft!) – Das Amplifikat einer PCR mit dem *Primerpaar* #312/#355 und der *Taq*-Polymerase wurde mit den Enzymen Acc65I und BamHI verdaut und in den gleich behandelten Vektor pB15 (#151) kloniert. Auf diese Weise enthält das aus dem Vektor #592 resultierende Protein am N-Terminus SSD673-fremde Aminosäuren.

### **#638 pDex RH SSD485**

Expressionsvektor für SSD485 – Mit der KOD-Polymerase wurde mit den *Primern* #410 und #411 eine PCR mit dem Vektor #579 als Template durchgeführt und das resultierende Fragment anschließend über die EcoRI- und HindIII-Schnittstelle in den Vektor pDex RH (#1) kloniert.

### **#639 pDex RH SSDmyc485**

Expressionsvektor für ein intern myc-getaggetes SSD485 – Eine PCR mit der KOD-Polymerase, dem *Primerpaar* #410/#411 und dem Vektor #575 als Template führte zu einem Fragment, welches sich mit EcoRI und HindIII verdauen und anschließend in den Vektor pDex RH (#1) ligieren ließ.

### **#640 pDex MCS SSD673**

Expressionsvektor für SSD673 – Es wurde eine PCR mit der KOD-Polymerase durchgeführt, bei welcher die *Primer* #412 und #355 eingesetzt und der Vektor #592 als Template verwendet wurde. Das entstandene Fragment wurde dann mit den Restriktionsenzymen EcoRI und BamHI geschnitten und über dieselben Schnittstellen in den Vektor pDex MCS (#362) eingefügt.

### **#641 pDex RH SSD673myc**

Expressionsvektor für ein am C-Terminus myc-getaggetes SSD673 – Mit Hilfe einer PCR mit der KOD-Polymerase, der *Primerkombination* #412/#413 und dem Vektor #591 als Template ent-

stand ein Fragment, welches über die Schnittstellen EcoRI und HindIII in den Vektor pDex RH (#1) ligiert werden konnte.

#### **#757 pGEX-4T-3 SSD673 (oL)**

Vektor für die Überexpression von GST-getaggttem SSD673 ohne ER-Leader (oL) in *E. coli* – Das Fragment, welches durch eine PCR mit der KOD-Polymerase auf cDNA des Stammes AX2 und den *Primern* #563 und #564 entstand, wurde mit den Enzymen BamHI und XhoI geschnitten und in den gleich behandelten Vektor pGEX-4T-3 (#754) ligiert.

#### **#782 pDd DD3-3-GFP**

Expressionsvektor für ein am C-Terminus GFP-getaggttes DD3-3 – Das DD3-3-Fragment entstand aus einer PCR mit der KOD-Polymerase und den *Primern* #577 und #580. Dabei diente die cDNA des Stammes AX2 als Template. Obengenanntes Fragment wurde anschließend über die Schnittstellen BglII und BamHI in den Vektor A15 gfp w/o ATG (#48) kloniert.

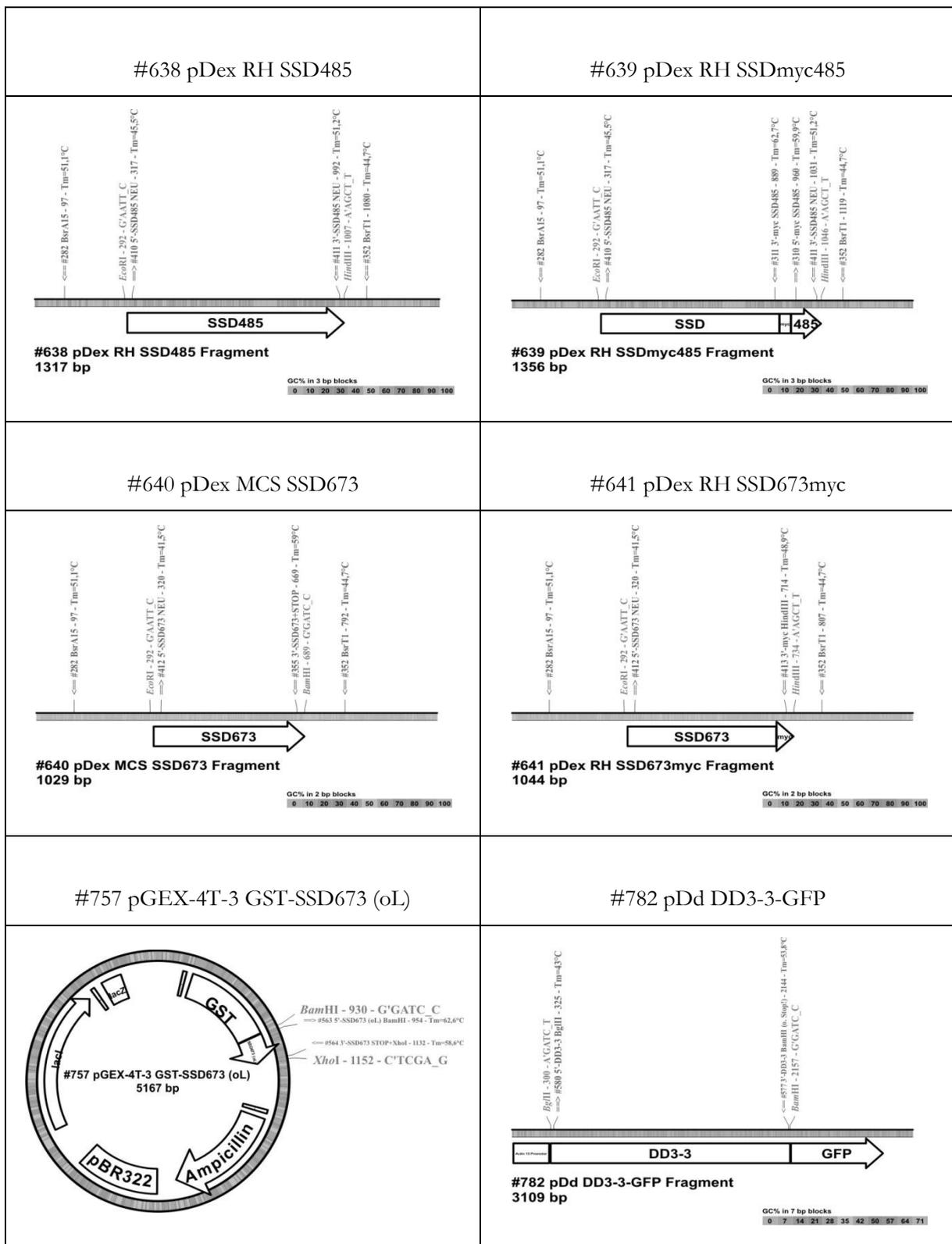
#### **#783 pDex MCS DD3-3**

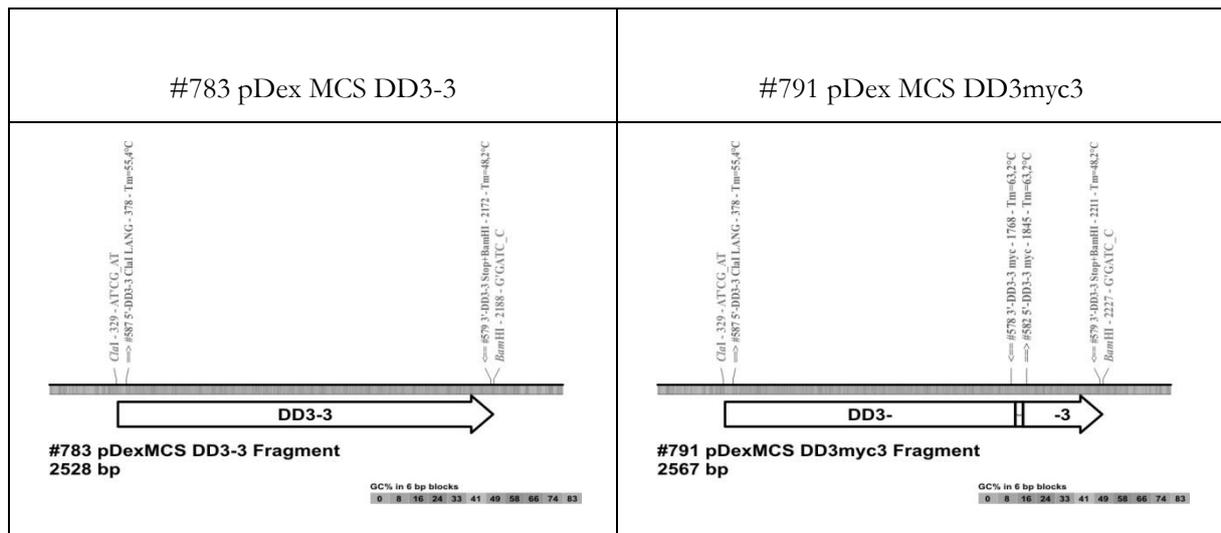
Expressionsvektor für DD3-3 – Das in einer KOD-PCR auf cDNA des Stammes AX2 mit den *Primern* #579 und #587 entstandene Fragment wurde mittels ClaI und BamHI in den Vektor pDex MCS (#362) kloniert.

#### **#791 pDex MCS DD3myc3**

Expressionsvektor für ein intern myc-getaggttes DD3-3 – Mittels einer PCR mit der KOD-Polymerase wurden zwei Fragmente an cDNA des Stammes AX2 amplifiziert. Das *Primerpaar* #578/#587 bildete ein Fragment, welches mit ClaI geschnitten werden konnte, während die *Primer* #579 und #582 ein Fragment amplifizieren, welches eine BamHI-Schnittstelle enthält. Beide Fragmente enthalten eine Hälfte des myc-Tags und wurden zusammen mit dem ClaI- und BamHI-verdauten Vektor pDex MCS (#362) ligiert. Um beide myc-Hälften effektiver *blunt* ligieren zu können, wurden die Fragmente #578/#587 und #579/#582 vorerst mit der T4-Polynukleotidkinase an ihren 5'-Enden phosphoryliert.

### 7.17.3 Plasmidkarten





## 7.18 Datenbanken und Programme

DictyBase	<a href="http://dictybase.org/">http://dictybase.org/</a>
DictyOGlyc 1.1 Server	<a href="http://www.cbs.dtu.dk/services/DictyOGlyc/">http://www.cbs.dtu.dk/services/DictyOGlyc/</a>
Excel 2007, SP2 MSO	Microsoft Office
GPI-SOM	<a href="http://gpi.unibe.ch/">http://gpi.unibe.ch/</a>
ImageJ	<a href="http://rsbweb.nih.gov/ij/">http://rsbweb.nih.gov/ij/</a>
Leica Confocal Software, -Version 2.61	Leica Microsystems Heidelberg GmbH, Mannheim
NetNGlyc 1.0 Server	<a href="http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/">http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/</a>
pDRAW32	<a href="http://www.acaclone.com/">http://www.acaclone.com/</a>
ProtParam	<a href="http://www.expasy.ch/tools/protparam.html">http://www.expasy.ch/tools/protparam.html</a>
PSORT II	<a href="http://psort.hgc.jp/">http://psort.hgc.jp/</a>
TopPred 0.01	<a href="http://mobyle.pasteur.fr/cgi-bin/portal.py?#forms::toppred">http://mobyle.pasteur.fr/cgi-bin/portal.py?#forms::toppred</a>
TranslateTool	<a href="http://www.expasy.ch/tools/dna.html">http://www.expasy.ch/tools/dna.html</a>

## 8 Methoden

Ein Teil der hier beschriebenen Methoden wurde in überarbeiteter Form aus meiner Diplomarbeit übernommen.

### 8.1 Zellbiologische Methoden

#### 8.1.1 Kultivierung von *Escherichia coli*

##### 8.1.1.1 Anzucht von *Escherichia coli*

Die Kultivierung von den in dieser Arbeit verwendeten *E. coli*-Stämmen erfolgt stets schüttelnd (180 rpm) bei 37 °C in LB-Medium. Dem Medium kann bei Bedarf Ampicillin in einer Konzentration von 50 µg/ml zugegeben werden, um die Selektion positiver Transformanten zu ermöglichen. Darüber hinaus ermöglicht die Inkubation von LB<sub>amp</sub>-Agarplatten bei 37 °C in einem Brutschrank die Kultivierung von Einzelkolonien, beispielsweise nach einer Transformation. LB<sub>amp</sub>-Agarplatten können mit und ohne Bakterienbewuchs mehrere Monate bei 4 °C gelagert werden.

##### 8.1.1.2 Herstellung kompetenter *Escherichia coli*-Zellen

Zur Herstellung kompetenter Zellen werden 5 ml LB-Medium mit einer Einzelkolonie eines *E. coli*-Stamms angeimpft und über Nacht unter Schütteln (180 rpm) bei 37 °C inkubiert. Mit 1 ml dieser Kultur werden dann 100 ml LB-Medium angeimpft und unter den oben erwähnten Bedingungen gehalten, bis die Kultur bei einer Wellenlänge von 550 nm eine optische Dichte von 0,3 bis 0,4 erreicht hat. Die Zellen werden in sterile und vorgekühlte 50 ml-Zentrifugenröhrchen überführt und für 10 min auf Eis inkubiert. Es folgt das Pelletieren für 7 min bei 2500 rpm und 4 °C und das Resuspendieren in 10 ml eisgekühltem CaCl<sub>2</sub>-Puffer. Dieser Vorgang wird wiederholt, um im Anschluss daran die Bakterien für weitere 30 min auf Eis zu inkubieren. Die Zellen werden nun für 5 min pelletiert und in 4 ml CaCl<sub>2</sub>-Puffer resuspendiert, um in einem letzten Schritt in 200 µl-Aliquots aufgeteilt zu werden. Diese Aliquots werden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und können bis zu einem Jahr bei -70 °C aufbewahrt werden.

##### 8.1.1.3 Transformation von *Escherichia coli*

Das Einbringen eines Expressionsvektors in kompetente *E. coli*-Zellen (8.1.1.2) dient in erster Linie der Amplifizierung eines Plasmids *in vivo*. Als Ausgangsvektor können hierfür entweder bereits aufgereinigte Plasmide (Retransformation) dienen, die im Anschluss der Transformation mit einer Midi-Plasmidpräparation (8.3.6.2) aus den Bakterienzellen gewonnen werden, oder der

vollständige Ansatz einer Ligation (8.3.5), aus welchem nur die erfolgreich ligierten Plasmide in den *E. coli*-Zellen amplifiziert werden.

Für eine Retransformation werden zu 40 µl kompetenter *E. coli*-Zellen ca. 2 µl Plasmid gegeben und dieser Ansatz für 1 Stunde auf Eis inkubiert. Anschließend wird der Ansatz auf LB<sub>amp</sub>-Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C bebrütet. Bis zum nächsten Tag wachsen zahlreiche Klone auf der Platte, die zum Animpfen von *E. coli*-Kulturen für die Midi-Plasmidpräparation verwendet werden können.

Bei der Transformation im Anschluss an eine Ligation wird der gesamte, meist 20 µl umfassende Ligationsansatz zu 100 µl kompetenter Bakterien gegeben und das Gemisch für mindestens 30 min auf Eis inkubiert. Dann wird das Gemisch in einem 42 °C heißen Wasserbad für 90 sec einem Hitzeschock unterzogen, kurz auf Eis abkühlen gelassen und das Gemisch sodann auf LB<sub>amp</sub>-Agarplatten ausplattiert und bei 37 °C bebrütet.

Bei Ligationen von drei Fragmenten werden die Bakterienzellen vor dem Ausplattieren erst in 1 ml LB-Medium aufgenommen, für bis zu 60 min schüttelnd bei 37 °C bebrütet und anschließend für 3 min bei 4000 rpm in einer Tischzentrifuge geerntet. Der Überstand wird bis auf 200 µl verworfen und die Zellen im selbigen resuspendiert und erst dann auf LB<sub>amp</sub>-Platten ausplattiert.

Am nächsten Tag können die entstandenen Einzelkolonien für eine Mini-Plasmidpräparation (8.3.6.1) weiter verwendet werden.

## **8.1.2 Kultivierung von *Dictyostelium discoideum***

### **8.1.2.1 Anzucht von *Dictyostelium discoideum***

Um aus tiefgefrorenen Sporen frische Zellkulturen zurück zu gewinnen, lässt man ein Aliquot Sporen aus dem - 70 °C-Sporenstock bei RT antauen. Unabhängig von ihrer transformationsbedingten Resistenz legt man 10 ml G<sub>0</sub>-Medium in einer Petrischale (Ø 10 cm) vor, da die Sporen direkt nach dem Austritt aus der Sporenkapsel noch keine Antibiotikaresistenzen ausgebildet haben. Sind die Sporen angetaut, gibt man 100 - 200 µl der Sporensuspension in das vorgelegte Medium und schwenkt die Petrischale sanft, sodass sich die Sporen gut im Medium verteilen. Das angetaute Sporenaliquot wird sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und weiter bei - 70 °C gelagert. Das Keimen und Anwachsen der Sporen wird täglich überprüft und nach 24 bis 48 Stunden erfolgt ein Wechsel auf das entsprechende Selektionsmedium, d.h. das Altmedium wird vorsichtig abgenommen und durch frisches Selektionsmedium ersetzt. Ist der Boden der Petrischale nach 3 bis 4 Tagen gut mit Zellen bedeckt, können die Zellen mit Medium vom Schalenboden abgespült und in einen Kolben überführt werden. Die Petrischale wird erneut mit 10 ml frischem Medium versehen und weiter kultiviert.

Grundsätzlich lässt sich der Laborstamm AX2 aufgrund von Mutationen entgegen dem Freilandstamm in axenischem (bakterienfreien)  $G_0$ -Medium bei 22 °C und Dauerlicht kultivieren. Die Kultivierung kann in 24-Loch-Kulturplatten, in Petrischalen (Ø: 5 cm oder 10 cm) oder in Kolben erfolgen. Kultiviert man *D. discoideum* in Kolben, so werden diese nur bis zu einem Drittel des Volumens gefüllt und bei 150 rpm auf einem Laborschüttler ausreichend mit Sauerstoff versorgt. Im Allgemeinen sollte eine Zellzahl von  $5 \cdot 10^4$  Zellen/ml für Analysen nicht unter- und  $5 \cdot 10^6$  Zellen/ml nicht überschritten werden. Die Generationszeit des Laborstammes AX2 beträgt ca. 8 – 10 h.

#### 8.1.2.2 Transformation von *Dictyostelium discoideum* mittels Elektroporation [49]

Von einer Zellsuspension der Dichte  $1-2 \cdot 10^6$  *D. discoideum*-Zellen/ml werden  $2 \cdot 10^7$  Zellen für 10 min auf Eis inkubiert und anschließend bei 1200 rpm und 4 °C für 3 min geerntet. Um Reste des Mediums zu entfernen, werden die Zellen einmal mit ca. 10 ml vorgekühltem P-Puffer gewaschen. Danach erfolgt eine zweimalige Umpufferung mit ca. 10 ml ebenfalls vorgekühltem EP-Puffer und eine sich anschließende Resuspendierung des Pellets in 700 µl EP-Puffer. Es folgt die Zugabe von 30 - 50 µg unverdaulichem Plasmid. Anschließend wird der Ansatz in eine vorgekühlte EP-Küvette mit einem Elektrodenabstand von 4 mm transferiert. Der Ansatz wird in der Küvette mit EP-Puffer auf 800 µl aufgefüllt, gut gemischt und erneut 10 min auf Eis gestellt.

Die Elektroporation mit dem Gene-Pulser® wird bei einer Spannung von 1 kV, einer Kapazität von 25 µF und ohne externen Widerstand vollzogen. Vor dem Einsetzen der Küvette in das Schiffchen des Gene-Pulsers® müssen die Elektroden der Küvette gut getrocknet werden. Die Zeitkonstante sollte zwischen 2 ms und 3 ms liegen. Nach der Elektroporation wird die Küvette wieder 10 min auf Eis gekühlt.

Während dieser Inkubation werden je 8 µl sterilfiltriertes 0,1 M  $MgCl_2$  und 0,1 M  $CaCl_2$  in eine Petrischale pipettiert und anschließend vorsichtig die Zellen hinzugegeben. Eine 15 minütige Inkubation im Salztropfen gewährt den Zellen bei RT Zeit, sich zu erholen, bevor vorsichtig 10 ml  $G_0$ -Medium hinzu gegeben werden.

Am nächsten Tag wird das  $G_0$ -Medium abgenommen und die Zellen mit dem entsprechenden Selektionsmedium versetzt. Um die toten Zellen zu entfernen, wird alle 2 Tage das Medium vorsichtig abgenommen und durch frisches ersetzt. Nach spätestens zwei Wochen sollten bei erfolgreicher Transformation deutlich Klone auf den Petrischalen zu sehen sein.

### 8.1.2.3 Subklonierung von *Dictyostelium discoideum*

Die Subklonierung dient beispielweise nach einer Transformation (8.1.2.2) der Vereinzelung von Klonen. Zu Beginn werden hierfür 180 µl des *E. coli*-Stammes B/2, aufgenommen in P-Puffer, in drei 1,5 ml-Reaktionsgefäßen vorgelegt. Von der die *Dictyostelium*-Klone enthaltenden Petrischale wird das Medium vollständig abgenommen und die Zellen je nach Anzahl der sichtbaren Klone mit 200 µl - 1 ml P-Puffer von der Petrischale abgespült. Mit der vorgelegten *E. coli*-Suspension werden zwei Verdünnungen (1:100 und 1:1000) der abgespülten Zellen hergestellt und die 200 µl pro Verdünnung auf SM-Agarplatten ausplattiert. Die Platten werden bei 22 °C bebrütet. Da *E. coli*-Zellen des Stammes B/2 eine deutlich kürzere Generationszeit als *D. discoideum* hat, sind nach ca. 3 Tagen Fresshöfe, sogenannte *Plaques*, eines einzelnen *D. discoideum*-Klons im *E. coli*-Rasen zu erkennen. Mit einem sterilen Zahnstocher werden nun die Klone im Fressrand gepickt und in mit 1 ml Selektionsmedium gefüllte 24-Loch-Kulturplatten übernommen und dort anwachsen gelassen. Die Kulturplatten mit den ausgebildeten *Plaques* können bei 4 °C gelagert werden.

### 8.1.2.4 Herstellung von Sporen

Von einer Zellkultur der Zelldichte  $5 \cdot 10^6$  Zellen/ml werden ca.  $1,5 \cdot 10^8$  Zellen durch Zentrifugation bei 1200 rpm und 4 °C für 3 min geerntet. Das Pellet wird zweimal mit 10 ml P-Puffer gewaschen und die Zellen anschließend in 500 µl P-Puffer vorsichtig resuspendiert. Diese Zellsuspension wird mit dem Spatel auf einer Phosphatagarplatte ausplattiert, leicht antrocknen gelassen und anschließend bei 22 °C inkubiert. Da sich die *D. discoideum*-Zellen auf den Phosphatagarplatten in einem Hungerzustand befinden, bilden sie innerhalb von zwei Tagen Fruchtkörper aus. Diese die Sporen enthaltenden Fruchtkörper können geerntet werden, indem man je 1 ml P-Puffer in 1,5 ml-Kryogefäßen vorlegt, die Fruchtkörper mit einer Impföse von der Platte absammelt und sie schließlich in den vorgelegten P-Puffer überführt. Die 1,5 ml-Kryogefäße mit den Sporen werden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und können dann bei -70 °C gelagert werden.

### 8.1.2.5 Herstellung TRITC-markierter Hefezellen

Zur Herstellung TRITC-markierter Hefezellen werden 5 g *Saccharomyces cerevisiae*-Zellen in 50 ml 1 x PBS für 30 min unter Rühren im Wasserbad gekocht. Anschließend werden die Hefen fünfmal mit 1 x PBS und zweimal mit P-Puffer für je 5 min bei  $1250 \times g$  gewaschen. Die Konzentration der Hefen wird auf  $1 \cdot 10^9$  Zellen/ml mit P-Puffer eingestellt und können so bei Bedarf bei -20 °C gelagert werden. Um die Hefen zu markieren, werden  $2 \cdot 10^{10}$  Zellen in 20 ml 50 mM

$\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , pH 9,2 aufgenommen und 2 mg TRITC, gelöst in 200  $\mu\text{l}$  DMSO, zugegeben. Die Suspension wird für 30 min bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Es folgt zweimaliges Waschen mit 50 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , pH 9,2 und viermaliges Waschen mit P-Puffer bei  $1250 \times g$  für je 5 min. Die Konzentration wird mit P-Puffer auf  $1 \cdot 10^9$  Zellen/ml eingestellt und die Suspension aliquotiert. Die TRITC-markierten Hefen können bei -20 °C gelagert werden.

#### 8.1.2.6 Stimulation der Phagozytose von *Dictyostelium discoideum*

Das Phagozytoseverhalten von *Dictyostelium discoideum*-Zellen lässt sich über das Nährmedium beeinflussen. Dabei können dem Medium Substanzen entweder direkt zugesetzt werden oder es wird sogenanntes konditioniertes Medium verwendet, in welchem bereits Zellen kultiviert wurden und das folglich sekretierte Faktoren dieser Zellen enthält.

Sollen dem Medium Substanzen direkt zugesetzt werden, überführt man 14 ml der zu untersuchenden Kulturen in frische Kolben. Die Zelldichte wird dabei so bemessen, dass die Kulturen 2 h später in einem Volumen von 15 ml eine Zelldichte von  $2 \cdot 10^6$  Zellen/ml erreichen. 1 ml der stimulierenden Substanz wird dann, bei Bedarf in Probenpuffer verdünnt, der 14 ml-Kultur zugefügt. Als Kontrolle wird anstelle der Substanz 1 ml Medium zugegeben. So angesetzt werden die Zellen für 2 h bei 22 °C und 120 rpm inkubiert. Haben die Zellen danach eine Zelldichte von  $2 \cdot 10^6$  Zellen/ml erreicht, kann die Phagozytoserate nach den Angaben unter 8.1.2.7 bestimmt werden. Auf eine Proteinmengenbestimmung wird verzichtet, wenn den Kulturen Proteine als Stimulatoren zugesetzt wurden. Die Messergebnisse werden in diesem Fall mit der Zellkonzentration verrechnet.

Für die Stimulation der Phagozytose mittels konditionierten Mediums werden zunächst 33 ml der Kulturen angesetzt, die ihre sekretorischen Faktoren in das Medium abgeben sollen. Diese Kulturen werden mit sterilfiltriertem  $G_0$ -Medium auf eine Zellkonzentration von  $4 \cdot 10^5$  Zellen/ml eingestellt, sodass sie nach 24stündiger Inkubation bei 22 °C und 120 rpm eine Zelldichte von  $2 \cdot 10^6$  Zellen/ml erreichen. Parallel dazu werden Zellen des Stamms AX2 so angesetzt, dass sie am folgenden Tag eine Zelldichte von  $3 \cdot 10^6$  Zellen/ml nicht überschreiten.

Am nächsten Tag werden die Zellen der 33 ml-Kulturen bei 1200 rpm für 5 min in 50 ml-Gefäßen geerntet und das überstehende nun konditionierte Medium in frische 50 ml-Gefäße überführt. Die AX2-Zellen werden ebenfalls 5 min bei 1200 rpm geerntet und das entstehende Pellet mit dem konditionierten Medium auf eine Zellkonzentration von  $1,65 \cdot 10^6$  Zellen/ml in 15 ml Gesamtvolumen eingestellt. Bei einer Kultivierung von 2 Stunden bei 22 °C auf dem Schüttler bei 120 rpm erreichen sie somit eine Dichte von  $2 \cdot 10^6$  Zellen/ml und die Phagozytoserate kann nach 8.1.2.7 bestimmt werden.

### 8.1.2.7 Bestimmung der Phagozytoserate [73]

Für die Bestimmung der Phagozytoserate werden *Dictyostelium*-Zellen in Schüttelkultur mit TRITC-markierten Hefezellen versetzt und die Aufnahme derselben in einem Fluoreszenzspektrometer verfolgt. Um zu verhindern, dass die *D. discoideum*-Zellen sich während dieser Untersuchung am Glaskolben absetzen, wird sie in 25 ml-Kolben durchgeführt, die zuvor silanisiert werden müssen. Hierzu werden unter dem Abzug 15 ml Silanlösung in die Kolben gegeben, diese leicht geschwenkt und für einige Minuten inkubiert. Die Silanlösung wird entfernt und die Kolben mit 100 %igem Ethanol ausgespült. Nachgespült wird mit ddH<sub>2</sub>O und die Kolben schließlich mit fusselfreien Tüchern abgetrocknet. Nach diesem Silanisierungsvorgang können die Kolben bis zu dreimal in einem Phagozytoseexperiment benutzt werden, bevor sie erneut silanisiert werden müssen.

Bei der Bestimmung der Phagozytoserate macht man sich zu Nutze, dass Trypanblau zwar die Fluoreszenz von TRITC überdecken kann, jedoch nicht membrangängig ist. D.h. die *D. discoideum*-Zellen phagozytieren TRITC-markierte Hefezellen, deren Fluoreszenz nach Zugabe von Trypanblau jedoch messbar bleibt, da Trypanblau nur die nicht-phagozytierten, fluoreszierenden Hefen überdecken kann.

Mindestens 24 Stunden vor Durchführung des Experiments werden die Kulturen mit sterilfiltriertem G<sub>0</sub>-Medium auf eine Zellzahl eingestellt, sodass sich zum einen in den Kulturen nicht mehr als 5 µg/ml Geneticin befinden und sie zum anderen am Tag der Durchführung eine Zellzahl von 2·10<sup>6</sup> Zellen/ml haben. Vor der Messung wird die Zellzahl sicherheitshalber mittels Zellzähler kontrolliert, bis die gewünschte Zellzahl erreicht ist. Müssen die Zellen verdünnt werden, sollte dies mindestens 2 Stunden vor Beginn des Experiments geschehen.

Da die TRITC-markierten Hefen zu Verklumpungen neigen, werden ca. 30 min vor Beginn der Messung TRITC-markierte Hefen aufgetaut, gründlich gevortext und ca. 5 - 7 min ins Ultraschallbad gestellt, bevor sie erneut gevortext und bis zum Starten des Versuchs auf einen Schüttler gestellt werden.

Ebenfalls 30 min vor der Messung wird die Quarzküvette im Fluoreszenzspektrometer mit P-Puffer vorgequollen und darauf geachtet, dass das Experiment bei 22 °C durchgeführt werden kann. Dann werden je 100 µl Trypanblaulösung in neun 1,5 ml-Reaktionsgefäße pro Zellstamm vorgelegt und anschließend 10 ml der *D. discoideum*-Kultur mit 2·10<sup>6</sup> Zellen/ml in die silanisierten 25 ml-Kolben überführt. Für die dreifache Bestimmung der Proteinmengen mittels Bicinchoninsäure (8.2.2.1) muss parallel dreimal 1 ml jeder Kultur in 1,5 ml-Reaktionsgefäße überführt und die Zellen bei 4000 rpm für 3 min geerntet werden. Das Pellet wird anschließend

noch einmal in P-Puffer gewaschen, der entstehende Überstand anschließend abgesaugt und das Zellpellet bis zur Proteinmengenbestimmung bei - 20 °C weggefroren.

Die 25 ml-Kolben werden nun bei 150 rpm auf einem Laborschüttler geschwenkt, 120 µl der markierten Hefen zugegeben und sofort 1 ml Kultur entnommen und mit 100 µl Trypanblaulösung versetzt (Zeitpunkt  $t = 0$ ). Die Probe mit Trypanblau wird gevortext und 3 min auf einem Mixer inkubiert. Dann werden die Zellen für 2 min bei 3000 rpm abzentrifugiert und der Überstand vollständig, aber vorsichtig abgesaugt. Das Pellet wird unter Vermeidung von Schaumbildung in 1 ml P-Puffer mit der Pipette vorsichtig gelöst und die Fluoreszenz sofort bei einer Exzitation von 544 nm und einer Emission von 574 nm im Spektrometer gemessen. Es folgt über 2 Stunden alle 15 min die Entnahme und Vermessung weiterer Proben. Dabei ist darauf zu achten, dass die Küvette zwischen jeder Messung mit 1 ml P-Puffer gespült wird. Die Messwerte werden nach Verrechnung mit der im Anschluss bestimmten Proteinmenge der *D. discoideum*-Kulturen graphisch mit Hilfe von Microsoft Excel ausgewertet.

#### 8.1.2.8 Bestimmung der Durchmesser von Freshhöfen auf Bakterienrasen

Die Kultivierung von *Dictyostelium discoideum* auf Bakterien ermöglicht es, die natürlichen Bedingungen frei lebender *Dictyostelium*-Zellen zu imitieren. So kann durch gleichzeitiges Ausplattieren von *D. discoideum* und *E. coli* B/2, die Fähigkeit verschiedener *Dictyostelium*-Stämme, in einem Bakterienrasen Freshhöfe, sogenannte *Plaques* zu bilden, untersucht werden. Da *E. coli* eine geringere Generationszeit als *Dictyostelium discoideum* besitzt, bilden die Bakterien zuerst einen Rasen, bevor sich einzelne *Dictyostelium*-Zellen mehrfach geteilt haben und sichtbare Höfe in diesen Rasen fresen können. In bakterienarmen Bereichen werden zusätzlich *Dictyostelium*-typische Fruchtkörper ausgebildet.

Um später ca. 15 *Plaques* auf Agarplatten vermessen zu können, werden 20 µl einer Schüttelkultur der Dichte  $2 \cdot 10^6$  Zellen/ml in 1 ml P-Puffer und ein weiteres Mal 1:50 ebenfalls in 1 ml P-Puffer verdünnt. Von der letzten Verdünnung werden anschließend 50 µl auf 450 µl *E. coli* B/2-Suspension gegeben, gut vermischt und vom Ansatz je 200 µl auf zwei SM-Agarplatten ausplattiert. Bebrütet man die Platten für die folgenden Tage bei 22 °C, werden nach ungefähr zwei Tagen ca. 15 kleine *Plaques* pro Platte sichtbar. Von mindestens 10 *Plaques* pro Zellstamm werden am dritten und vierten Tag nach dem Ausplattieren die Durchmesser mit einer Schieblehre ermittelt und die Daten im Vergleich zu wildtypischen Zellen mit Microsoft Excel ausgewertet.

### 8.1.2.9 Herstellung einer *Clearing Plate*

Bei einer *Clearing Plate* handelt es sich, ähnlich der Bestimmung der Fresshofdurchmesser (8.1.2.8), um ein gemeinsames Ausplattieren von *Dictyostelium*-Zellen mit Bakterienzellen. Allerdings werden hier  $8 \cdot 10^4$  *Dictyostelium*-Zellen aus einer Kultur der Dichte von  $1 - 2 \cdot 10^6$  Zellen/ml zusammen mit 200  $\mu$ l einer Suspension von *E. coli* B/2 pro SM-Platte ausplattiert, sodass nach drei Tagen die Platte von Fresshöfen übersät ist (*clearing*). Somit bleiben kaum Bakterien auf den Platten zurück und *Dictyostelium* hat innerhalb der Fresshöfe möglichst noch keine Sporen gebildet. In diesem Stadium werden die Platten mit 1 ml P-Puffer abgespült und dieser Milliliter anschließend auf 10 ml 20 %igem PEG pipettiert. Eine Zentrifugation von 10 min bei 4 °C und  $1000 \times g$  ermöglicht die Trennung der übrig gebliebenen Bakterien von den *Dictyostelium*-Zellen. Letztere werden dann zweimal mit P-Puffer gewaschen (10 min,  $800 \times g$ , 4 °C). Da in dieser Arbeit mit der *Clearing Plate* die Proteinexpression auf Bakterienrasen untersucht werden soll, wird das *Dictyostelium*-Zellpellet dann in 500  $\mu$ l 2 x Laemmli-puffer aufgenommen, für 10 min bei 95 °C aufgekocht und 50  $\mu$ l davon in einer SDS-PAGE (8.2.3) eingesetzt.

### 8.1.2.10 Photometrische Bestimmung der Lysozymaktivität

Die photometrische Bestimmung der Lysozymaktivität beruht auf dem Abbau von Bakterienzellwänden durch das in Gesamtzelllysaten vorhandene Lysozym. Dieser Abbau kann bei einer OD von 450 nm gemessen werden. Dafür werden 15 ml einer axenischen *Dictyostelium discoideum*-Kultur mit einer Dichte von  $5 \cdot 10^6$  Zellen/ml bei 1200 rpm und 4 °C für 3 min geerntet und das nun aus  $7,5 \cdot 10^7$  Zellen bestehende Pellet zweimal mit P-Puffer gewaschen. Nach dem zweiten Waschschrift werden die pelletierten Zellen in 800  $\mu$ l 10 mM Natriumacetat (pH 4,5) vorsichtig resuspendiert und in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Dieses wird dreimal in Folge in Flüssigstickstoff schockgefroren und jeweils dazwischen auf Eis aufgetaut. Um die Proteine von Zelltrümmern zu befreien, erfolgt eine Zentrifugation von 1 h bei 4 °C und 13000 rpm in einer Tischzentrifuge. Damit sich die Zelltrümmer nicht erneut mit dem Überstand vermischen, wird letzterer in ein frisches 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und damit ab diesem Zeitpunkt stets auf Eis gearbeitet.

Um die Spaltung der Bakterienzellwände verfolgen zu können, muss vorerst eine Lösung von 0,3 mg/ml lyophilisierter *Micrococcus luteus*-Zellen in 100 mM Natriumphosphatpuffer (pH 4,5) hergestellt werden. Von dieser werden im Anschluss 500  $\mu$ l zusammen mit 500  $\mu$ l 10 mM Natriumacetat (pH 4,5) als Referenz bei 450 nm in einer Plastikkuvette vermessen. Von den zu untersuchenden Zelllysaten werden ebenfalls 500  $\mu$ l mit 500  $\mu$ l Bakterienlösung vermischt und die

optische Dichte sofort bei 450 nm über 5 min alle 60 sec bestimmt. Zwischen den einzelnen Messungen muss die Probe gut gemischt werden, um ein Absetzen der Bakterien zu verhindern. Eine Vergleichbarkeit der Proben untereinander erhält man mit Hilfe einer Proteinmengenbestimmung mittels BCA (8.2.2.1). Erfahrungsgemäß ist es sinnvoll, die Proteinproben vorerst 1:5 in 10 mM Natriumacetat zu verdünnen.

Die Lyserate ergibt sich schließlich als linear abnehmende Änderung der Absorption über die Zeit.

## **8.2 Proteinbiochemie**

### **8.2.1 Isolation von Proteinen**

#### **8.2.1.1 Isolation von Gesamtproteinen aus *Dictyostelium discoideum***

Die Isolation von Gesamtprotein aus *Dictyostelium discoideum* dient bevorzugt der Auftrennung der isolierten Proteine mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (8.2.3). Dafür werden  $2 \cdot 10^6$  Zellen einer Flüssigkultur in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und durch eine dreiminütige Zentrifugation bei 4000 rpm in einer Tischzentrifuge vom Medium befreit. Der Überstand wird vorsichtig abgenommen und verworfen, sodass das Zellpellet in 50 µl 2 x Laemmlipuffer aufgenommen werden kann. Um das Pellet zu lösen, wird die Probe kurz gevortext und darauf zur Denaturierung der Proteine für 10 min bei 95 °C aufgeköcht. Am Deckel des Reaktionsgefäßes kondensiertes Wasser wird im Anschluss kurz runter zentrifugiert. Will man statt einem Pellet eine Flüssigkeit analysieren, wird der Probe vor dem Aufkochen 10 x Laemmlipuffer so zugefügt, dass er im Endvolumen ebenfalls 2fach vorliegt. Die Probe kann so bei -20 °C gelagert werden und bei Bedarf in einer SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese analysiert werden.

#### **8.2.1.2 Bakterielle Überexpression und Isolation von GST-markierten Proteinen**

Um Glutathion-S-Transferase-markierte (GST-markierte) Proteine von Bakterien im Überschuss exprimieren zu lassen und sie anschließend über eine Chromatographiesäule aufzureinigen, werden 12 ml LB<sub>amp</sub>-Medium mit einem Klon, der eine Überexpression des Zielproteins in Vorversuchen bereits zeigte, über einen Zahnstocher angeimpft und die Kultur über Nacht bei 37 °C und 180 rpm bebrütet.

Am nächsten Tag wird die 12 ml-Vorkultur in einen 500 ml-Kolben überführt und mit LB<sub>amp</sub>-Medium auf ein Gesamtvolumen von 120 ml aufgefüllt. Diese Hauptkultur wird anschließend bei 37 °C und 180 rpm geschüttelt und die optische Dichte bei einer Absorption von 600 nm (OD<sub>600</sub>) stets beobachtet. Bei einer OD<sub>600</sub> von 0,8 wird die Expression des Zielproteins durch Zugabe von 300 µl einer 200 mM IPTG-Lösung (Endkonzentration 500 µM) induziert und die

Kultur bei nun 22 °C und 180 rpm schütteln gelassen. Nach 3 h werden die Zellen aus der Kultur bei 4 °C und 4000  $\times g$  für 15 min geerntet, der Überstand danach abgenommen und das Pellet bei -20 °C weggefroren.

Am Tag der Aufreinigung wird das Zellpellet auf Eis aufgetaut und in 9 ml 1 x PBS resuspendiert. Um die Bakterienzellen einfacher lysieren zu können, werden außerdem 10 mg Lysozym gelöst in 1 ml ddH<sub>2</sub>O (Endkonzentration: 1 mg/ml) zur Zellsuspension hinzu gegeben und diese so für 30 min auf Eis stehen gelassen. Dann werden die Zellen mittels neunmaligen Sonifizierens für jeweils 10 s bei 80 % Amplitude und einem Zyklus von 0,8 aufgeschlossen, was an der abnehmenden Trübung der Lösung sichtbar wird. Dabei sind die Pausen zwischen den Sonifizierphasen so zu wählen, dass sich die Probe nicht erwärmt.

Um die freigewordenen Proteine von Zelltrümmern zu isolieren, wird die Suspension im Anschluss bei 10000  $\times g$  und 4 °C für 30 min zentrifugiert. Der das Zielprotein beinhaltende Überstand wird in Folge in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und stets auf Eis gelagert. Alle folgenden Schritte erfolgen zum Schutz des Zielproteins bei 4 °C.

Für die Aufreinigung eines GST-markierten Proteins werden 300  $\mu$ l Glutathion gekoppelter Agarosekügelchen in eine Chromatographie-Säule gegeben und gewartet, bis der wässrige Anteil der Suspension durch die Säule getropft ist und die Agarosekügelchen sich abgesetzt haben. Dann wird die Säule mit 10 ml 1 x PBS equilibriert, bevor die Säule am unteren Ende mit einem Deckel verschlossen wird. Der gesamte Überstand mit dem Zielprotein wird dann auf die Säule gegeben und diese auch am oberen Ende mit einem Deckel gut verschlossen. Die Säule rotiert nun auf einem Rad bei 4 °C für 30 min, um das GST-markierte Zielprotein möglichst effektiv an das Glutathion der Agarosekügelchen binden zu lassen. Im Anschluss wird die Säule oben und unten wieder geöffnet und die Lösung mit den ungebundenen Proteinen durchtropfen gelassen. Nachgespült wird dann dreimal mit 5 ml 1 x PBS. Um das gebundene GST-markierte Protein schließlich von den Agarosekügelchen zu lösen, wird die Säule wieder unten verschlossen und es werden 300  $\mu$ l Elutionspuffer mit 10 mM Glutathion (pH 8,0) auf die Säule gegeben. Damit wird die Agarose leicht aufgespült, bevor die 300  $\mu$ l nach Öffnen der Säule in einem 1,5 ml-Reaktionsgefäß aufgefangen werden. Dieser Vorgang wird insgesamt dreimal durchgeführt. In einem letzten Schritt werden dann 2 ml des Elutionspuffers mit Glutathion auf die Säule gegeben und ebenfalls, aber in zweimal 1 ml-Fractionen in einem 1,5 ml-Reaktionsgefäß aufgefangen.

Während dieser Durchführung wird von jeder Fraktion, die die Säule durchlaufen hat, eine Proteinprobe nach 8.2.1.1 gezogen, um diese in einer SDS-PAGE (siehe 8.2.3) auf das Vorhandensein des Zielproteins zu untersuchen. Bis das Ergebnis der SDS-PAGE vorliegt, werden die Proteinproben auf Eis bei 4 °C gelagert, um dann in Flüssigstickstoff schockgefroren und anschließend bei -20 °C, bzw. -70 °C aufbewahrt zu werden.

Die Säuberung der Säule wird strikt nach Herstellerangaben durchgeführt.

## **8.2.2 Bestimmung von Proteinmengen**

### **8.2.2.1 Proteinmengenbestimmung mittels Bicinchoninsäure (BCA)**

Die Proteinmengenbestimmung mittels Bicinchoninsäure dient im Rahmen dieser Arbeit der Ermittlung der Differenzen der Gesamtproteinmengen zwischen vermessenen Stämmen bei der Bestimmung der Phagozytoserate (8.1.2.6) oder der Lysozymaktivität (8.1.2.9). Für die Bestimmung der Phagozytoserate wird das bereits mit P-Puffer gesäuberte Zellpellet der *D. discoideum*-Kultur in 300 µl P-Puffer resuspendiert. Um die Zellen zu lysieren, werden sie dreimal im Wechsel in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei 37 °C wieder aufgetaut. Nach einer einstündigen Zentrifugation bei 14000 rpm und 4 °C werden 50 µl des Überstands entsprechend Herstellerangaben in einer 1 ml-Küvette photometrisch bei einer Wellenlänge von 562 nm vermessen. Als Referenz dient in diesem Fall P-Puffer.

Wird die Gesamtproteinmenge im Falle der Lysozymaktivitätsbestimmung ermittelt, werden direkt aus dem dort entstehenden Zellysate 50 µl pro Zellstamm ebenfalls nach Herstellerangaben vermessen.

### **8.2.2.2 Proteinmengenbestimmung nach Bradford [14]**

Um die Proteinmenge einer Lösung nach Bradford zu bestimmen, wird gemäß den Herstellerangaben die zu messende Probe in 5 ml gefilterter 1 x Bradford-Lösung verdünnt, gut vermischt und für 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wird die Absorption der Probe in einer Halbmikro-Einmalküvette bei 595 nm vermessen. Als Referenz dient der verwendete Probenpuffer.

Liegen die photometrisch ermittelten Werte oberhalb von 1, so muss die Probe stärker in 1 x Bradford-Lösung verdünnt werden, da der lineare Zusammenhang zwischen µg Protein und  $OD_{595nm}$  in diesem Bereich nicht mehr gegeben ist.

## **8.2.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Mittels einer SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese können Proteine anhand ihrer Masse in einem diskontinuierlichen PAA-Gel aufgetrennt werden. Ein SDS-Gel besteht aus einem engporigen Trenngel und einem grobporigen Sammelgel. Das Sammelgel dient zum Sammeln der Proteine, damit diese auf gleicher Höhe in das Trenngel übergehen können. Während das Sammelgel für alle in dieser Arbeit verwendeten Anwendungen 3,4% Acrylamid enthält, kann das Trenngel in seinem Auftrennungsvermögen den zu untersuchenden Proteingrößen angepasst werden. Für die

Auftrennung von Proteinen mit einem Molekulargewicht zwischen 30 kDa und 120 kDa eignen sich 10 %ige Gele, während für deutlich kleinere Proteine (10 – 60 kDa) 15 %ige Gele genutzt werden. Um ein 10 %iges bzw. 15 %iges Polyacrylamidgel herzustellen, werden die in Tabelle 2 beschriebenen Substanzen in den angegebenen Mengen vermischt, wobei TEMED und APS erst direkt vor dem Gießen des Gels dazu gegeben werden, da sie die Kettenreaktion zur Polymerisierung des PAAs auslösen.

**Tabelle 2: Komponenten für die SDS-PAGE**

<b>Trenngel:</b>	<b>10%</b>	<b>15%</b>	<b>Sammelgel:</b>	<b>3,4%</b>
<b>ddH<sub>2</sub>O</b>	8,3 ml	5 ml	<b>ddH<sub>2</sub>O</b>	6,9 ml
<b>Trenngel-Puffer</b>	5,4 ml	5,4 ml	<b>Sammelgel-Puffer</b>	2,7 ml
<b>Acrylamid (30%)</b>	7,3 ml	10,6 ml	<b>Acrylamid (30%)</b>	1,2 ml
<b>TEMED</b>	5,4 µl	5,4 µl	<b>TEMED</b>	5,3 µl
<b>20 %iges APS</b>	240 µl	240 µl	<b>20 %iges APS</b>	160 µl

Bevor das Gel gegossen werden kann, müssen pro Gel je zwei Glasplatten mit Seife und 100 %igem EtOH von Partikeln und Fett befreit werden. Anschließend werden die Glasplatten mit *Spacern* auf Abstand und mittels Klammern fest gehalten. Zwischenräume werden mit 0,2 %iger Agarose, gelöst in 1 x TBE, abgedichtet. Das noch unpolymertierte Trenngel wird zuerst zwischen die Glasplatten gegossen. Um Blasenbildung der Acrylamid-Mischung zu verhindern, wird das Trenngel während es auspolymerisiert mit Isobutanol überschichtet. Ist das Trenngel fest, wird nach Entfernen des Isobutanols das Sammelgel zwischen die Glasplatten gegossen und ein Kamm zur Aussparung der Geltaschen zwischen den Platten platziert. Ist auch das Sammelgel auspolymerisiert, können die Gele bei 4 °C in feuchte Tücher eingewickelt einige Tage aufbewahrt werden.

Um nun Proteine in den Gelen aufzutrennen, wird der untere *Spacer* entfernt und die Gele werden mit Klammern an der Gelapparatur befestigt. Die obere und untere Schale der Apparatur werden mit 1 x PAA-Laufpuffer gefüllt, der Kamm entfernt und die Taschen mit 1 x PAA-Laufpuffer ausgespült. Um eine gleichmäßige Auftrennung der Proteine zu gewährleisten, ist darauf zu achten, dass sich in der unteren Schale keine Luftblasen zwischen Laufpuffer und Trenngel befinden. Nach dem Einfügen der Proteine in die Geltaschen werden sie bei 130 V im Gel gesammelt. Sobald die Lauffront die Grenze zum Trenngel erreicht hat, werden die Proteine bei 200 V bis zum gewünschten Auftrennungsgrad separiert.

#### 8.2.4 Coomassiefärbung

Bei der Coomassiefärbung handelt es sich um eine Färbemethode, mit der sich aufgetrennte Proteine in einem PAA-Gel unspezifisch anfärben lassen. Durch die Interaktion des Farbstoffes Brilliantblau R-250 mit den basischen Seitenketten der Aminosäuren können die Proteine im Gel sichtbar gemacht werden. Hierzu wird das mit aufgetrennten Proteinen beladene Gel über Nacht in Coomassiefärbelösung bei RT schwenkend inkubiert und die Lösung am nächsten Tag vom Gel entfernt. Damit sich das Gel entfärben kann und schließlich nur die Proteine den blauen Farbton beibehalten, muss das Gel anschließend mehrfach mit lauwarmem Leitungswasser gespült werden. Um die dann sichtbaren Proteinbanden analysieren zu können, eignet sich die Ansicht des Gels auf einem Leuchttisch.

#### 8.2.5 Westernblot

Über einen Westernblot können die in einer SDS-PAGE aufgetrennten Proteine vom Gel auf eine Trägermembran übertragen werden und anschließend mittels Antikörpern auf der Membran nachgewiesen werden.

Für einen Westernblot wird das Gel mit den umgebenden Glasplatten aus der Apparatur ausgebaut und anschließend eine der Platten vorsichtig vom Gel abgelöst. Auf der zweiten Platte kann das Gel mit Hilfe der *Spacer* zugeschnitten werden, indem das Sammelgel, die Ränder neben den Geltaschen und der untere Agarosestreifen entfernt werden.

Für den Blot werden vier Lagen Filterpapier 3MM und eine Nitrocellulose-Membran pro Gel auf die Größe des Gels zugeschnitten. Filterpapier, Membran und SDS-Gel werden in Semidry-Puffer getränkt und nacheinander in folgender Reihenfolge vom Plus- zum Minuspol in die Blotkammer gelegt: 2 Lagen Filterpapier – Membran – SDS-Gel – 2 Lagen Filterpapier. Luftblasen zwischen den Schichten werden durch Walzen mit einer Glaspipette entfernt.

In der Biometra FastBlot-Apparatur werden die Proteine für 30 min bei 5 mA/cm<sup>2</sup> Gelfläche auf die Membran transferiert und können anschließend mit Hilfe von Antikörpern wie unter 8.2.6 beschrieben spezifisch nachgewiesen werden.

#### 8.2.6 Immundetektion

Mittels Westernblot auf eine Membran transferierte Proteine können durch eine Immundetektion mit spezifischen Antikörpern auf der Membran nachgewiesen werden. Ist der Blotvorgang abgeschlossen, wird die Membran zunächst 2 x für 5 min in 1 x PBS gewaschen und anschließend für 30 min in 2 – 5 % igem Milchpulver in 1 x PBS auf dem Taumler inkubiert, um freie Proteinbin-

destellen auf der Membran abzusättigen. Um diese Blockierlösung vor Bakterienbefall zu schützen, wird zusätzlich eine Spatelspitze Natriumazid in die Lösung gegeben.

Nach Blockierung freier Proteinbindestellen wird die Membran mit einem gegen das gewünschte Protein gerichteten Primärantikörper in einer 1 : 5-Verdünnung oder entsprechend Herstellerangaben mit Blockierlösung versetzt und über Nacht auf dem Taumler bei RT oder um stärkere Signale zu erhalten bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Morgen wird die Membran zur Entfernung des Primärantikörpers erneut 3 x für 5 min mit 1 x PBS gewaschen. Im Anschluss wird die Membran mit dem 1 : 5000 in Blockierlösung verdünnten Sekundärantikörper taumelnd für 2 bis 3 Stunden bei RT oder ebenfalls bei 4 °C inkubiert. Dieser Sekundärantikörper ist gegen den Primärantikörper gerichtet und trägt zusätzlich eine alkalische Phosphatase, um später eine Farb-reaktion auf der Membran auszulösen. Entfernt wird der Sekundärantikörper nach Inkubation durch dreimaliges Waschen mit 1 x PBS. Damit die alkalische Phosphatase ihr Substrat BCIP in einen bläulich-violetten Niederschlag umsetzen kann, muss die Membran zuvor durch fünfminütiges Schwenken in Carbonatpuffer in ein basisches Milieu überführt werden. Bei einem pH-Wert von nun 10,2 kann durch Zugabe von 60 µl NBT und 112,5 µl BCIP in 30 ml Carbonatpuffer die alkalische Phosphatase das BCIP zu einem Zwischenprodukt hydrolysieren, welches in Anwesenheit von NBT dimerisiert. Die Dimerisierung führt zu einem violetten Präzipitat, welches die Position des Proteins markiert. Fällt der Farbniederschlag sehr intensiv aus, kann auf Zugabe des NBTs verzichtet werden, da es sich hierbei um einen Verstärker der Farb-reaktion handelt. In Folge dessen erscheint das Präzipitat bläulich. Um in beiden Fällen jedoch ein Verschmieren der Banden zu verhindern, sollte der Blot während der Reaktion nicht bewegt werden. Zum Stoppen der Präzipitation wird die Reaktionslösung durch ddH<sub>2</sub>O ersetzt und die Membran anschließend an der Luft getrocknet.

### **8.3 Molekularbiologische Methoden**

#### **8.3.1 Polymerasekettenreaktion (PCR)**

Die Polymerasekettenreaktion ermöglicht es, beliebige DNA-Abschnitte zu vervielfältigen (amplifizieren), sodass sie sich mit herkömmlichen Nachweisreaktionen detektieren lassen. Diese Methode der Synthese erfordert kurze DNA-Fragmente, sogenannte *Primer*, die mit flankierenden Sequenzen des doppelsträngigen DNA-Abschnitts hybridisieren können. Hierfür werden synthetisch hergestellte Oligonukleotide eingesetzt. Zusätzlich werden neben einem angemessenen Puffer und Magnesium ausreichend dNTPs und eine hitzebeständige Polymerase benötigt.

Die eigentliche Reaktion wird durch ein zyklisches Erhitzen und Abkühlen der Komponenten gelenkt und besteht aus drei grundlegenden Schritten: Denaturierung – *Annealing* – Elongation.

Da in dieser Arbeit zu analytischen Zwecken vorwiegend die Polymerase des thermophilen Bakteriums *Thermophilus aquaticus* (*Taq*-Polymerase) verwendet wurde, soll die Kettenreaktion beispielhaft für diese Polymerase erklärt werden. Der erste Schritt wird durch Erhitzen des Ansatzes auf 95 °C eingeleitet, um die DNA zu denaturieren und die Einzelstränge den *Primern* zugänglich zu machen. Es folgt eine Abkühlung der Reaktionskomponenten auf eine Temperatur, die die Hybridisierung der *Primer* mit je einem der DNA-Einzelstränge ermöglicht (*Annealing*). Sie ist abhängig von Länge und Sequenz der *Primer* und kann berechnet und experimentell verifiziert werden. Um die *Primer* von der Polymerase verlängern zu lassen (Elongation), wird der Ansatz auf die für die *Taq*-Polymerase optimierte Temperatur von 68 °C erhitzt. Die Polymerase kann nun die *Primer* an freien 3'-OH-Enden anhand der komplementären Matrize und unter Verwendung von dNTPs elongieren. Die drei Schritte der PCR werden in ca. 20 bis 30 Zyklen wiederholt, wodurch der gewünschte DNA-Abschnitt amplifiziert wird.

Die in dieser Arbeit verwendeten 20 µl-Reaktionsansätze setzen sich wie in Tabelle 3 aufgelistet zusammen.

**Tabelle 3: Komponenten für eine PCR mit der *Taq*-Polymerase**

4 - 7 µl		gDNA oder
1,5 µl		cDNA
2 µl	10 x	PCR-Puffer (ohne MgCl <sub>2</sub> )
2 µl	10 pM	<i>Primer</i> 1
2 µl	10 pM	<i>Primer</i> 2
2 µl	20 mM	MgCl <sub>2</sub>
2 µl	2 mM each	dNTPs
1 µl		<i>Taq</i> -Polymerase
x µl		ddH <sub>2</sub> O

Beim folgenden PCR-Programm (siehe Tabelle 4) handelt es sich um das in dieser Arbeit verwendete Standardprogramm, welches jedoch für andere *Primer*kombinationen oder andere PCR-Produkte variiert werden muss. Bei der *Taq*-Polymerase wird davon ausgegangen, dass sie ca. 1 kb pro Minute synthetisiert, sodass hier beispielhaft eine Elongationszeit von 1 min gewählt wurde.

**Tabelle 4: Standardprogramm für eine PCR mit der *Taq*-Polymerase**

1 x	Schritt 1:	3 min	95 °C
20 - 30 x	Schritt 2:	30 sec	95 °C
		30 sec	x °C
		1 min	68 °C
1 x	Schritt 3:	5 min	68 °C
	Schritt 4:	halten	4 °C

Zusätzlich zur *Taq*-Polymerase wurde im Rahmen dieser Arbeit die Polymerase des thermophilen Archaeons *Thermococcus kodakaraensis*, die sogenannte KOD-Polymerase, verwendet. Durch ihre deutlich geringere Fehlerrate als die der *Taq*-Polymerase eignet sie sich besonders gut für Klonierungen zur Herstellung von Vektoren, die einer Überexpression von Genen dienen. Dabei wurde stets den Anweisungen des Herstellers gefolgt.

### 8.3.2 Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese ist eine Methode, mit der sich DNA-Fragmente der Größe nach in einem Agarosegel auftrennen lassen. Die Agarose wird dazu im gewünschten Prozentsatz (w/v) abgewogen und in 1 x TBE-Puffer aufgeköcht. Der Prozentsatz der Agarose richtet sich dabei nach der Größe der aufzutrennenden DNA-Fragmente. Hierbei gilt: je größer die aufzutrennenden Fragmente sind, desto geringer ist die Konzentration des Agarosegels zu wählen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden ausschließlich 1 % ige Agarosegele verwendet. Um die aufgetrennten DNA-Fragmente unter UV-Licht sichtbar zu machen, wird der aufgeköchten Agaroselösung Ethidiumbromid in einer Konzentration von 5 µl/500 ml Agaroselösung zugeführt. Ethidiumbromid hat die Eigenschaft in doppelsträngige DNA zu interkalieren und nach Bindung der DNA eine starke Fluoreszenz unter UV-Licht (336 nm) zu zeigen und so die DNA sichtbar zu machen. Die aufgeköchte Agarose wird nun in die einen Kamm für die Taschenaussparungen enthaltende Gelkammer gegossen. Ist die Agarose erstarrt, wird das Gel mit 1 x TBE überschichtet und anschließend der Gelkamm entfernt. Beladen wird das Gel mit 4 µl DNA-Größenstandard und mit in 6 x DNA-Auftragspuffer (Endkonzentration: 1 x) aufgenommenener DNA-Probe. Da DNA negativ geladen ist und das Verhältnis von Masse zu Ladung konstant ist, können so die DNA-Fragmente bei einer angelegten Spannung von 10 V/cm Gellänge im Agarosegel ihrer Größe nach aufgetrennt werden.

### 8.3.3 Aufreinigung von DNA-Fragmenten

Um DNA-Fragmente in Enzymreaktionen mit Restriktionsendonukleasen oder Ligasen einsetzen zu können, bedarf es vorher einer Befreiung der Fragmente von Enzymresten, Pufferrückständen oder anderer DNA-Fragmente vorangegangener Reaktionen. Hierfür wurden folgende kommerziell erhältliche Kits verwendet: das NucleoSpin® Extract II – PCR clean-up & Gel extraction Kit, das QIAquick PCR Purification Kit und das QIAquick Gel Extraction Kit. Dabei wurden stets die Angaben der Hersteller befolgt und die DNA-Fragmente immer mit 30 µl des mitgelieferten Elutionspuffers eluiert.

### 8.3.4 Phosphorylierung von PCR-Produkten

Werden wie in dieser Arbeit ausschließlich am 5'-Ende dephosphorylierte *Primer* verwendet und im Anschluss die resultierenden PCR-Produkte ohne den Einsatz von Restriktionsendonukleasen direkt mit ihren glatten Enden ligiert, bietet es sich an, die 5'-Enden der Oligonukleotide vorerst mittels der T4-Polynukleotidkinase zu phosphorylieren und somit die Ligation effektiver zu machen. Dazu wurden 15 µl eines aufgereinigten PCR-Ansatzes in einem Gesamtvolumen von 30 µl mit 2 µl der T4-Polynukleotidkinase nach Herstellerangaben behandelt und anschließend mit einem PCR-Aufreinigungskit bearbeitet.

### 8.3.5 Ligation von DNA-Fragmenten

Eine Ligation von DNA-Fragmenten wird meist in einem 20 µl-Ansatz vollzogen, wobei für 100 ng DNA stets 5 U der Ligase Verwendung finden. Die Mengenverhältnisse des Vektors zum *Insert* werden dabei mindestens 1:3 gewählt und für Ligationen mit einem zweigeteilten *Insert* sogar 1:6 (Vektor einfach, *Inserts* jeweils sechsfach). Für Ligationen der letztgenannten Art wurde ebenfalls PEG4000 zugegeben. Alle weiteren Bestandteile des Ligationsansatzes wurden gemäß Herstellerangaben zugefügt und der Ansatz schließlich für 1 Stunde bei 22 °C oder auch bei 4 °C über Nacht inkubiert.

### 8.3.6 Plasmidpräparationen

#### 8.3.6.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* im kleinen Maßstab (Minipräparation) [10]

Werden aus analytischen Zwecken nur geringe Mengen an Plasmid-DNA aus *E. coli*-Zellen benötigt, so wird am Vorabend mit einem Zahnstocher eine Kolonie der gewünschten *E. coli*-Kultur in 1 ml LB<sub>Amp</sub>-Medium in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß gepickt. Zur besseren Belüftung der Kultur wird der Deckel des Reaktionsgefäßes mit einem Loch versehen. Anschließend wird die Kultur

schüttelnd bei 190 rpm über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag werden die Zellen durch eine dreiminütige Zentrifugation bei 4000 rpm in einer Tischzentrifuge vom Medium getrennt. Das daraus entstandene Pellet wird im Anschluss durch vortexen in 200 µl Puffer 1 resuspendiert. Um die Zellen zu lysieren, werden zusätzlich 200 µl des Puffers 2 hinzu gegeben und der Inhalt des Reaktionsgefäßes durch vorsichtiges Invertieren vermischt. Diesem Schritt schließt sich eine Inkubation der Lösung für 5 min bei RT an. Um die Plasmid-DNA der *E. coli*-Zellen von der chromosomalen DNA, denaturierten Proteinen und Zellfragmenten zu befreien, müssen 200 µl des Puffers 3 hinzu gegeben und vermischt werden. Diese Lösung wird nun erneut, allerdings diesmal für 5 min auf Eis inkubiert, bevor durch eine Zentrifugation bei 13000 rpm in einer Tischzentrifuge der Überstand von den pelletierten Zelltrümmern getrennt werden kann. Der Überstand wird in ein sauberes 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt, damit die Plasmid-DNA danach mit Hilfe der Zugabe von 420 µl Isopropanol bei 13000 rpm, 4 °C für 20 min gefällt werden kann. Hiernach müssen die überschüssigen Salze durch Addition von 300 µl EtOH (70 %) bei 13000 rpm und 4 °C für 10 min von der Plasmid-DNA entfernt werden. Diesem Schritt folgt das Trocknen der DNA in einer Vakuumzentrifuge für 5 min bei maximal 45 °C. Im Nachhinein wird die DNA in 30 µl ddH<sub>2</sub>O resuspendiert und, um den Lösungsvorgang zu beschleunigen, für 10 min bei 60 °C schüttelnd (300 rpm) inkubiert. Hiervon werden für einen analytischen Restriktionsverdau schließlich 10 µl eingesetzt.

Diese Form der Plasmid-DNA-Isolierung ist allerdings ungeeignet, wenn die präparierten Plasmide sequenziert werden sollen. Da für Auftragssequenzierungen die DNA-Proben sehr sauber sein müssen, bietet sich hierfür das NucleoSpin® Plasmid QuickPure Plasmid DNA Purification-Kit an. Es wird hierbei nach Herstellerangaben gearbeitet.

### 8.3.6.2 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* im großen Maßstab (Midipräparation)

Um Plasmide aus *E. coli*-Zellen im Midi-Maßstab zu isolieren, werden am Abend vor der Isolierung 100 ml LB<sub>amp</sub>-Medium in einem Schikaneerlenmeyerkolben mit *E. coli*-Zellen angeimpft. Dazu wird eine *E. coli*-Kolonie von einer LB<sub>amp</sub>-Agarplatte über eine sterile Pinzette mit einem Zahnstocher gepickt und in den mit LB<sub>amp</sub>-Medium vorgelegten Kolben übertragen. Nach einer Inkubation über Nacht bei 37 °C auf einem Schüttler (190 rpm) werden die Plasmide am Folgetag nach Anleitung mit dem PureLink™ HiPure Plasmid DNA Purification Kit (Invitrogen) aus den Zellen isoliert. Da hier jedoch mit einem größeren Zellkulturvolumen gearbeitet wird, als vom Hersteller vorgesehen, werden von dem *Resuspension Buffer* (R3), *Lysis Buffer* (L3) und dem *Precipitation Buffer* (N3) jeweils die doppelten Volumina eingesetzt.

Nach dem Trocknen in einer Vakuumzentrifuge, wird das Plasmidpellet in 200 µl H<sub>2</sub>O (*HPLC Gradient Grade*) resuspendiert und für mindestens 10 min bei 300 rpm und 60 °C auf dem Schüttler gelöst. Danach wird das gelöste Pellet in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß übertragen und die Plasmidkonzentration der Lösung photometrisch bestimmt. Da die Plasmidlösung für die Messung im Photometer mit 1 x TE-Puffer verdünnt wird, gilt dieser Puffer als Referenz.

### 8.3.7 Spaltung von DNA mittels Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen sind bakterielle Enzyme, die doppelsträngige DNA an spezifischen Stellen spalten können. Dies macht man sich zu Nutze, um isolierte Plasmide auf ihre Richtigkeit zu überprüfen (analytischer Restriktionsverdau) oder sie für eine Ligation mit DNA-Fragmenten (siehe 8.3.5) zu linearisieren (präparativer Restriktionsverdau).

Ein analytischer Restriktionsverdau einer Minipräparation findet in 20 µl Volumen statt und enthält neben 10 µl der isolierten Plasmid-DNA meist 3 U der gewählten Enzyme. Für einen präparativen Restriktionsverdau werden meist 2 µg DNA in 20 µl Volumen eingesetzt. Alle weiteren Bestandteile werden entsprechend Herstellerempfehlung eingesetzt.

Die Spaltung der DNA erfolgt für 2 Stunden bei optimaler Aktivitätstemperatur der Enzyme. Die Vollständigkeit der Reaktion kann anschließend mittels Agarosegelelektrophorese (8.3.2) überprüft und bei Bedarf die benötigten Fragmente nach 8.3.3 aufgereinigt werden.

### 8.3.8 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten

Bei einer Ligation eines Vektors mit einem anderen DNA-Fragment, ergibt sich immer das Problem, dass der Vektor statt mit dem DNA-Fragment auch mit sich selbst ligieren kann. Um diese Möglichkeit effizient zu reduzieren, bietet es sich an, die gespaltene Vektor-DNA zusätzlich an ihren 5'-Enden mit Hilfe einer Phosphatase zu dephosphorylieren. Dem Vektor fehlen nun jegliche Phosphatreste der 5'-Enden, welche das *Insert* in den Ligationsbereichen wenigstens für einen der DNA-Einzelstränge selbst zur Verfügung stellt. Dadurch wird eine Ligation zwischen Vektor und *Insert* favorisiert. Die hier verwendete FastAP kann, aufgrund ihrer hohen Aktivität in allen Restriktionspuffern, direkt 30 min vor Ablauf der Inkubationszeit dem Restriktionsverdau zugesetzt werden. Die Menge wird dabei den Empfehlungen des Herstellers folgend der verdauten DNA-Menge angepasst.

### 8.3.9 Isolation von genomischer DNA aus *Dictyostelium discoideum*

#### 8.3.9.1 Maxipräparation

Genomische DNA im großen Maßstab kann aus *Dictyostelium discoideum* aus einer 50 ml-Schüttelkultur gewonnen werden. Dazu werden  $2,5 \cdot 10^8$  Zellen bei 1200 rpm und 4 °C für 3 min geerntet und anschließend in eiskaltem P-Puffer gewaschen, bevor das entstandene Zellpellet in 45 ml Zellysepuffer zuzüglich 5 ml 10 %igem NP40 durch vortexen resuspendiert wird. Die Lösung sollte hierbei aufgrund der Lyse der Zellen transparent werden. Im Anschluss werden die nach diesem Schritt noch intakten Zellkerne für 15 min bei 4000 rpm und 4 °C abzentrifugiert, der Überstand verworfen und die Kerne in 5 ml 0,7 %igem SDS in 1 x TE-Puffer gelöst. Nach Zugabe von Proteinase K in einer Endkonzentration von 480 µg/ml werden die Kerne für 1 h bei 65 °C ebenfalls lysiert. Um die DNA dann aus der Lösung isolieren zu können, werden 5 ml Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol im Mischungsverhältnis 25:24:1 zugegeben und das Gemisch für 30 min getaumelt. Dabei sammelt sich die DNA in der wässrigen Phase an, die von der Verunreinigungen enthaltenden phenolischen Phase durch eine Zentrifugation bei 8500 rpm für 10 min bei RT getrennt werden kann. Zwischen beiden Phasen bildet sich dabei eine Interphase, in welcher sich denaturierte Proteine anreichern. Die DNA wird durch Überführung der oberen Phase in ein sauberes 15 ml-Reaktionsgefäß isoliert und die Phenolextraktion wiederholt. Nach dem zweiten Durchgang kann die DNA durch Addition von 2 Volumen 100 %igem EtOH und 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat mit anschließender Inkubation von 30 min auf Eis aus der Lösung abgeschieden werden. Die gefällte DNA wird bei  $10000 \times g$  für 30 min und 4 °C gesammelt und danach in 2 Volumen 70 %igem EtOH aufgenommen. Damit das DNA-Pellet in einer Vakuumzentrifuge für ungefähr 10 min getrocknet werden kann, muss der 70 %ige EtOH vorerst in einer Zentrifuge bei  $10000 \times g$  für 10 min entfernt werden. Nach dem Trocknen der DNA wird diese mit 100 µl ddH<sub>2</sub>O versetzt und, um den Lösungsvorgang zu unterstützen, für 10 min bei 65 °C inkubiert. Da genomische DNA eine hochmolekulare und damit recht instabile Struktur aufweist, ist an dieser Stelle unbedingt auf mechanische Beanspruchung der DNA durch schütteln, auf- und abpipettieren etc. zu verzichten.

#### 8.3.9.2 Kurzprotokoll [20]

Dieses Kurzprotokoll zur Isolation von DNA aus *Dictyostelium discoideum* dient in dieser Arbeit vorwiegend dem Nachweis von erhöhten Integrationsraten von Überexpressionsvektoren in das *D. discoideum*-Genom im Vergleich zu wildtypischen Zellen. Dazu wird 1 ml einer Zellkultur bei 4000 rpm für 1 min in einer Tischzentrifuge rotiert und im Anschluss die sich nun im Pellet befindenden Zellen in 100 µl LyB-Puffer und 2 µl Proteinase K (5 µg/ml Ausgangskonzentration)

resuspendiert. Die Lyse der Zellen und ebenfalls der Kerne wird durch kurzes vortexen beschleunigt und eine Inkubation für 5 min bei RT angeschlossen. Die Proteinase K wird darauf für 10 min bei 95 °C inaktiviert, sodass 4 µl des Gemisches direkt in einer Polymerasekettenreaktion untersucht werden können.

### 8.3.10 RNA-Isolation aus *Dictyostelium discoideum*

Für die Isolation von Gesamt-RNA aus *Dictyostelium discoideum* werden  $1,5 \cdot 10^7$  Zellen einer Schüttelkultur entnommen und diese für 3 min bei 1200 rpm geerntet. Um überschüssiges Medium von den Zellen zu entfernen, muss im Anschluss das entstandene Zellpellet einmal mit P-Puffer gewaschen werden, bevor es in 500 µl *Solution D complete* aufgenommen wird. Damit das Pellet vollständig in der Lösung resuspendiert und die Zellen in der Lösung lysiert werden können, erfolgt ein kurzes Vortexen und im Anschluss die Überführung des Gemischs in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß.

Da sich auf der menschlichen Haut zahlreiche RNasen befinden und diese die frisch isolierte RNA sogleich wieder zerstören können, werden die folgenden Schritte stets mit Handschuhen und auf Eis oder bei 4 °C durchgeführt, um die RNasen dadurch zu hemmen.

Zur Isolierung der RNA werden zur Lösung im 1,5 ml-Reaktionsgefäß 50 µl 3 M Natriumacetat (pH 4,7) hinzu gegeben, durch vorsichtiges Drehen des Gefäßes die Probe vermischt und dem Ansatz danach 500 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol im Mischungsverhältnis 25:24:1 zugefügt. Um die Separation der RNA aus der Lösung zu gewährleisten, wird der Ansatz für mindestens 1 h, besser über Nacht bei -20 °C inkubiert.

Am nächsten Tag können durch eine 10minütige Zentrifugation in einer Tischzentrifuge bei 13000 rpm und 4 °C drei Phasen voneinander getrennt werden, bei denen die untere phenolische Phase organische Verunreinigungen und die mittlere Interphase denaturierte Proteine beinhaltet. Darüber bildet sich eine wässrige Phase. Diese enthält die RNA und wird vorsichtig, ohne Rückstände der Interphase, in ein frisches 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Empfohlen wird an dieser Stelle die Wiederholung des Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Schritts, allerdings reicht hierbei eine Inkubation für 15 min auf Eis aus.

Wurde die wässrige Phase erneut in ein sauberes 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt, schließt sich die Fällung der RNA aus der wässrigen Phase durch Zugabe von 1 Volumen vorgekühltem Isopropanol an. Um die Fällung effizient durchzuführen, bietet sich eine Inkubation von 1 h bei -20 °C an. Die RNA kann dann mittels Zentrifugation von 30 min, 13000 rpm und 4 °C am Gefäßboden gesammelt werden.

Soll die RNA zu einem späteren Zeitpunkt als Vorlage für eine cDNA-Synthese dienen, ist es ratsam, hier einen optionalen Schritt einzufügen, der die Trennung von hochmolekularer RNA, darunter auch mRNA, von kleiner RNA oder von DNA ermöglicht. Dafür wird das RNA-Pellet in einer Lösung bestehend aus DEPC-ddH<sub>2</sub>O und 8 M LiCl im Verhältnis 1:1 resuspendiert und erneut über Nacht bei -20 °C gelagert.

Wird am nächsten Tag die RNA wieder für 30 min bei 4 °C und 13000 rpm von der Flüssigkeit getrennt, kann anschließend das nun vor allem mRNA enthaltende Pellet mit 300 µl DEPC-ddH<sub>2</sub>O zuzüglich 750 µl 100 %igem EtOH und 30 µl 8 M LiCl versetzt werden, um die RNA zu waschen. Es schließt sich hier eine 10minütige Zentrifugation bei den zuletzt genannten Bedingungen an. Der entstandene Überstand wird verworfen und das Pellet bevorzugt mit offenem Reaktionsgefäßdeckel auf Eis oder bei maximal 30 °C in einer Vakuumzentrifuge getrocknet. Nachdem die pelletierte und trockene RNA in DEPC-ddH<sub>2</sub>O gelöst wurde, können bei einer Wellenlänge von 260 nm die optische Dichte und darüber die RNA-Konzentration in der Lösung bestimmt werden.

### **8.3.11 Herstellung DNA-freier RNA**

Da in dieser Arbeit eine RNA-Isolation stets Ausgangspunkt für eine cDNA-Synthese (8.3.12) ist, die im Anschluss in einer Polymerasekettenreaktion eingesetzt wird, ist es wichtig, die eventuell bei einer RNA-Isolation mit aufgereinigte DNA vorher zu zerstören. Unterlässt man diesen Schritt, kann das bei der späteren Amplifizierung auch zur Vervielfältigung von DNA-Fragmenten und so zu verfälschten Ergebnissen führen.

Für die Entfernung von DNA aus der RNA-Lösung wurde immer die RNase-freie DNase I der Firma Fermentas verwendet und strikt nach Herstellerangaben vorgegangen. Der dortigen Empfehlung, einen RNase-Inhibitor im Ansatz mit einzubeziehen, wurde stets Folge geleistet.

### **8.3.12 cDNA-Synthese**

Die Synthese von cDNA aus RNA wird im Allgemeinen durch die Verwendung einer reversen Transkriptase ermöglicht. Dabei handelt es sich um eine RNA-abhängige DNA-Polymerase, die ursprünglich aus Viren gewonnen wurde und aus RNA DNA synthetisieren kann. Bei der hier verwendeten RevertAid™ H Minus Reverse Transcriptase des Herstellers Fermentas handelt es sich um eine genetisch modifizierte reverse Transkriptase des Moloney Murinen Leukämievirus. Um die cDNA zu synthetisieren wird strikt den Angaben des Herstellers gefolgt. Es ist jedoch anzumerken, dass als Ausgangs-RNA die nach 8.3.10 und anschließend nach 8.3.11 mit DNase verdaute RNA dient. Davon werden 400 ng in die Reaktion eingesetzt und 100 pmol des

Oligo(dT)<sub>18</sub>-Primers (#418) zugefügt. Der optionale Schritt für Sekundärstrukturen bildende RNA wird ebenfalls nach Herstellerangaben durchgeführt. Die synthetisierte cDNA kann so anschließend direkt in einer Polymerasekettenreaktion (8.3.1) eingesetzt werden.

## 8.4 Mikroskopische Methoden

### 8.4.1 Fluoreszenzmikroskopie lebender Zellen

*Dictyostelium discoideum*-Zellen können mit einem Transgen transformiert werden, welches in der Synthese eines fluoreszierenden Proteins resultiert, beispielsweise dem *Green Fluorescent Protein* (GFP). Das GFP-markierte Protein kann daher neben einer indirekten Markierung über Antikörper auch in lebenden Zellen beobachtet werden.

Dafür werden 200 µl einer axenischen Kultur auf ein Deckgläschen pipettiert und die Zellen in diesem Tropfen für 20 min stehen gelassen, um sich auf dem Deckglas absetzen zu können. Anschließend wird das Medium über den Zellen abgesaugt und durch 200 µl P-Puffer ersetzt. Dieser Vorgang wird wiederholt, bevor die Zellen in P-Puffer unter dem konventionellen Fluoreszenzmikroskop untersucht werden können.

### 8.4.2 Fixierung von Zellen mittels Paraformaldehyd

Bevor die Fixierung von Zellen mit Paraformaldehyd durchgeführt werden kann, bedarf es einiger Vorbereitungen. Zum einen müssen runde Deckgläschen zuvor 1 h in 3,7 %igem HCl eingelegt werden, bevor sie mit ddH<sub>2</sub>O gewaschen und anschließend mit möglichst fusselfreien Tüchern getrocknet werden können. Zum anderen muss die eigentliche Fixierlösung frisch hergestellt werden. Dazu werden 0,2 g Paraformaldehyd abgewogen, zu 3,5 ml ddH<sub>2</sub>O gegeben und auf idealerweise 40 °C, aber zum Schutz der Aldehydgruppen auf höchstens 50 °C erhitzt. Damit sich das Paraformaldehyd lösen kann, werden maximal 3 Tropfen NaOH hinzu titriert. Ist in der Lösung kein weißer Feststoff mehr erkennbar, können 5 ml 20 mM PIPES-Puffer und 1,5 ml gesättigte Pikrinsäure zugegeben werden. Dieses Gemisch wird mit 3,7 %igem HCl auf einen pH-Wert von 6 eingestellt und dieser mittels Indikatorstäbchen kontrolliert. Rutscht der pH-Wert dabei unter 6, darf höchstens einmal zurück titriert werden, ansonsten muss die Fixierlösung erneut hergestellt werden. Bis zum Gebrauch wird das Fixativ abgedeckt und dunkel gelagert.

Die Fixierung von *Dictyostelium*-Zellen gelingt am besten, wenn von einer Zellkultur der Zelldichte 1 - 2 · 10<sup>6</sup> Zellen/ml ausgegangen wird. Davon werden 300 µl auf die oben beschriebenen HCl-gereinigten Deckgläschen gegeben und den Zellen für mindestens 30 min bei 22°C Zeit gegeben, sich auf den Deckgläschen abzusetzen. Die Deckgläschen befinden sich dabei in einer mit einem lichtdurchlässigen Deckel ausgestatteten feuchten Kammer, um ein Austrocknen der Präparate zu

verhindern. Anschließend wird das Medium über den nun abgesetzten Zellen vorsichtig abgenommen und durch 200 µl des Fixativs ersetzt. Ebenfalls ersetzt wird an dieser Stelle der lichtdurchlässige Deckel durch einen lichtundurchlässigen. Eine halbe Stunde später muss das Fixativ abgenommen und die Deckgläschen zur Reinigung einmal in 10 mM PIPES-Puffer, pH 6,0 und unverzüglich einmal in PBS/Glycin getaucht werden. Nach Zurücklegen der Deckgläschen in die feuchte Kammer werden sie sogleich mit 300 µl PBS/Glycin überschichtet. Diesem Vorgehen schließt sich ein fünfminütiger Waschschrift der Zellen mit ebenfalls PBS/Glycin an, bevor die Zellen mit 250 µl 70 %igem EtOH für 10 min einer Nachfixierung unterzogen werden. Entfernt wird der EtOH dann durch zweimaliges Waschen der Zellen auf den Deckgläschen mit PBS/Glycin für jeweils 5 min. Wird das zu analysierende Protein durch Fusion an ein fluoreszierendes Protein exprimiert, können die Präparate an dieser Stelle bereits wie am Ende unter 8.4.4 beschrieben eingebettet werden. Sollen in den Zellen Zielproteine mittels Antikörper nachgewiesen und letztlich angefärbt werden, handelt es sich um eine indirekte Immunfluoreszenz und es wird weiter wie unter 8.4.4 beschrieben verfahren.

### **8.4.3 Fixierung von Zellen mittels Methanol**

Um Zellen mit Methanol zu fixieren wird ihnen wie unter 8.4.2 beschrieben 30 min Zeit gegeben, um sich auf den Deckgläschen abzusetzen. Dann wird das Medium abgesaugt und die Gläschen in einer Halterung bei -20 °C in eiskaltem Methanol inkubiert. Nach 20 min werden sie in der Halterung übergangsweise in ein Glas mit 1 x PBS gestellt. Jedes Deckgläschen wird im Anschluss der Halterung entnommen, zurück in die feuchte Kammer gelegt und mit 1 x PBS überschichtet. Diesem Schritt schließen sich zwei fünfminütige Waschschriffe mit ebenfalls 1 x PBS an. Die darauf folgenden Schritte entsprechen dem Blockieren der freien Bindestellen mittels PBG wie es unter 8.4.4 beschrieben ist.

### **8.4.4 Indirekte Immunfluoreszenz**

Bei der indirekten Immunfluoreszenz handelt es sich um eine Methode, bei der die Zielproteine nicht mittels Fusion mit einem fluoreszierenden Protein in der Zelle sichtbar gemacht werden können, wohl aber über ein Antikörperpaar. Dabei erkennt ein Primärantikörper das Zielprotein und ein Sekundärantikörper wiederum den Primärantikörper. Der Sekundärantikörper markiert über die an ihn gekoppelte Fluoreszenz so die Position des Zielproteins in der Zelle.

Um nun die für die Antikörper unspezifischen Bindestellen der fixierten Zellen zu blockieren, werden die Präparate zweimal für 15 min mit PBG gewaschen. Bevor die Deckgläschen mit dem Primärantikörper inkubiert werden können, muss dieser entweder als Kulturüberstand der Hyb-

ridomazellen oder als aufgereinigter Antikörper nach Herstellerangaben für 3 min bei  $10000 \times g$  zentrifugiert werden. Auf diese Weise werden denaturierte Antikörper pelletiert und es können vom Überstand  $200 \mu\text{l}$  pro Deckgläschen auf die Zellen gegeben und über Nacht bei RT oder  $4^\circ\text{C}$  in der feuchten Kammer inkubiert werden.

Am nächsten Tag lässt sich der Primärantikörper durch sechsmaliges Waschen mit PBG von den Zellen entfernen. Durch Zugabe von  $200 \mu\text{l}$  des 1:1000 in PBG verdünnten aufgereinigten Sekundärantikörpers, vorher ebenfalls zentrifugiert, kann dieser für 2 h bei RT an den Primärantikörper binden. Der Sekundärantikörper kann dann gleichermaßen zweimal mit PBG für 5 min von den Deckgläschen beseitigt werden, bevor sich diesen Schritten dreimaliges Waschen der Gläschen mit 1 x PBS anschließt.

Um die Präparate haltbar zu machen, wird jedes Deckglas kurz in  $\text{ddH}_2\text{O}$  eingetaucht und mit den Zellen in einen Tropfen Einbettmedium (siehe 8.4.5) gelegt. Dieses kann bei  $4^\circ\text{C}$  aushärten und die Präparate bei selbiger Temperatur bis zur Untersuchung mittels Fluoreszenzmikroskops im Dunkeln gelagert werden.

#### **8.4.5 Herstellung von Einbettmedium**

Für die Herstellung des Einbettmediums werden 10 ml einer  $0,1 \text{ M KH}_2\text{PO}_4$ -Lösung mit Hilfe einer  $0,1 \text{ M Na}_2\text{HPO}_4$ -Lösung auf einen pH-Wert von 7,2 eingestellt, um im Anschluss die eingestellte Lösung 1:10 mit  $\text{ddH}_2\text{O}$  zu verdünnen. 20 g Polyvinylalkohol werden dann zugegeben und über Nacht in der verdünnten Lösung gelöst. Am nächsten Tag werden 40 ml Glycerin ebenfalls über Nacht mit dem Ansatz vermischt und am Tag darauf, nach einer Zentrifugation von 15 min bei 12000 rpm, der Überstand abgenommen und mit  $25 \mu\text{g/ml}$  DABCO, einem Antibleichmittel, versetzt. In Spritzen abgefüllte Aliquots des fertigen Einbettmediums können so bei  $-20^\circ\text{C}$  gelagert werden.

#### **8.4.6 Untersuchung und Dokumentation von fluoreszenzmarkierten Zellen**

Im Rahmen dieser Arbeit wurden fluoreszenzmarkierte Zellen sowohl mit einem herkömmlichen Fluoreszenzmikroskop beobachtet, als auch mit einem konfokalen *Laser-Scanning*-Mikroskop (CLSM). In beiden Fällen wurde mit  $100 \times$  Ölimmersionsobjektiven gearbeitet. Für Übersichtsaufnahmen wurde am herkömmlichen Fluoreszenzmikroskop zusätzlich mit einem  $20 \times$  Objektiv gearbeitet.

Die Fluoreszenz von GFP, Oregon Green 488 im konventionellen Mikroskop wurde stets mit blauem Licht angeregt, während diese Farbstoffe im CLSM auf die Anregung des Ar-Lasers (488 nm) ansprachen. Der Cy3-Farbstoff fluoreszierte im konventionellen Mikroskop bei grünem

Licht und im CLSM durch die Anregung mit dem HeNe-Laser (543 nm). Die verfütterten im Infrarotbereich sichtbaren *Beads* wurden im CLSM über den HeNe-Laser (633 nm) sichtbar gemacht. Die Überlagerung der Bildpaare wurde mit Hilfe der Software Leica Confocal Software LCS Lite durchgeführt.

## 9 Ergebnisse

### 9.1 DD3-3 (DDB0231683, EST: VSI664)

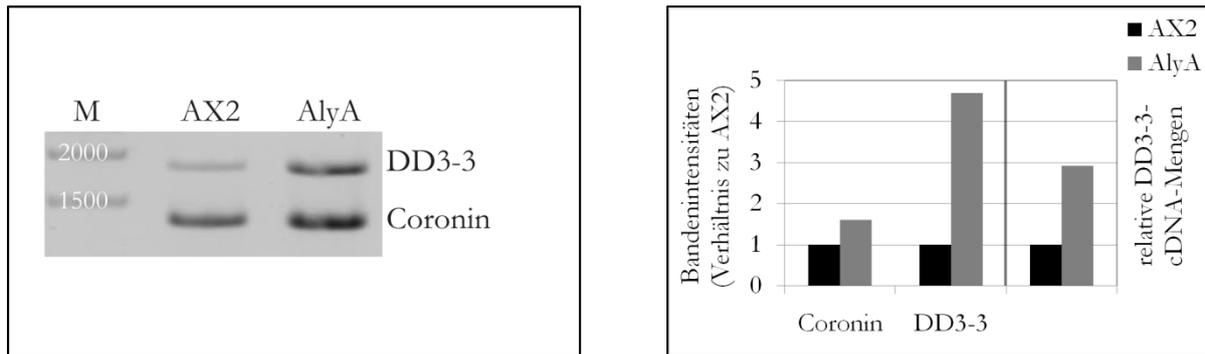
Die einleitend bereits beschriebenen *Microarray*-Analysen von I. Müller dienten dem Expressionsvergleich von Genen zwischen der *AlyA-Knockout*-Mutante und Gp70-überexprimierenden Zellen. Alle drei in dieser Arbeit untersuchten Gene zeigten sich in den *Microarrays* als hochreguliert in den *AlyA*-Mutanten, nicht jedoch in den Gp70-Überexprimierern. So auch das Gen für das Protein DDB0231683. Dieses wurde in den *AlyA-Knockout*-Zellen um das 1,7fache stärker exprimiert, als in den wildtypischen Vergleichszellen. Damit ist DDB0231683 ein guter Kandidat, die Phagozytose in *Dictyostelium discoideum* positiv zu regulieren und eine Komponente im Signalweg zwischen dem Lysozym *AlyA* und der Esterase Gp70 zu bilden.

Bei dem Protein DDB0231683 handelt es sich um ein aus 616 Aminosäuren bestehendes Protein mit einem Molekulargewicht von ca. 69,5 kDa. Das Gen für dieses Protein ist auf Chromosom 4 von *Dictyostelium discoideum* lokalisiert und setzt sich aus 1851 bp zusammen. Da DDB0231683 keine Introns enthält, ergibt sich für die codierende DNA-Sequenz die gleiche Länge.

Sakuragi *et al.* [99] konnten bereits 2005 anhand eines *mRNA Differential Displays* zeigen, dass die mRNA-Expression von DDB0231683 in Mutanten, welche eine fehlerhafte O-Glykosylierung aufwiesen, reduziert war. Sie konnten die volle Länge der cDNA isolieren und gaben dem Gen den Namen DD3-3.

Die Sequenz des DD3-3-Proteins zeigt keine Homologien zu bekannten Proteindomänen, wohl aber eine Signalsequenz für das Endoplasmatische Retikulum (ER) am N-Terminus. Darüber hinaus kann C-terminal gelegen eine Transmembrandomäne lokalisiert werden, die DD3-3 zu den Membranproteinen des Typs I gehören lässt.

Auf den von I. Müller durchgeführten *Microarrays* konnte die erhöhte Expression von DD3-3 in den *AlyA-Knockout*-Zellen anhand der Bindung von DD3-3-cDNA an das EST VSI664 nachgewiesen werden. Demzufolge muss auch über eine PCR mit vorangegangener reverser Transkription der RNA die erhöhte Expression in den *AlyA-Knockout*-Zellen nachweisbar sein. Abbildung 6 zeigt die Ergebnisse einer *Multiplex*-PCR auf die Gesamt-cDNA von Wildtypzellen und *AlyA-Knockout*-Zellen.

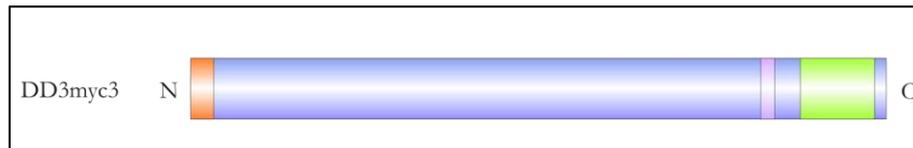


**Abbildung 6: Verhältnisse der mRNA-Expression von DD3-3 und Coronin in wildtypischen Zellen und AlyA-Knockout-Mutanten anhand einer RT-PCR. Links:** In einem Agarosegel aufgetrennte Amplifikate einer PCR auf die Gesamt-cDNA des Wildtyps (AX2) und der Lysozymmutante (AlyA) mit den Primern #557/#558 für DD3-3 und #75/#76 für Coronin. Zuvor wurde die RNA nach 8.3.10 aus wildtypischen Zellen und aus AlyA-Knockout-Zellen isoliert und im Anschluss die genomische DNA nach 8.3.11 zerstört. Die Gesamt-cDNA wurde mit dem Oligo-dT-Primer (#418) und der reversen Transkriptase erstellt (M=1 kb-Marker, Werte in bp). **Rechts:** Graphische Darstellung der Bandenintensitäten des Agarosegels (links) mit Hilfe des Programms ImageJ. Nach Normalisierung der Intensitäten auf die Kontrollbande (Coronin) zeigen die AlyA-Knockout-Zellen eine dreifach erhöhte Menge an DD3-3-cDNA.

In den AlyA-Knockout-Zellen ist auch über eine RT-PCR die erhöhte mRNA-Menge von DD3-3 indirekt nachweisbar. Die Lysozymmutante zeigt dabei im Vergleich zu wildtypischen Zellen nach Auswertung mit dem Programm ImageJ eine dreifach erhöhte Expression von DD3-3.

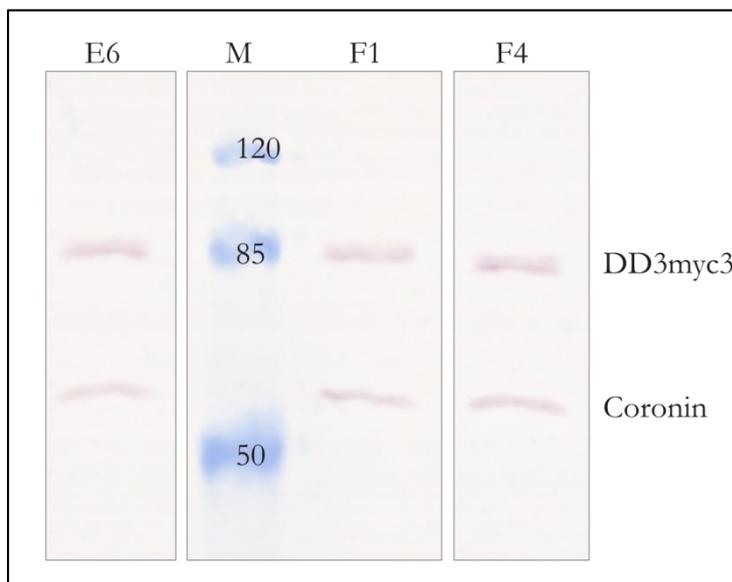
### 9.1.1 DD3myc3 kolokalisiert mit der Proteindisulfidisomerase im Endoplasmatischen Retikulum

Nachdem mit der RT-PCR die erhöhte Expression von DD3-3-mRNA in den AlyA-Knockout-Zellen kontrolliert werden konnte, wurde nun die genauere Funktion von DD3-3 untersucht. Dafür war es wichtig, herauszufinden, wo DD3-3 subzellulär lokalisiert. Ist der Ort des Proteins innerhalb der Zelle bekannt, können mögliche Funktionen des Proteins davon abgeleitet werden. Für DD3-3 stand jedoch kein Antikörper zur Verfügung, um das Protein in der Zelle nachzuweisen. Die Möglichkeit, DD3-3 am N-Terminus mit einem grün fluoreszierenden Protein (GFP) zu fusionieren, wurde bereits von Sakuragi *et al.* [99] ausgeschöpft. Die Arbeitsgruppe konnte jedoch keine Klone gewinnen, die GFP-DD3-3 exprimierten. Aufgrund dessen wurde im Rahmen dieser Arbeit der genomisch inserierende Vektor #782 hergestellt, bei welchem DD3-3 am C-Terminus mit GFP fusioniert wurde. Doch auch hier blieben zehn unabhängige Transformationen des Wildtyps von *Dictyostelium discoideum* erfolglos. Die wenigen Klone, die gewonnen werden konnten, zeigten kein GFP-Signal (Daten nicht gezeigt). Um das Problem der terminalen Fusion von DD3-3 zu umgehen, wurde daher ein Vektor kloniert, welcher DD3-3 mit einem kurz vor seiner Transmembrandomäne inserierten Myc-Epitop trägt. Dadurch ergibt sich ein ca. 71 kDa schweres, als DD3myc3 bezeichnetes Protein, welches in Abbildung 7 skizziert ist.



**Abbildung 7: Schematische Darstellung des Proteins DD3myc3.** Der N-Terminus des Fusionsproteins enthält wie DD3-3 die ER-Signalsequenz (rot), während kurz vor der Transmembrandomäne (grün) die 13 Aminosäuren des Myc-Epitops (violett) eingefügt wurden.

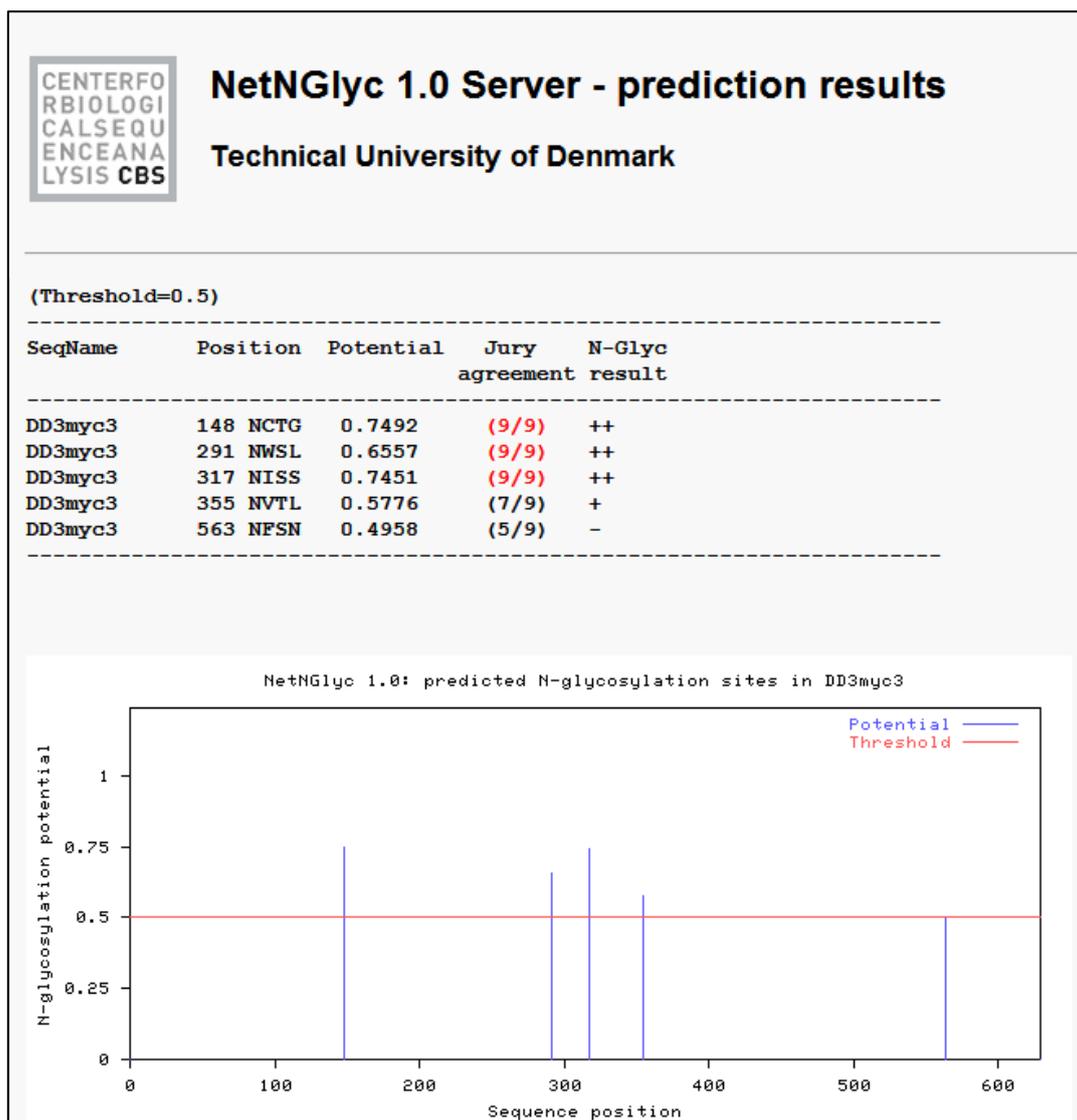
Da es sich bei diesem Vektor #791 um einen integrierenden Expressionsvektor handelt, wird er bei einer erfolgreichen Transformation in der Wirtszelle vermutlich zuerst in einem *Rolling-Circle*-Mechanismus mehrfach hintereinander abgelesen [8]. Dadurch werden DNA-Fragmente produziert, die aus hunderten Wiederholungen der Vektorsequenz bestehen [8]. Diese *Repeats* werden von der Wirtszelle anschließend willkürlich in das Genom integriert und dort zusätzlich zur endogenen Sequenz abgelesen. An den transformierten Vektor ist ebenfalls eine Geneticinresistenz gekoppelt, die eine Selektion der Transformanten ermöglicht. Eine sich anschließende Subklonierung über einen Bakterienrasen erlaubte die Isolierung von Klonen, die das Protein DD3myc3 im Übermaß exprimieren. Bei diesem Vorgehen konnten aus zwei unabhängigen Transformationen (E und F) von AX2-Zellen drei Klone isoliert werden, deren erfolgreiche DD3myc3-Synthese in Abbildung 8 auf einem Westernblot dargestellt ist.



**Abbildung 8: Westernblot einer SDS-PAGE mit Gesamtprotein der DD3myc3-exprimierenden Klone.** Der Myc-Antikörper (9E10) in Kombination mit dem Sekundärantikörper 315-055-003 erkennt DD3myc3 in den Klonen E6, F1 und F4 kurz unterhalb der 85 kDa-Bande des Markers. Die Coroninbande (176-3D-6) dient als Ladekontrolle und wurde unabhängig von der Myc-Bande entwickelt (M=Marker, Größenangaben in kDa).

Das Protein DD3myc3 wird in den Klonen E6, F1 und F4 synthetisiert. Eine unspezifische Bindung des Myc-Antikörpers an andere Proteine konnte in unabhängigen Experimenten mit Gesamtprotein des wildtypischen Stammes AX2 ausgeschlossen werden. Der angefertigte Westernblot zeigte für AX2 kein Myc-Signal (Daten nicht gezeigt).

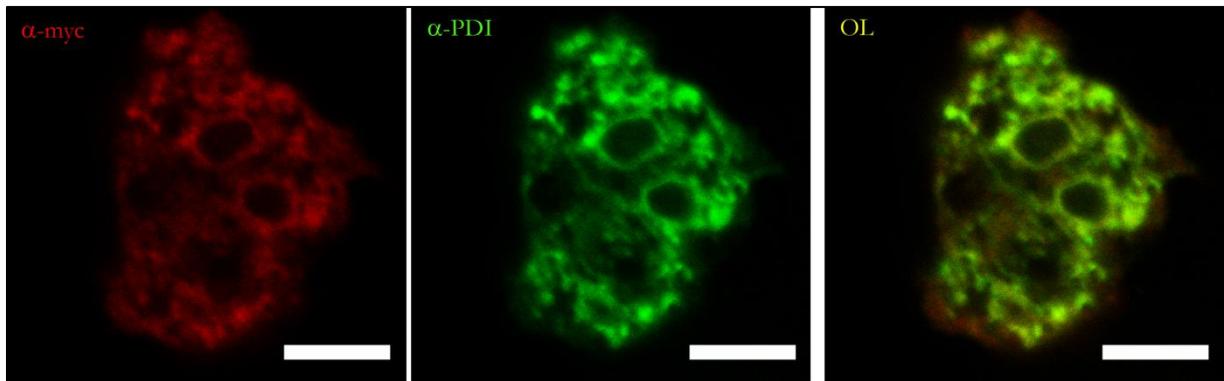
Auffällig an Abbildung 8 ist jedoch, dass alle DD3myc3-Banden leicht unscharf sind. Es lässt sich sogar in allen Spuren eine schärfere untere und verschmierte Bande darüber erkennen. Diese Doppelbanden mit nur wenigen kDa Unterschied auf Westernblots sind bekannt für Proteine, die Glykosylierungen tragen [11]. Aus diesem Grund wurde die DD3myc3-Proteinsequenz auf solche Modifikationen untersucht. Während der DictyOGlyc 1.1 Server für SSDmyc485 keine O-Glykosylierungsposition identifizieren konnte, sagt der NetNGlyc 1.0 Server für das Fusionsprotein vier potentielle Positionen für eine N-glykosidische Modifikation voraus (Abbildung 9).



**Abbildung 9: Identifikation von N-Glykosylierungsstellen in DD3myc3 durch den NetNGlyc 1.0 Server.** Der Server diagnostiziert für DD3myc3 vier potentielle Glykosylierungsstellen. Die Positionen 148, 291 und 317 werden zu ca. 70 % glykosyliert, während die Aminosäure 355 nur mit einer Wahrscheinlichkeit von 58 % eine Zuckermodifikation erhält.

In der Zelle werden N-glykosidische Modifikationen einem Protein im Endoplasmatischen Retikulum angehängt [45]. Die Markierung von DD3-3 mit dem Myc-Epitop ermöglicht es, den Auf-

enthaltort von DD3myc3 in den *Dictyostelium*-Zellen nachzuweisen. Abbildung 10 zeigt mit dem konfokalen *Laser-Scanning*-Mikroskop (CLSM) erstellte Vergleichsbilder der Myc-Verteilung und der Anordnung der Proteindisulfidisomerase am Beispiel des DD3myc3-Klons E6.



**Abbildung 10: Subzelluläre Verteilung von DD3myc3 und der Proteindisulfidisomerase (PDI) in einer DD3myc3-überexprimierenden Zelle des Klons E6.** Die Fixierung der Zellen erfolgte nach 8.4.2 mit anschließender indirekter Immunfluoreszenz (8.4.4). Die Markierung des Myc-Epitops und der PDI wurde mit dem polyklonalen Antikörper  $\alpha$ -Myc (#2272) und dem monoklonalen Antikörper  $\alpha$ -PDI (221-64-1) und im Anschluss über die Cy3- (111-165-003, rot) und Oregon Green- (O-6380, grün) gekoppelten sekundären Antikörper herbeigeführt. Das rechte Bild (OL) zeigt die Überlagerung beider Fluoreszenzbilder. Der Maßstabsbalken entspricht 4  $\mu$ m.

Da der Antikörper  $\alpha$ -PDI die Proteindisulfidisomerase (PDI) erkennt, welche im Lumen des Endoplasmatischen Retikulums (ER) lokalisiert [74], kann aufgrund der überlagerten Bilder (OL) in Abbildung 10 DD3myc3 ebenfalls dem ER zugeordnet werden. Die Cy3- und Oregon Green-gekoppelten Antikörper zeigen nahezu identische Signale. Die roten Randbereiche in den überlappenden Darstellungen resultieren aus dem erfahrungsgemäß sehr starken und körnigen Hintergrundsignal des polyklonalen Myc-Antikörpers.

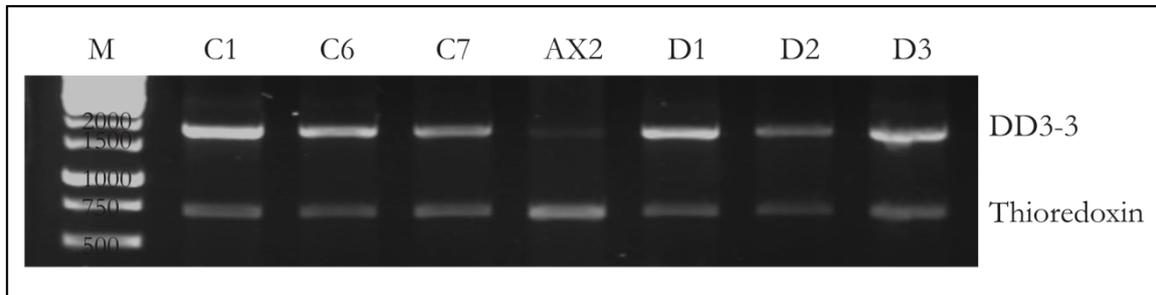
Neben dem Klon E6 wurden ebenfalls Zellen des Klons F4 mit dem CLSM beobachtet. Diese zeigten die gleichen Strukturen und ebenso wie E6 eine sehr homogene Signalstärke zwischen den einzelnen Zellen untereinander, so dass hier auf eine Abbildung von Zellen des Klons F4 verzichtet wurde.

### 9.1.2 Überexpression von unmarkiertem DD3-3

Durch das Einfügen des Myc-Epitops in das DD3-3-Protein, kann es zu Veränderungen in den molekularen Eigenschaften von DD3myc3 kommen. Vergleicht man das Verhalten der DD3myc3-überexprimierenden Mutanten jedoch mit Zellen, die unmarkiertes DD3-3 in hohem Maße exprimieren, können Rückschlüsse auf die Funktionalität von DD3myc3 gezogen werden.

Die Herstellung von Klonen, die eine unmarkierte Form des DD3-3-Proteins überexprimieren sollten, erfolgte mit dem Vektor pDex MCS DD3-3 (#783) nach den gleichen Prinzipien wie für die markierte Variante. Darüber hinaus mussten die in  $G_{10}$ -Medium resistenten Klone im Gegen-

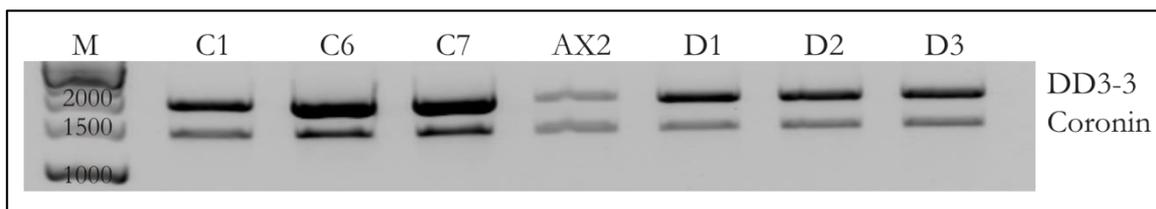
satz zu DD3myc3-Expriemierern vorerst auf die inserierten Sequenzwiederholungen des Vektors untersucht werden (Abbildung 11).



**Abbildung 11: Agarosegelelektrophorese mit Produkten einer PCR auf die genomische DNA von wildtypischen (AX2) und DD3-3-überexprimierenden Zellen (C und D).** Die DNA wurde nach 8.3.9.2 gewonnen und in einer *Multiplex-PCR* das Gen für Thioredoxin (~719 bp) mit den *Primern* #216/#217 und DD3-3 (~1851 bp) mit den *Primern* #577/#580 in einem Ansatz amplifiziert (M=1 kb-Marker, Werte in bp).

In allen Klonen (C1-C7 und D1-D3) liegt die genomische Sequenz für DD3-3 häufiger vor als in AX2-Zellen. Das Thioredoxingen gilt als interne Kontrolle, d.h. es wird von ihm angenommen, dass es in jedem PCR-Ansatz mit gleicher Effizienz amplifiziert wird. Da die Thioredoxinbanden in allen Spuren ähnliche Intensitäten aufweisen, kann man die darüber gelegenen DD3-3-Banden direkt untereinander vergleichen. Die DD3-3-Banden sind in den sechs Klonen unterschiedlich intensiv, aber das Signal mehrfach stärker als in AX2-Zellen. Dies ist Voraussetzung für eine erhöhte Synthese des Proteins. Um allerdings sicherzustellen, dass ein Gen auch wirklich transkribiert wird, muss im Falle der DD3-3-Zellen die mRNA ebenfalls nachgewiesen werden.

Die Menge an DD3-3-mRNA eines jeden Klons lässt sich indirekt wie auch für AX2- und AlyA-*Knockout*-Zellen schon unter 9.1 beschrieben über eine RT-PCR nachweisen (Abbildung 12).



**Abbildung 12: Produkte der *Multiplex-PCR* auf cDNA von Wildtyp und DD3-3-überexprimierenden Zellen.** RNA aus wildtypischen Zellen und den DD3-3-Klonen wurde nach 8.3.10 isoliert und mit dem Oligo-dT-*Primer* revers transkribiert. Die von der KOD-Polymerase erstellten Produkte bestehen aus Coronin (1340 bp) mit den *Primern* #75/#76 und DD3-3 mit 1851 bp und den *Primern* #557/#558 (M=1 kb-Marker, Größenangaben in bp).

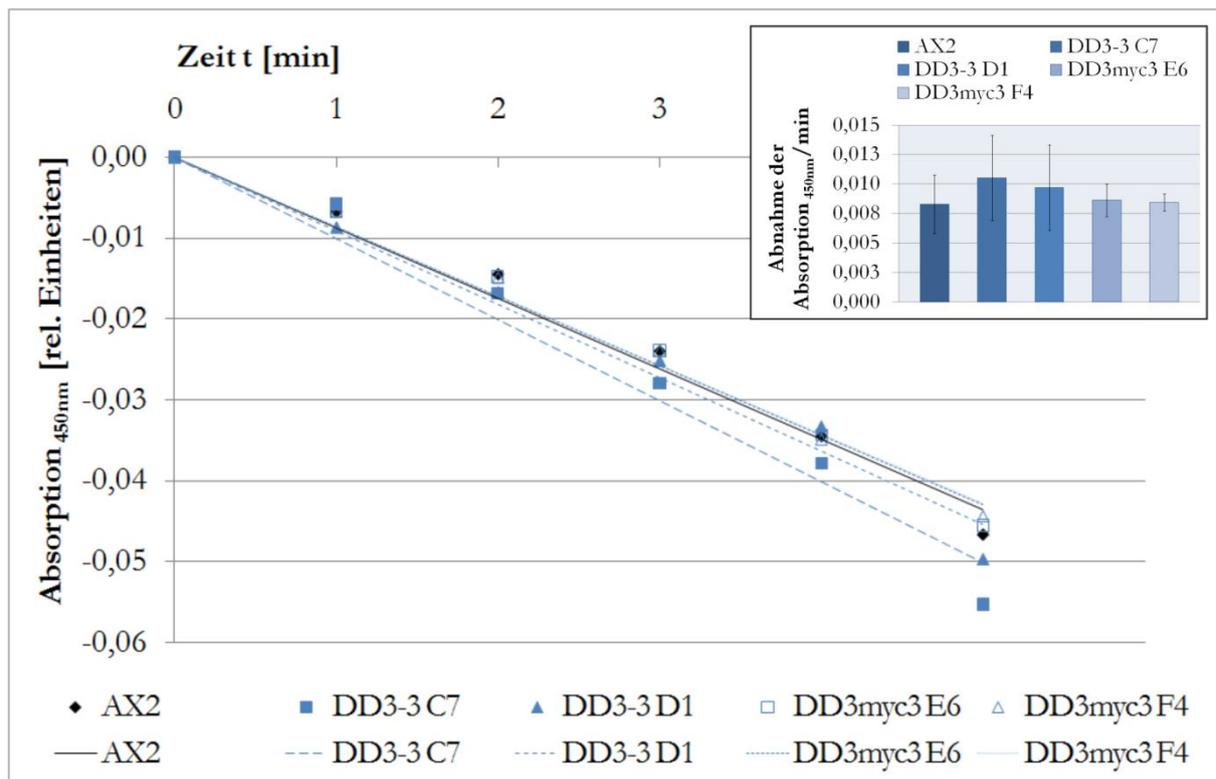
Da davon ausgegangen wird, dass die reverse Transkription in allen Ansätzen gleich effizient abläuft, kann die mRNA-Menge von DD3-3 in den Klonen mittels der Coroninbande mit der des Wildtyps in Relation gebracht werden. Die Signale für das DD3-3-Fragment sind in allen DD3-3-Klonen (C und D) in Relation mit der Coroninbande um ein Vielfaches stärker als in AX2-Zellen

(Abbildung 12). Alle DD3-3-Klone (C und D) zeigen daher indirekt eine gesteigerte mRNA-Synthese für DD3-3. Sowohl Coronin als auch DD3-3 tragen in ihrer genomischen Sequenz keine Introns, d.h. die gezeigten Banden der Abbildung 12 können nicht von amplifizierter gDNA unterschieden werden. Dass es sich bei den Amplifikaten wirklich um Replikate der cDNA und nicht gDNA beider Gene handelt, wurde in unabhängigen PCR-Experimenten bestätigt (Daten nicht gezeigt).

Ein Nachweis des DD3-3-Proteins ist für nichtmarkierte Überexprimierer aufgrund eines fehlenden DD3-3-Antikörpers nicht möglich. Über posttranskriptionelle Regulationsmechanismen kann somit keine eindeutige Aussage gemacht werden.

### **9.1.3 Eine Rückkopplung von überexprimiertem DD3-3 auf die Lysozymaktivität erfolgt nicht**

Bei der Erforschung eines molekularen Signalweges darf nicht außer Acht gelassen werden, dass es zusätzlich zu vorwärts gerichteten Signalkaskaden auch immer wieder zu rückwirkenden Signalen kommen kann. Da in dem hier untersuchten Signalweg die herabgesetzte Lysozymaktivität der AlyA-Mutanten grundlegend ist und darüber hinaus leicht gemessen werden kann (8.1.2.10), wurde für die DD3-3-Mutanten die Lysozymaktivität ebenfalls überprüft (Abbildung 13).

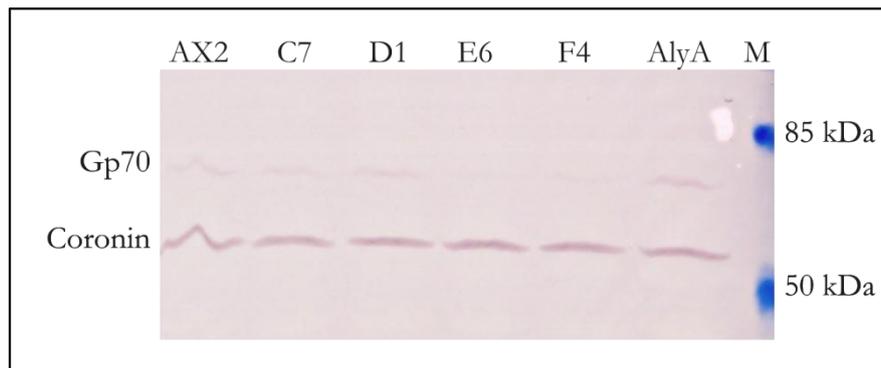


**Abbildung 13: Lysozymaktivität in Gesamtzelllysaten von wildtypischen Zellen (AX2) und DD3-3-überexprimierenden, bzw. DD3myc3-exprimierenden Zellen (n=4).** Die Lysozymaktivität wurde anhand der Absorption einer *M. luteus*-Lösung bei 450 nm aus vier unabhängigen Experimenten nach 8.1.2.10 bestimmt. **Balkendiagramm:** Die negative Steigung der Lysozymaktivität entspricht der Abnahme der Absorption bei 450 nm pro Minute (=Lyserate). Das Diagramm stellt die Lyseraten der DD3-3-Mutanten im Vergleich mit dem Wildtyp dar (n=4).

In der Aktivität von Lysozymen in den Gesamtzelllysaten der DD3myc3-exprimierenden Mutanten E6 und F4 kann keine Veränderung zum Wildtyp festgestellt werden. Die unmarkierten DD3-3-Mutanten C7 und D1 hingegen scheinen die im Experiment eingesetzten *M. luteus*-Zellen schneller lysieren zu können. Unter Einbezug der Standardabweichungen (vgl. Abbildung 13, Balkendiagramm) zeigt sich jedoch, dass selbst die Raten von wildtypischen Zellen starken Schwankungen unterliegen. Die Lyserate ist daher in allen DD3-3-Klonen als unverändert zu interpretieren. Eine Rückkopplung der Überexpression von DD3-3 auf die Lysozymaktivität kann daher verneint werden.

#### 9.1.4 Durch eine Überexpression von DD3-3 und DD3myc3 kann die Expression der Esterase Gp70 nicht erhöht werden

Eine von der DD3-3-Überexpression ausgehende Weiterleitung des Signals kann anhand der Esterase Gp70 leicht untersucht werden. Dazu muss die Expressionsstärke der Esterase in den DD3(myc)3-Klonen betrachtet werden.

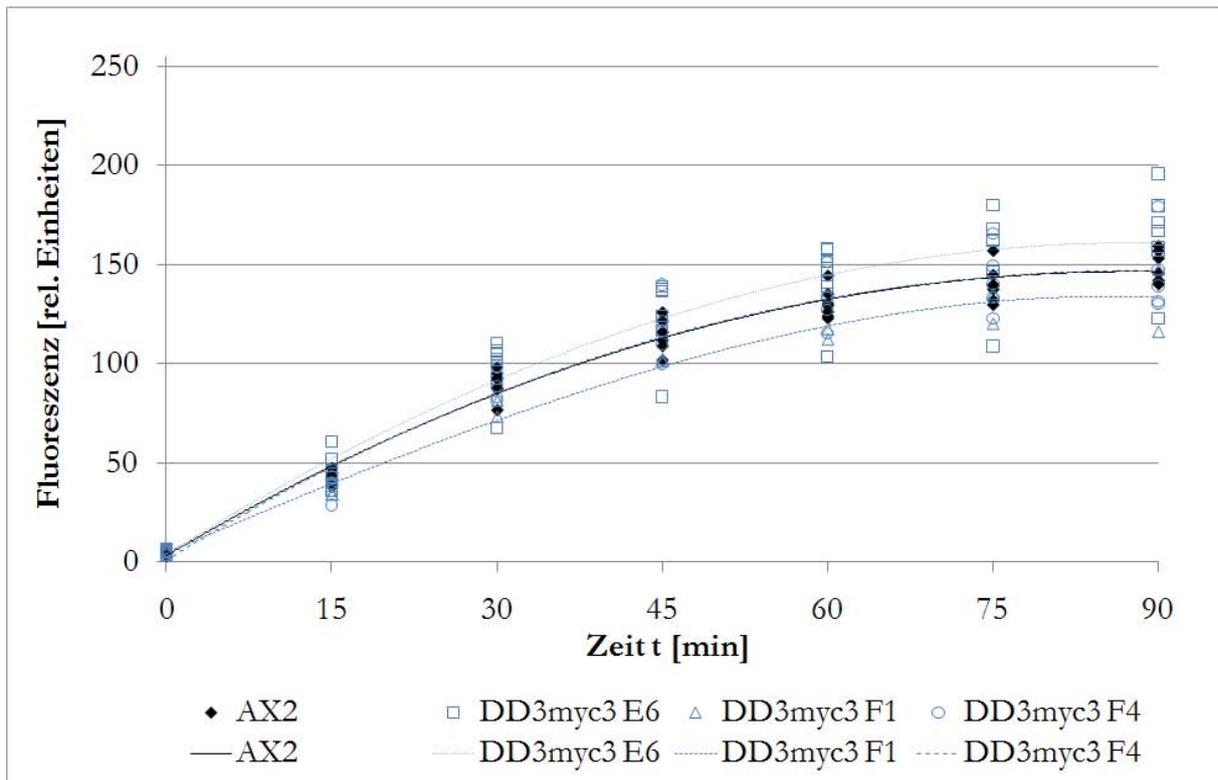


**Abbildung 14: Westernblotanalyse der Gp70-Expression in Gesamtzelllysaten von wildtypischen (AX2) und DD3(myc)3-exprimierenden Zellen.**  $3 \cdot 10^6$  Zellen wurden pro Spur aufgetragen und einer SDS-PAGE (8.2.3) unterzogen. Der Westernblot wurde mit den Antikörpern gegen Gp70 (130-80-2) und zur Kontrolle der Proteinmengen mit dem gegen Coronin (176-3D-6) behandelt und über den polyklonalen Sekundärantikörper (315-055-003) entwickelt. Da Gp70 grundsätzlich nur sehr schwach exprimiert wird, mussten die Gp70-Banden unabhängig von den Coroninbanden entwickelt werden (M=Marker).

Wie die Abbildung 14 erkennen lässt, ist die Gp70-Expression in den DD3-3-Klonen C7 und D1 ähnlich der des Wildtyps. Die Intensitäten der Esterasebande in den DD3myc3-Klonen E6 und F4 ist sogar noch schwächer als beim Wildtyp und erst recht im Vergleich zu *AlyA-Knockout*-Zellen. Die Überexpression von DD3(myc)3 scheint also keine Weiterleitung des Signals in Richtung einer erhöhten GP70-Expression auszulösen.

### 9.1.5 Die Überexpression von DD3myc3 und DD3-3 führt nicht zu einer Erhöhung der Phagozytose

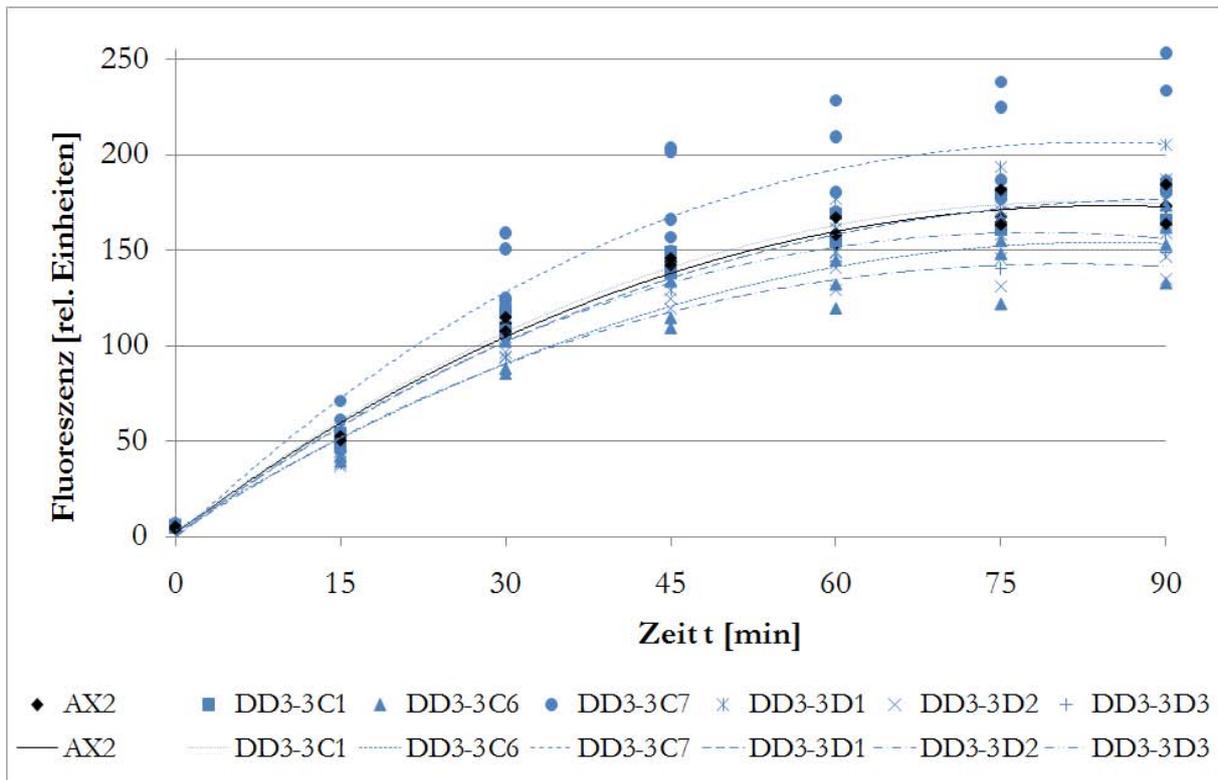
Die Bestimmung der Phagozytoserate der hergestellten Klone ist ein wichtiges Instrument, um die Rolle von DD3-3 in der *AlyA*-Gp70-Signalkette besser zu verstehen. So sollte auch für die DD3(myc)3-Klone die Phagozytose überprüft werden, obwohl die GP70-Expression in den Klonen nicht erhöht ist. Die geringeren GP70-Mengen in den myc-markierten Mutanten könnten sogar in einer herabgesetzten Phagozytoserate resultieren. Die Phagozytose kann außerdem Aufschluss über die Funktionalitäten der Proteine geben. Es ist für DD3myc3 aufgrund des eingefügten Epitops nicht geklärt, ob das Protein seine natürlichen Funktionen weiterhin ausüben kann. Für die nur auf mRNA-Ebene nachweisbare Überexpression von DD3-3 ist bis jetzt nicht bekannt, ob das DD3-3-Protein überhaupt überexprimiert wird. Zeigen die transformierten Zellen jedoch in Phagozytoseexperimenten einen Phänotyp, so lassen sich durch Vergleich der markierten und unmarkierten Exprimierer Rückschlüsse auf die Funktion der überexprimierten Proteine ziehen.



**Abbildung 15: Aufnahme von fluoreszenzmarkierten Hefen in DD3myc3-überexprimierenden und wildtypischen *Dictyostelium*-Zellen.** Nach mehreren Messungen mit einem Fluoreszenzspektrometer nach 8.1.2.7 zeigt der Klon E6 (n=7), dass er Hefen ca. 10 % effizienter aufnehmen kann als Wildtypzellen. Der Klon F1 (n=2) phagozytiert allerdings 10 % weniger als der Wildtyp (AX2). Die Partikelaufnahme von Klon F4 (n=5) ist unverändert und entspricht genau der des Wildtyps.

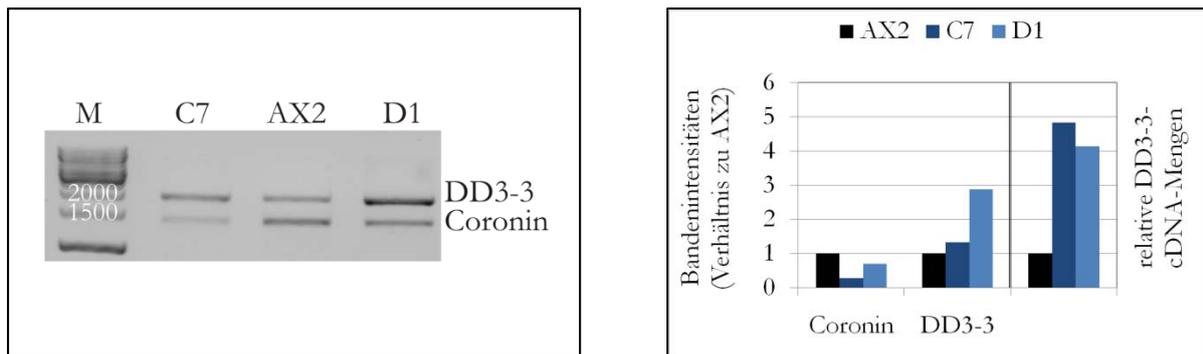
Die Fähigkeit, angebotene Partikel aus der Umgebung aufzunehmen, ist laut Abbildung 15 in allen DD3myc3-Klonen sehr ähnlich. Die Phagozytoseraten der DD3myc3-Klone unterscheiden sich zum AX2 um höchstens 10 %. Der im Mittel leicht stärker phagozytierende Klon E6 zeigt noch dazu eine sehr große Spanne, über die sich die Messwerte unabhängiger Experimente erstrecken. Eine Korrelation zur erniedrigten GP70-Expression (Abbildung 14) der Myc-Klone E6 und F4 ist hier nicht erkennbar.

Die unmarkierten DD3-3-Überexprimierer zeigten ein ganz ähnliches Phagozytoseverhalten (Abbildung 16).



**Abbildung 16: Phagozytoseverhalten von wildtypischen Zellen (AX2) und Zellen, die DD3-3 überexprimieren (C und D).** Das Phagozytoseverhalten wurde für die DD3-3-überexprimierenden Zellen entsprechend 8.1.2.7 bestimmt. Die Klone wurden aber unterschiedlich oft vermessen (C7 und D1: n=6; C6: n=4; C1, D2 und D3: n=2).

Die Phagozytose der Klone C1 und D1 bleibt nach mehrmaliger Wiederholung des Experiments unverändert. Im Gegensatz zu der leicht verringerten Aufnahme der Klone C6, D2 und D3 zeigt Klon C7 eine um ca. 20 % erhöhte Phagozytose. Doch auch hier muss ein Augenmerk auf die Verteilung der einzelnen Messwerte gelegt werden. Diese liegen für den Klon C7 teils bei sogar 40 % erhöhter Phagozytose, in einem unabhängigen Experiment aber auf gleicher Höhe mit den Durchschnittswerten der AX2-Zellen. Vergleicht man das Verhalten der Zellen in Phagozytoseexperimenten mit den Expressionsstärken auf mRNA-Ebene aus der Abbildung 12, so fällt es schwer, dies zu korrelieren. Die Klone der Transformation D zeigen alle etwa die gleichen Mengen amplifizierter DD3-3-cDNA. Da die Banden des Klons C7 in Abbildung 12 sehr dick sind und die Coroninbanden von C7 und AX2 als Kontrolle nicht in der gleichen Intensität vorliegen, wurde die RT-PCR für Klon C7 und zum Vergleich AX2 und D1 erneut auf ein Agarosegel aufgetragen und die Bandenintensitäten mit dem Programm ImageJ ins Verhältnis gesetzt (Abbildung 17).



**Abbildung 17: Wiederholte Analyse der Expressionsverhältnisse der DD3-3-Klone und AX2-Zellen.** Links: Agarosegelelektrophorese mit PCR-Produkten auf cDNA des Wildtyps (AX2) und der unabhängigen DD3-3-überexprimierenden Klone C7 und D1. Beide Klone zeigen eine intensivere DD3-3-Bande im Vergleich zum Wildtyp, selbst bei unterschiedlich starken Coroninbanden als Kontrolle (M=1 kb-Marker, Werte in bp). Rechts: Graphische Darstellung der Intensitäten der Banden des Agarosegels links. Nach Normalisierung der Intensitäten auf die Kontrollbande (Coronin) zeigen die DD3-3-Klone eine stark erhöhte Menge an DD3-3-cDNA.

Der erneute Auftrag der RT-PCR zeigt, dass es zwischen den DD3-3-Exprimierern einen leichten Unterschied gibt. Beide Klone zeigen nach Normalisierung der Intensitäten auf die Coroninbande des Wildtyps eine vier- bis fünffache Erhöhung der mRNA-Level. Dabei liegt der Klon C7 mit einem Wert von 4,8 leicht über dem Klon D1 mit 4,1, was einer ähnlichen Tendenz bei der Partikelaufnahme entspricht. Der Klon C7 ist jedoch der einzige, der ansatzweise eine Erhöhung der Phagozytose erkennen lässt.

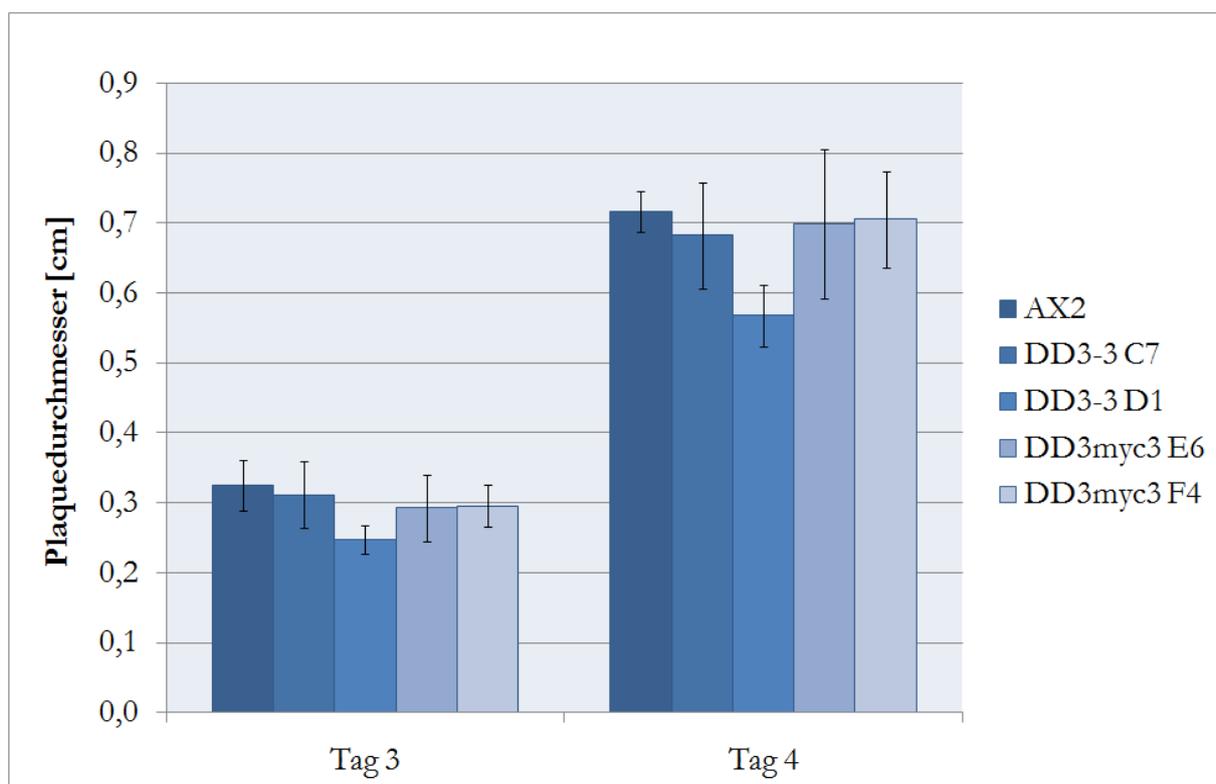
Durch die Insertion des Vektors in das *Dictyostelium*-Genom (9.1.1) kann nicht ausgeschlossen werden, dass dabei andere die Phagozytose regulierende Gene zerstört werden. Aus diesem Grund werden Mutanten unabhängiger Transformationen untersucht. Verhalten sie sich gleich, so ist es wahrscheinlich, dass der Phänotyp aufgrund des inserierten Gens hervorgerufen wurde. Der Klon C7 verhält sich anders als acht zu ihm unabhängige Klone. Es ist daher davon auszugehen, dass seine erhöhte Phagozytose das Resultat eines zerstörten Genlokus ist und nicht durch die Überexpression von DD3-3 hervorgerufen wurde. Wird DD3-3 also mit oder ohne Myc-Epitop in *Dictyostelium*-Zellen überexprimiert, so lässt sich keine Veränderung im Phagozytoseverhalten der Zellen erkennen.

### 9.1.6 Die Ausbildung der Fresshöfe von DD3-3- und DD3myc3-Exprimierern ist überwiegend wildtypähnlich

In *AlyA-Knockout*-Mutanten führt das Fehlen des Lysozyms über eine erhöhte Gp70-Expression zu einer erhöhten Phagozytose und zu größeren Durchmessern der Fresshöfe [76-77]. In Gp70-Überexprimierern konnte I. Müller allerdings keine vergrößerten *Plaque*-Durchmesser verzeichnen [76]. G. Konotop konnte ebenfalls nachweisen, dass eine Erhöhung oder Erniedrigung der Phagozytoserate nicht zwangsläufig eine Veränderung der Fresshöfe zur Folge hat [57]. Da sich

die *Plaque*-Durchmesser von der Phagozytoserate anscheinend unabhängig entwickeln können, wurde diese Eigenschaft auch für die DD3(myc)3-Mutanten untersucht.

Die Bildung von Fresshöfen in einem Bakterienrasen (*Plaques*) lässt sich kontrollieren, indem man *Dictyostelium discoideum* zusammen mit Bakterien ausplattiert und sie dann für drei Tage bei Raumtemperatur kultiviert. Aufgrund der geringeren Generationszeit der Bakterien haben diese bereits einen Rasen gebildet, bevor *Dictyostelium* sich soweit vermehrt hat, dass seine Kolonien in Form von Fresshöfen sichtbar werden. In der Mitte dieser Höfe bildet *Dictyostelium* später aufgrund mangelnden Nahrungsangebots erste Sporenköpfe. Nach drei unabhängigen Experimenten ergab sich für die DD3-3- und DD3myc3-Mutanten folgendes, in Abbildung 18 gezeigtes Bild.



**Abbildung 18: Durchmesser der Fresshöfe (*Plaques*) von DD3-3-Mutanten im Vergleich mit wildtypischen Zellen (n=3).** Die Mutanten C7, E6 und F4 bilden am 3. und 4. Tag nach dem Ausplattieren (8.1.2.8) wildtypische Hofdurchmesser auf einem Rasen aus *E. coli* B/2. Der DD3-3-Klon D1 zeigt signifikant kleinere Fresshöfe verglichen mit dem Wildtyp (AX2).

Die *Plaque*-Bildung bleibt in fast allen Mutanten unbeeinflusst von der DD3-3-Überexpression. Die kleineren Höfe des Klons D1 lassen eine Insertion der Vektor-*Repeats* in einem für die *Plaque*-Ausbildung wichtigen Locus vermuten. Die leicht erhöhte Phagozytose des unmarkierten Klons C7 (Abbildung 16) resultiert nicht in größeren Fresshöfen.

Betrachtet man das Verhalten der DD3(myc)3-Zellen im Zusammenhang, so ist offensichtlich, dass eine Überexpression von DD3-3 die in der AlyA-Mutante beobachteten Phänotypen nicht hervorrufen kann. Weder die GP70-Expression, noch die Phagozytose oder der *Plaque*-

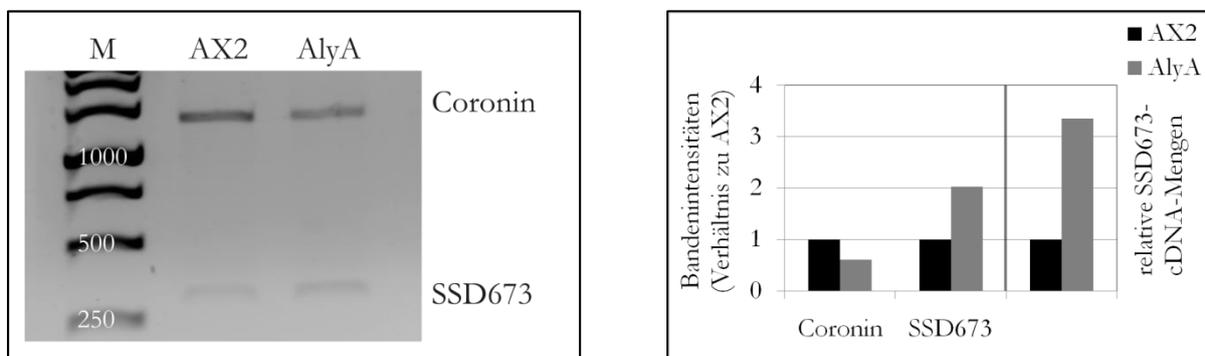
Durchmesser lassen sich durch die DD3(myc)<sup>3</sup>-Überexpression erhöhen. DD3(myc)<sup>3</sup> kann damit nicht als Regulator der Phagozytose angesehen werden.

## 9.2 DDB0237660 (EST: SSD673)

Die von I. Müller 2006 [76] erhaltenen Ergebnisse der cDNA-*Microarray*-Vergleiche zeigen für das EST SSD673 wie auch für DD3-3 eine unveränderte Expression in Gp70-überexprimierenden Zellen, aber eine Hochregulation in der *AlyA-Knockout*-Mutante. Dabei konnte für das EST SSD673 eine erhöhte Expression um einen Faktor von 2,1 ermittelt werden. Damit ist das zugehörige Protein ebenfalls ein potentieller Kandidat für eine Funktion im Signalweg zwischen *AlyA* und Gp70. DDB0237660, im Folgenden nur SSD673 genannt, könnte somit als positiver Regulator für die Phagozytose gelten.

Bei SSD673 handelt es sich um ein kleines, nur ca. 10,8 kDa schweres und aus 94 Aminosäuren aufgebautes Protein. Es wird auf Chromosom 3 durch ein 387 bp großes Gen codiert, welches durch das Entfernen eines Introns in einer codierenden Sequenz von 285 bp resultiert. Am N-Terminus trägt SSD673 eine Signalsequenz für das Endoplasmatische Retikulum (ER), die laut dem Programm PSORT II, welches Vorhersagen von Proteinlokalisierungssignalen macht, spaltbar ist. Neben dieser ER-Signalsequenz trägt SSD673 keine konservierten Domänen und es sind ebenfalls keine Homologien zu Proteinen anderer Organismen vorhanden.

Dass die mRNA-Menge von SSD673 in der *AlyA-Knockout*-Mutante erhöht ist, lässt sich indirekt wie auch für DD3-3 mit Hilfe einer RT-PCR bestätigen (Abbildung 19).



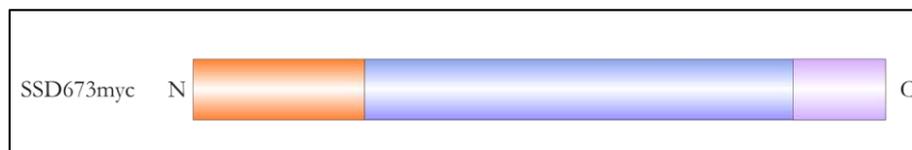
**Abbildung 19: Auf RT-PCR beruhende Expressionsverhältnisse von SSD673 in AX2- und AlyA-Knockout-Zellen. Links:** Agarosegelelektrophorese mit PCR-Produkten der Gesamt-cDNA von Wildtyp- (AX2) und AlyA-Knockout-Zellen (AlyA). Die Coronin-cDNA (Primer: #75/#76) und die SSD673-cDNA (Primer: #355/#412) wurden in einem Ansatz gemeinsam amplifiziert (M=1 kb-Marker, Werte in bp). **Rechts:** Graphische Darstellung der Bandenintensitäten des Agarosegels links. Nach Normalisierung der Intensitäten auf die Kontrollbande (Coronin) zeigen die AlyA-Knockout-Zellen eine erhöhte Menge an SSD673-cDNA.

Da davon ausgegangen wird, dass die cDNA proportional zur Menge der mRNA synthetisiert wird, lässt sich aus Abbildung 19 schließen, dass nach einer Normalisierung der Bandenintensitäten von Coronin in den AlyA-Knockout-Zellen mehr mRNA vom SSD673-Gen transkribiert wird als im Wildtyp. Mit einer Erhöhung der SSD673-Expression um einen Faktor von 3,3 spiegelt

dieses RT-PCR-Ergebnis eine vergleichbare Tendenz zu den *Microarray*-Analysen von I. Müller wieder.

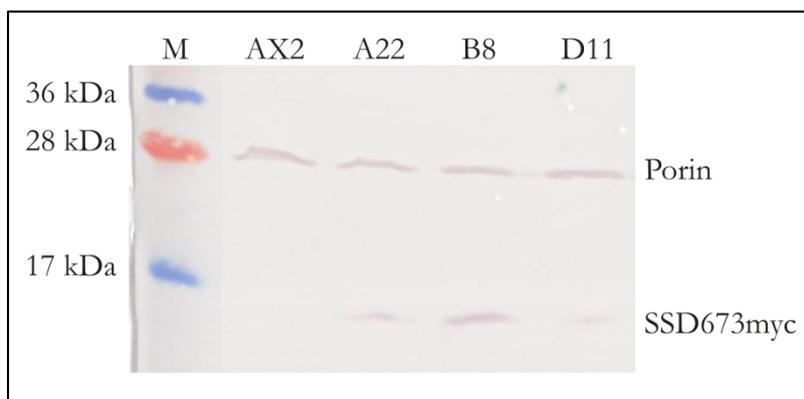
### 9.2.1 SSD673myc lokalisiert im Endoplasmatischen Retikulum und in dem Golgi-Apparat ähnlichen Strukturen

Für SSD673 stand kein Antikörper zu Verfügung, der das Protein in der Zelle hätte sichtbar machen können. Es erschien daher sinnvoll, SSD673 aufgrund seiner sehr geringen Größe ebenfalls mit dem Myc-Epitop zu fusionieren. Die Kopplung der 13 Aminosäuren des Epitops erfolgte am C-Terminus von SSD673 (siehe Abbildung 20). Der N-Terminus wurde aufgrund der vorhergesagten Spaltbarkeit des ER-Signals somit nicht verändert. Das Molekulargewicht des Fusionsproteins erhöhte sich dadurch auf ca. 12,3 kDa.



**Abbildung 20: Schematische Darstellung des Proteins SSD673 mit einem an den C-Terminus fusionierten Myc-Epitops (SSD673myc).** Der N-Terminus des Fusionsproteins enthält die ER-Signalsequenz (rot), während der C-Terminus mit dem aus 13 Aminosäuren bestehenden Myc-Epitop (violett) fusioniert wurde.

Zur Expression dieses Fusionsproteins wurde der inserierende Vektor #641 mittels Elektroporation in Zellen des Wildtypstammes AX2 eingebracht. Drei unabhängige Klone wurden nach der Selektion in geneticinhaltigem Medium auf die erfolgreiche Synthese des Fusionsproteins untersucht. Mittels Auftrennung von Gesamtproteinen dieser Klone in einer 15 %igen SDS-PAGE und einem Westernblot (Abbildung 21), konnte SSD673myc nachgewiesen werden.

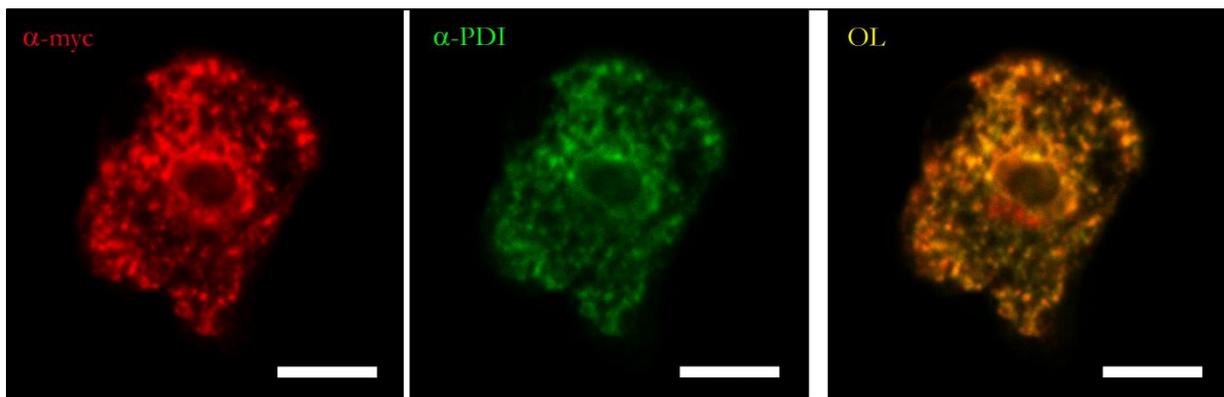


**Abbildung 21: Westernblot mit aufgetrenntem Gesamtprotein von Wildtypzellen (AX2) und SSD673myc-überexprimierenden Zellen.** Die Spuren für die Klone A22, B8 und D11 zeigen auf einer Höhe von ~12 kDa eine deutliche durch den  $\alpha$ -Myc-Antikörper (9E10) hervorgerufene Bande, die in AX2-Zellen fehlt. Die Porinbande ( $\alpha$ -Porin: 70-100-1) dient als Ladekontrolle. (M=Marker).

Da für DD3-3 verschwommene Banden mit einer Zuckermodifikation erklärt werden konnten, gibt es für SSD673myc anhand der scharfen Myc-Banden keinen Hinweis auf Glykosylierungen.

Tatsächlich viel die Suche nach Glykosylierungsstellen mit beiden bereits genannten Servern für SSD673myc negativ aus (Daten nicht gezeigt).

Nachdem die Expression des myc-markierten SSD673 mit einem Westernblot erfolgreich nachgewiesen werden konnte, wurde dessen Lokalisation in den drei unabhängigen Klonen A22, B8 und D11 in einer indirekten Immunfluoreszenz (8.4.4) untersucht. Zusätzlich zur Markierung des Myc-Epitops wurde in den gleichen Zellen die im ER vorkommende Proteindisulfidomerase angefärbt. Da die Färbungen für alle drei Klone gleich aussahen, zeigt Abbildung 22 beispielhaft an Klon A22 die entstandenen CLSM-Bilder.



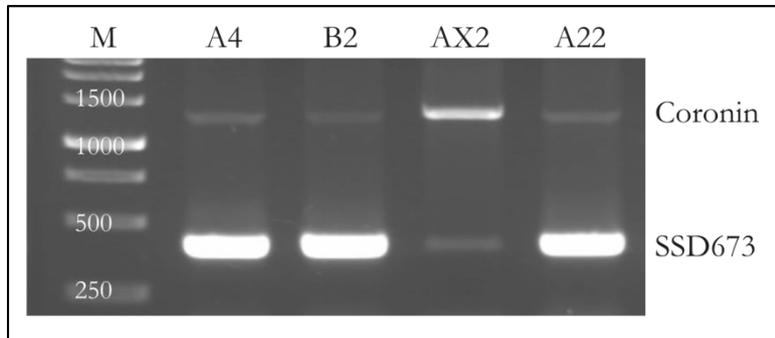
**Abbildung 22:** Aufnahmen einer indirekten Immunfluoreszenz einer SSD673myc-überexprimierenden Zelle zum Nachweis der subzellulären Verteilung von SSD673myc und der Proteindisulfidomerase (PDI). Die gezeigte Zelle des Überexprimierers A22 wurde nach 8.4.2 fixiert und mit dem Antikörper  $\alpha$ -Myc (#2272) und dem Antikörper  $\alpha$ -PDI (221-64-1) behandelt. Diese wurden dann mittels der Cy3- (rot) und Oregon Green- (grün) gekoppelten Antikörper 111-165-003 und O-6380 detektiert. Das ganz rechte Bild (OL) zeigt die Überlagerung beider Fluoreszenzbilder. Der Maßstabsbalken entspricht 5  $\mu$ m.

Die Überlagerung der Fluoreszenzsignale macht deutlich, dass das Fusionsprotein aus SSD673 und dem Myc-Epitop nahezu gleich in der Zelle verteilt ist wie die PDI. Neben der typischen Färbung von über die gesamte Zelle verteilten netzartigen Strukturen ist für die PDI-Färbung die Umrandung des Zellkerns besonders typisch. Hier fällt jedoch auf, dass jeweils an einer Seite des Zellkerns das Myc-Signal nicht komplett mit dem PDI-Signal überlagert wird. Diese perinukleären Strukturen erinnern stark an Strukturen des Golgi-Apparates. Ein Vergleich zwischen Abbildung 22 und Fluoreszenzaufnahmen von Schneider *et al.* [100], bei denen das Fusionsprotein Golvesin-GFP den Golgi-Apparat markiert, lässt eine Golgi-Lokalisation von SSD673myc plausibel erscheinen.

## 9.2.2 Überexpression von nichtmarkiertem SSD673

Für eine Überexpression des nichtmarkierten SSD673 wurde mittels Elektroporation der ebenfalls integrierende Expressionsvektor #640 in Wildtypzellen eingebracht und die in  $G_{10}$ -Medium

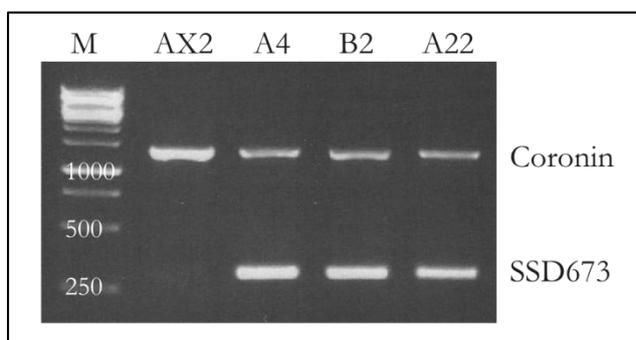
resistenten Klone auf die Insertionsrate des Vektors im Vergleich zu wildtypischen Zellen untersucht. Abbildung 23 zeigt die aufgetrennten Amplifikate der PCR für die Klone A4 und B2 (SSD673), den Wildtyp (AX2) und zum Vergleich ebenfalls den Klon A22 (SSD673myc).



**Abbildung 23: Aufgetrennte Amplifikate einer Multiplex-PCR auf gDNA SSD673(myc)-überexprimierender Klone.** Die gDNA wurde nach 8.3.9.2 isoliert und mit der Primer-Kombination #75/#76 für die interne Kontrolle Coronin (~1300 bp) und #412/#355 für SSD673 (~400 bp) amplifiziert. (M=1 kb-Marker, Größenangaben in bp).

Die um ein Vielfaches intensiveren SSD673-Banden der Klone A4, B2 und A22 bestätigen, dass in diesen Klonen die Sequenz für SSD673 in mehreren Wiederholungen in das Genom integriert wurde. Ein durch die Sequenz des Myc-Epitops hervorgerufener Größenunterschied zwischen dem SSD673-Fragment des Klons A22 und denen der unmarkierten Überexprimierer (A4 und B2) ist nicht erkennbar, da der Primer #355 noch vor der Myc-Sequenz hybridisiert. Der Wildtyp zeigt nur eine sehr schwache Bande für das SSD673-Amplifikat. Diese beschreibt in ihrer Intensität die einmalige Insertion der Gensequenz, denn von SSD673 ist bekannt, dass das dazugehörige Gen im Genom von *Dictyostelium discoideum* nur einmal existiert.

Ob die vielfachen Wiederholungen der SSD673-Sequenz wirklich zu einer erhöhten mRNA-Synthese führen, lässt sich über eine RT-PCR nachweisen. So konnte indirekt in den Stämmen A4, B2 und beispielhaft für die Expression von SSD673myc auch im Klon A22 eine erhöhte mRNA-Menge von SSD673, bzw. SSD673myc nachgewiesen werden (Abbildung 24).



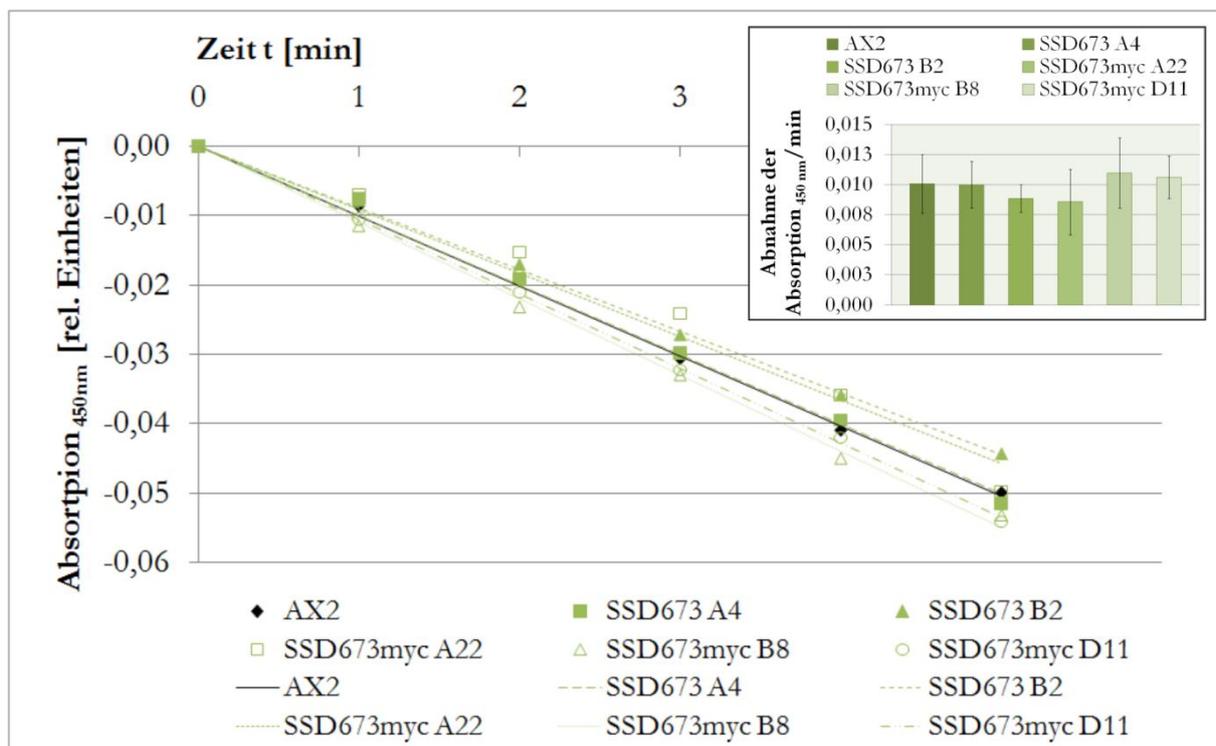
**Abbildung 24: Gelelektrophorese einer Multiplex-PCR auf Gesamt-cDNA SSD673-überexprimierender Klone.** Relativ mit dem Wildtyp (AX2) und anhand der Coroninbandenintensitäten (Primer: #75/#76) verglichen, zeigen die Klone A4, B2 und ebenfalls der SSD673myc-überexprimierende Klon A22 um ein Vielfaches erhöhte Mengen an cDNA für SSD673 (Primer: #412/#355, M=1 kb-Marker, Größenangaben in bp).

Die Menge an SSD673-mRNA in den unabhängigen myc-markierten Klonen B8 und D11 (vgl. Abbildung 21) erschien in einer RT-PCR gleich den Mengen des Klons A22 (Daten nicht ge-

zeigt). Die Klone A4 und B2 entstammen ebenfalls unabhängiger Transformationen und weisen, wie Abbildung 24 zeigt, sehr ähnliche Level an SSD673-Amplifikaten auf.

### 9.2.3 Die Überexpression von SSD673, bzw. SSD673myc hat keine Auswirkungen auf die Lysozymaktivität

Bei der Untersuchung von Signalwegen sollten mögliche Rückkopplungen ebenfalls analysiert werden. Daher wurde nach den Angaben unter 8.1.2.10 für sowohl die unmarkierten SSD673-Mutanten A4 und B2, als auch für die myc-markierten Mutanten A22, B8 und D11 der Abbau von *M. luteus*-Zellen durch im Gesamtzelllysat der Mutanten befindliches Lysozym untersucht (Abbildung 25).

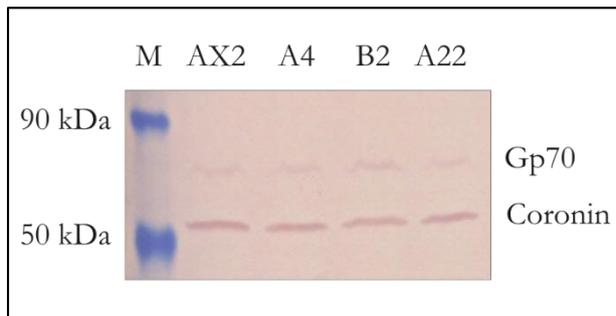


**Abbildung 25: Vergleichbare Lysozymaktivität in Gesamtzelllysaten von wildtypischen Zellen (AX2) und SSD673-überexprimierenden, bzw. SSD673myc-exprimierenden Zellen (n=3).** Die Absorption der *M. luteus*-Lösung bei 450 nm nimmt sowohl bei AX2-Zellen, den SSD673-Mutanten A4 und B2 als auch bei den SSD673myc-Mutanten A22, B8 und D11 ab. **Balkendiagramm:** Aus den Geradensteigungen ermittelte Lyseraten der SSD673-Mutanten im Vergleich mit dem Wildtyp (n=3).

Die Abbildung 25 zeigt, dass die Lyseraten der Mutanten durch Bildung des Mittelwertes, abgesehen vom Klon A4, vom Wildtyp abweichen. Da aber selbst bei AX2-Zellen die Streuung der Werte mit einer Standardabweichung von 24 % sehr groß ist, kann die langsamere Lyse von *M. luteus* der Klone B2 und A22, bzw. die leicht erhöhte Lyserate von Klon B8 und D11 nicht als aussagekräftig angesehen werden. Die Überexpression von SSD673 und SSD673myc bewirkt also keine Rückkopplung auf die Lysozymaktivität.

#### 9.2.4 Eine erhöhte Gp70-Expression ist in Gesamtzelllysaten von SSD673-überexprimierenden Zellen nicht nachweisbar

Zur Klärung der Frage, ob SSD673 Bestandteil des Signalweges zwischen AlyA und der Esterase Gp70 sein kann, wurden die Expressionslevel des Gp70-Proteins in den SSD673-überexprimierenden Mutanten genauer untersucht (Abbildung 26).

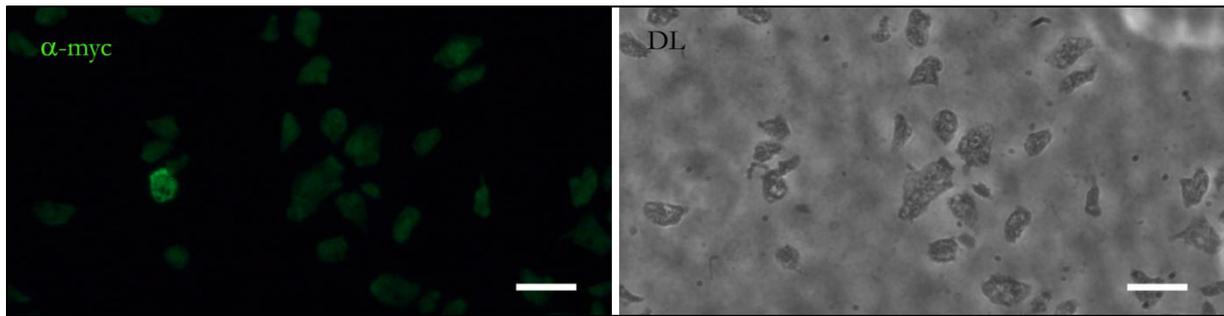


**Abbildung 26: Westernblotanalyse zur Bestimmung der GP70-Expression in wildtypischen (AX2), SSD673- (A4, B2) und SSD673myc- (A22) überexprimierenden Mutanten.** Gesamtzelllysat (8.2.1.1) wurde auf ein 10 %iges SDS-Gel aufgetragen und der sich anschließende Westernblot mit  $\alpha$ -Gp70 (130-80-2) behandelt. Coronin (176-3D-6) dient als interne Ladekontrolle. Beide Antikörper wurden über den Sekundärantikörper 315-055-003 getrennt entwickelt ( $2 \cdot 10^6$  Zellen/Spur, M=Marker).

Die Proteinmengen auf dem Westernblot sind aufgrund der ähnlichen Intensitäten der Coroninbande für alle SSD673(myc)-Klone nahezu gleich. Nur die SSD673-Mutante B2 zeigt eine etwas stärkere Gp70-Expression als wildtypische Zellen. Die zum Klon A22 unabhängigen SSD673myc-exprimierenden Klone (B8 und D11, vgl. Abbildung 21) zeigten in ihren Expressionsverhältnissen das gleiche Bild wie der Klon A22 (Daten nicht gezeigt). Eine erhöhte Gp70-Expression, wie sie in den AlyA-*Knockout*-Zellen gezeigt werden konnte (siehe Abbildung 14), lässt sich in Gesamtzelllysaten für SSD673(myc)-Mutanten somit nicht belegen.

#### 9.2.5 Stark SSD673myc überexprimierende Zellen internalisieren mehr Hefezellen als wildtypische *Dictyostelium*-Zellen

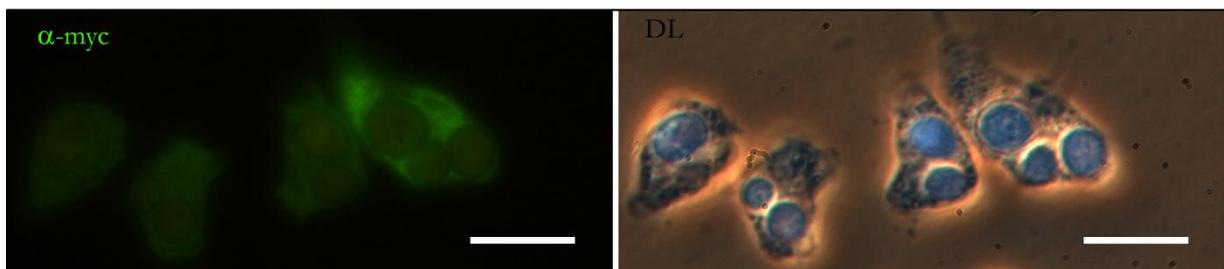
SSD673myc lokalisiert im ER und vermutlich dem Golgi-Apparat (vgl. 9.2.1). Die Abbildung 22 zeigt dies anhand einer einzelnen SSD673myc-exprimierenden Zelle. Bei der Betrachtung mehrerer Zellen hingegen, hat sich gezeigt, dass SSD673myc innerhalb eines Klons sehr heterogen exprimiert wird (Abbildung 27).



**Abbildung 27:** Übersichtsdarstellung des SSD673myc-überexprimierenden Klon A22. **Links:** Mit dem Myc-Antikörper (9E10) und dem Oregon Green-gekoppelten Sekundärantikörper angefärbte einzelne Zellen des Klon A22 zeigen eine stark heterogene Expression von SSD673myc. **Rechts:** Durchlichtaufnahme (DL) der Darstellung links. Der Maßstabsbalken entspricht 29  $\mu\text{m}$ .

Die Anzahl der Zellen des Klon A22, die über eine indirekte Immunfluoreszenz eine SSD673myc-Expression zeigen, ist sehr gering. Etwa jede 30. Zelle zeigt die schon in Abbildung 22 dargestellte subzelluläre Lokalisation im ER und in Golgi-ähnlichen Kompartimenten. Alle anderen Zellen zeigen nur die unspezifische Hintergrundfluoreszenz, die ebenfalls in wildtypischen Zellen sichtbar ist (Daten nicht gezeigt). Auch eine erneute Subklonierung dieser Zellen führte zu keiner homogenen SSD673myc-Expression.

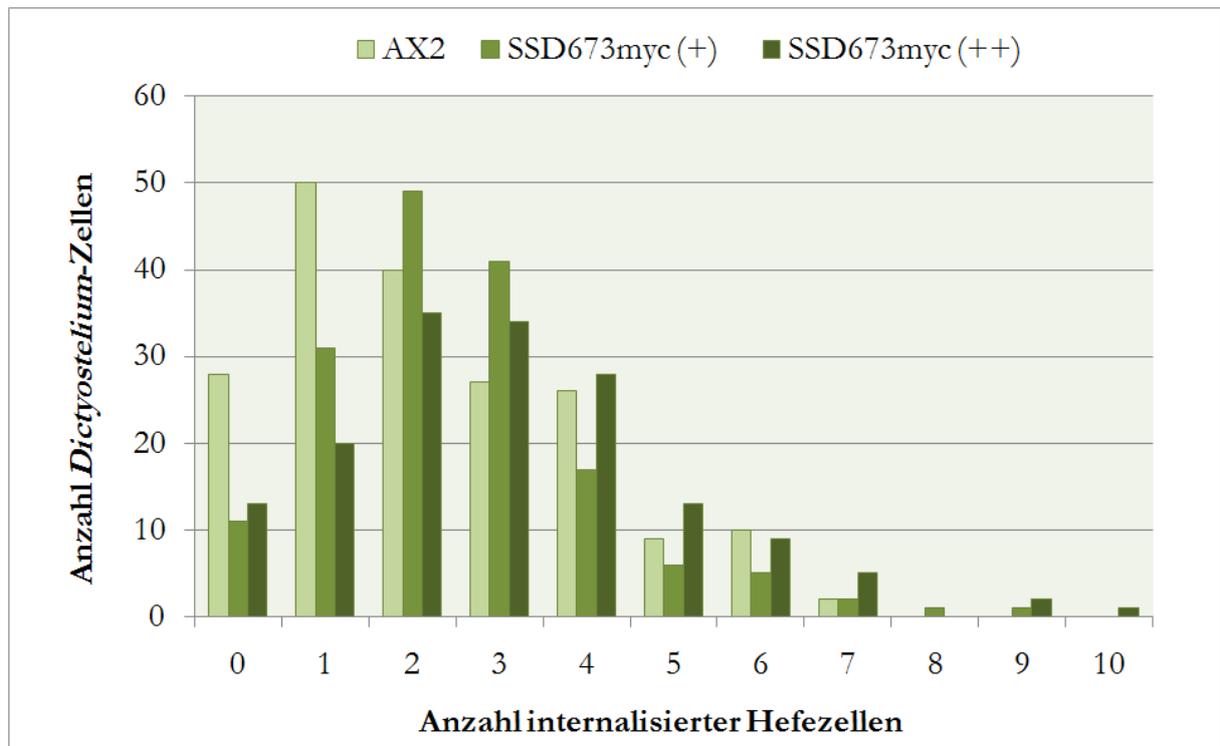
Die Frage, ob SSD673myc positiv auf die Phagozytose wirken kann, sollte dennoch beantwortet werden. Aufgrund der heterogenen Expressionslevel des Klon A22, wurde die Aufnahme von *Saccharomyces cerevisiae* in Zellen dieses Klon mikroskopisch untersucht (Abbildung 28) und gezählt (Abbildung 29).



**Abbildung 28:** Aufnahme einer indirekten Immunfluoreszenz von SSD673myc-überexprimierenden Zellen des Klon A22 mit internalisierten Hefezellen unter einem konventionellen Fluoreszenzmikroskop. **Links:** Zellen des Klon A22 und Wildtypzellen (hier nicht abgebildet) wurden für 30 min entsprechend der Methode 8.1.2.7 mit unmarkierten Hefezellen versetzt und anstelle einer fluorimetrischen Bestimmung einer Fixierung (vgl. 8.4.2 und 8.4.4) unterzogen. Zellen ähnlich der mit drei internalisierten Hefezellen wurden als stark fluoreszierend eingestuft, Zellen vergleichbar mit denen mit nur einer oder zwei Hefen als schwach leuchtend (Antikörper:  $\alpha$ -Myc (9E10), Sekundärantikörper: Oregon Green). **Rechts:** Durchlichtaufnahme kombiniert mit UV-Anregung der Aufnahme links. Der Maßstabsbalken entspricht jeweils 10  $\mu\text{m}$ .

Bei der Zählung der phagozytierten Hefezellen konnten insgesamt 192 Zellen des Wildtypstamms (AX2), 164 Zellen mit schwacher, bzw. 160 Zellen mit starker SSD673myc-Fluoreszenz untersucht werden. 1331 Hefezellen waren in diesen *Dictyostelium*-Zellen bereits internalisiert

worden. Deren Verteilung auf die drei Zelltypen ist in folgendem Diagramm (Abbildung 29) veranschaulicht.



**Abbildung 29: Verteilung der 1331 internalisierten Hefezellen auf wildtypische, SSD673myc stark, bzw. schwach exprimierende Zellen.** Innerhalb von 30 min haben SSD673myc-exprimierende Zellen mehr Hefezellen phagozytiert als der Wildtyp (AX2). Von starken Exprimierern (SSD673myc ++) wurden dabei bis zu 10 Hefezellen bevorzugt aufgenommen, von schwächer exprimierenden Zellen (SSD673myc +) überwiegend 2-3 Hefen und von AX2-Zellen größtenteils keine oder eine Hefe.

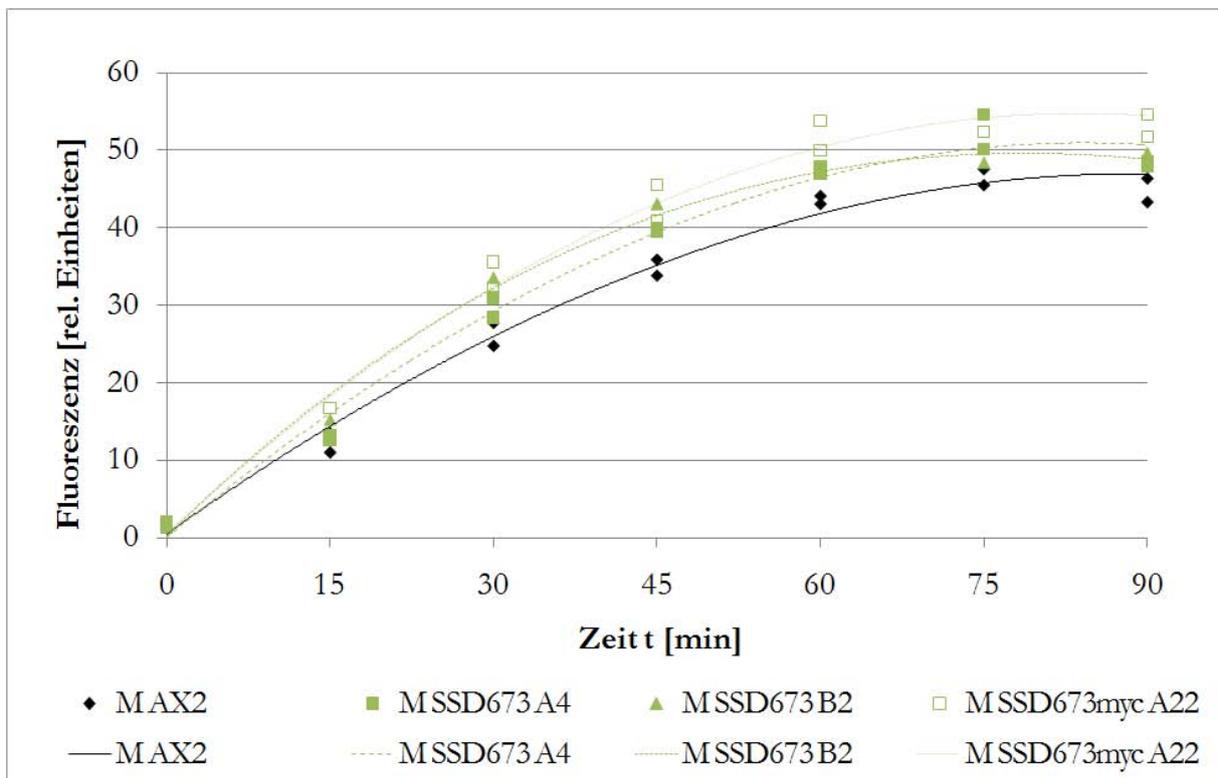
Somit gehen aus Abbildung 29 für den Wildtyp durchschnittlich 2,26, für schwache Exprimierer 2,51 und für stark fluoreszierende Zellen 3,04 internalisierte Hefezellen hervor. Dies impliziert eine positive Wirkung von SSD673myc auf die Phagozytose.

### 9.2.6 Konditioniertes Medium ermöglicht wildtypischen Zellen eine leicht effizientere Partikelaufnahme

Ob die Verknüpfung mit dem Epitop Einfluss auf die SSD673-Funktionalität hat, kann über Kontrollexperimente mit Zellen, die das unmarkierte SSD673 im Übermaß synthetisieren, überprüft werden.

Es ist an diesem Punkt allerdings darauf hinzuweisen, dass SSD673 am N-Terminus eine spaltbare Signalsequenz trägt und keine Transmembrandomänen aufweist (vgl. 9.2). Das Programm PSORT II sieht SSD673 daher als extrazelluläres Protein an. Auch SSD673myc wird als sekretorisches Protein eingeordnet. Es ist also möglich, dass SSD673 durch die Membran des ERs translatiert, im Inneren die ER-Signalsequenz abgespalten wird und es so löslich im ER vorliegt.

Über den sekretorischen Weg könnte SSD673 an die Plasmamembran transportiert und dort von der Zelle ins Medium ausgeschieden werden. SSD673 könnte dann sowohl auf die sekretierende Zelle selbst (autokrin) als auch auf Zellen in direkter Nachbarschaft (parakrin) wirken. Durch die Kultivierung von SSD673-überexprimierenden *Dictyostelium*-Zellen in Flüssigmedium, könnte SSD673 von diesen Zellen im Übermaß ins Medium abgegeben werden und so auf die Phagozytose umgebender Zellen einwirken. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde die Wirkung von auf diese Weise konditioniertem Medium auf die Partikelaufnahme von Wildtypzellen untersucht. Dazu wurden AX2-Zellen, SSD673- und SSD673myc-überexprimierende Zellen für 24 h in G<sub>0</sub>-Medium kultiviert, sodass sie eine Zelldichte von 2·10<sup>6</sup> Zellen/ml erreichten. Am folgenden Tag konnte das konditionierte Medium durch Zentrifugation von den Zellen entfernt werden. Parallel angesetzte Wildtypzellen wurden dann gerettet, mit diesen konditionierten Medien auf eine Zelldichte von 1,65·10<sup>6</sup> Zellen/ml eingestellt und in diesen für 2 Stunden bis zu einer Zelldichte von 2·10<sup>6</sup> Zellen/ml kultiviert. (8.1.2.6). Im Anschluss wurde die Auswirkung der unterschiedlichen Medien auf die Phagozytose der wildtypischen Zellen nach 8.1.2.7 gemessen. Die Messung zweier unabhängiger Experimente zeigt Abbildung 30.



**Abbildung 30: Phagozytoseverhalten von Wildtypzellen unter Einfluss konditionierten Mediums SSD673(myc)-überexprimierender Zellen (n=2).** Wildtypische Zellen wurden für 2 h in Medium (M) kultiviert, in welchem zuvor ebenfalls Wildtypzellen (AX2) oder SSD673-, bzw. SSD673myc-exprimierende Zellen angezogen worden waren.

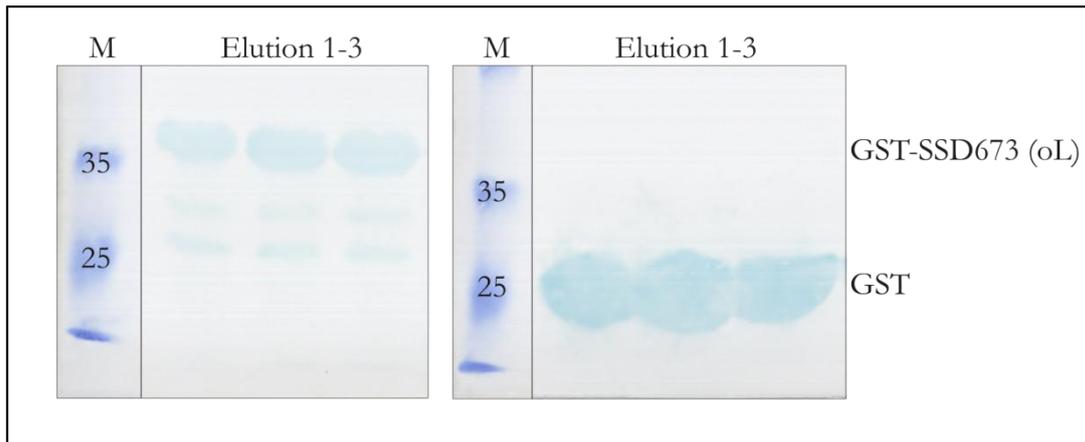
Die zweistündige Inkubation von AX2-Zellen in bereits von SSD673-Klonen beeinflusstem Medium bewirkt, dass Zellen des Wildtyps etwas effizienter Partikel aus ihrer Umgebung aufnehmen können. Diese nur sehr leichte Erhöhung könnte darauf zurückzuführen sein, dass, wie schon unter 9.2.5 gezeigt, die Expression für SSD673myc in *Dictyostelium*-Zellen sehr schwach und zwischen einzelnen Zellen sehr heterogen ist. Verhält sich SSD673 in gleicher Weise, was aufgrund nicht zur Verfügung stehender Antikörper nicht nachweisbar ist, könnte seine Synthese zu gering sein, um eine stärkere Phagozytose in AX2-Zellen auszulösen. Um dieses Problem zu umgehen, wurde rekombinantes SSD673 aus *E. coli*-Zellen aufgereinigt, um letztendlich auch dessen Wirkung auf die Phagozytose von *Dictyostelium*-Zellen zu untersuchen.

### 9.2.7 Bakterielle Überexpression von GST-SSD673 (oL)

Für die Überexpression von SSD673 in Bakterienzellen erfolgte zunächst die Klonierung des *Dictyostelium*-Gens in den Vektor pGEX-4T-3 (#754). Dieser Vektor trägt bereits das Gen für eine Glutathion-S-Transferase (GST) und weitere bakterielle Faktoren (*tac*-Promotor, *lac I<sup>q</sup>*-Gen), die eine Proteinsynthese ermöglichen. Durch die Klonierung von SSD673 in den Leserahmen des vorhandenen GST-Gens wird in *E. coli* das Fusionsprotein GST-SSD673 synthetisiert, welches im Nachhinein über Glutathion-gekoppelte Agarose aufgereinigt werden kann. Hierbei ist jedoch zu beachten, dass SSD673 ohne die ER-Signalsequenz (ohne *Leader* = oL) in den Vektor eingefügt wurde. Da die ER-Sequenz als spaltbar angesehen wird und von *E. coli* nicht prozessiert werden kann, wurde sie für die Klonierung von vornherein nicht berücksichtigt. Damit aus der Synthese in *E. coli*-Zellen ein SSD673-Protein resultiert, welches dem endogenen Protein in *Dictyostelium* in seinen Eigenschaften möglichst ähnlich ist, kann zusätzlich durch einen Verdau des Fusionsproteins mit der Protease Thrombin die Glutathion-S-Transferase vom SSD673 (oL) getrennt werden.

Für die Induktion der Synthese von GST-SSD673 (oL) wurde vorerst der Vektor #757 per Retransformation (8.1.1.3) in *Escherichia coli*-Zellen des Typs BL21 (DE3) eingefügt und diese nach 8.2.1.2 auf die Synthese von GST-SSD673 (oL) getestet. Die positiven Bakterienzellen wurden dann im größeren Maßstab kultiviert und das Fusionsprotein über Säulen mit Glutathion-Agarose aufgereinigt (8.2.1.2). Um für Kontrollexperimente ebenfalls die Glutathion-S-Transferase vorliegen zu haben, wurde diese auf die gleiche Weise mit Hilfe des Leervektors #754 synthetisiert und das Protein aufgereinigt.

In einem dreigeteilten Elutionsschritt konnte sowohl GST als auch das Fusionsprotein GST-SSD673 (oL) gewonnen werden. Mittels Westernblotanalyse eines 10 %igen PAA-Gels ließen sich beide Proteine in den Elutionsfraktionen nachweisen (Abbildung 31).



**Abbildung 31: Westernblotanalysen von Elutionsfraktionen der bakteriellen Überexpression und Aufreinigung von GST-SSD673 (oL), bzw. GST aus *E. coli* BL21 (DE3).** Links: Fraktionen 1 bis 3 der Elutionen nach der Aufreinigung von GST-SSD673 (oL). Durch den Antikörper  $\alpha$ -GST und den Sekundärantikörper 111-055-003 ist GST-SSD673 (oL) oberhalb von 35 kDa sichtbar. Rechts: Elutionsfraktionen 1 bis 3 der aufgereinigten Glutathion-S-Transferase. Die bereits genannte Antikörperkombination zeigt GST bei ~25 kDa. Auf die Zugabe des Verstärkers NBT wurde verzichtet. (M=Marker, Größenangaben in kDa).

Vergleicht man die Bandenstärke von GST-SSD673 (oL) (Abbildung 31, links) mit der der Glutathion-S-Transferase allein (Abbildung 31, rechts), so lässt sich augenscheinlich weniger GST-SSD673 (oL) über die Agarosesäulen isolieren, als GST allein. Darüber hinaus weisen die kleineren und schwächeren Banden auf dem Blot unterhalb des GST-SSD673 (oL) auf eine partielle Degradation des Fusionsproteins hin.

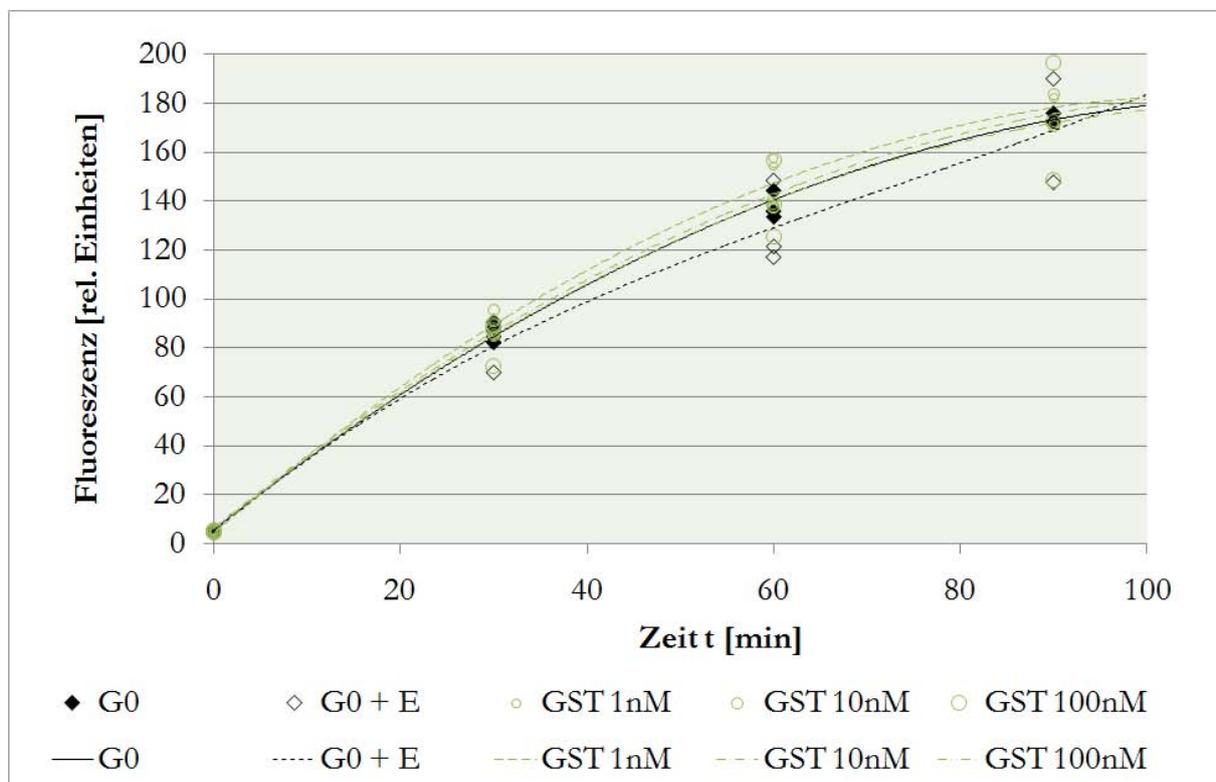
Um ein Maß für den Einsatz der isolierten Proteine in einem Phagozytoseexperiment zu haben, wurden die drei Elutionen vereinigt und der absolute Proteingehalt jeder gesammelten Elution im Vergleich mit den vom Hersteller mitgelieferten Proteinstandards (8.2.2.2) bestimmt. Ebenso wie auf den Westernblots der Abbildung 31 schon ersichtlich, konnten von GST mit ca. 1500  $\mu$ g die etwa sechsfache Menge gewonnen werden wie von GST-SSD673 (oL) (ca. 250  $\mu$ g). Mit Hilfe des Programms ProtParam des ExPASy Proteomics Servers konnte für GST ein Molekulargewicht von 27,8 kDa und für das Fusionsprotein ein Gewicht von 34,4 kDa errechnet werden. Mit Hilfe dieser Werte ergab sich für das in Elutionspuffer gelöste GST eine Konzentration von 107  $\mu$ M, während GST-SSD673 (oL) mit 14,8  $\mu$ M wesentlich geringer konzentriert vorlag.

Wie bereits oben erwähnt, ermöglicht die Expression von GST-SSD673 (oL) über den Vektor #757 ebenfalls, GST über eine Schnittstelle für die Protease Thrombin vom SSD673 (oL) abzutrennen. Die Behandlung des Fusionsproteins mit Thrombin erfolgt vor dem Elutionsschritt bereits an der Säule, so dass GST auf der Säule verbleibt und SSD673 (oL) eluiert wird. Leider konnte nach dem Thrombinverdau in einem mit Coomassie gefärbten PAA-Gel das SSD673 (oL) mit 8,2 kDa nicht nachgewiesen werden, wohl aber das 26 kDa schwere GST (Daten nicht gezeigt). Aufgrund dieses Ergebnisses wurde das Fusionsprotein ohne proteolytische Spaltung in

Form von GST-SSD673 (oL) eingesetzt und seine Wirkung auf das Phagozytoseverhalten von *Dictyostelium*-Zellen untersucht.

### 9.2.8 Bakteriell synthetisiertes GST-SSD673 (oL) verringert konzentrationsabhängig die Phagozytose von AX2-Zellen

Die Auswirkung von löslichen Faktoren im Kulturmedium von *Dictyostelium*-Zellen wurde indirekt unter 9.2.6 anhand konditionierten Mediums bereits gezeigt. Ob das aus *E. coli*-Zellen isolierte Fusionsprotein GST-SSD673 (oL) ebenfalls Auswirkungen auf die Phagozytose von wildtypischen Zellen hat, sollte zusätzlich geklärt werden. Die Wirkung von GST allein wurde in einem Kontrollexperiment untersucht (Abbildung 32).

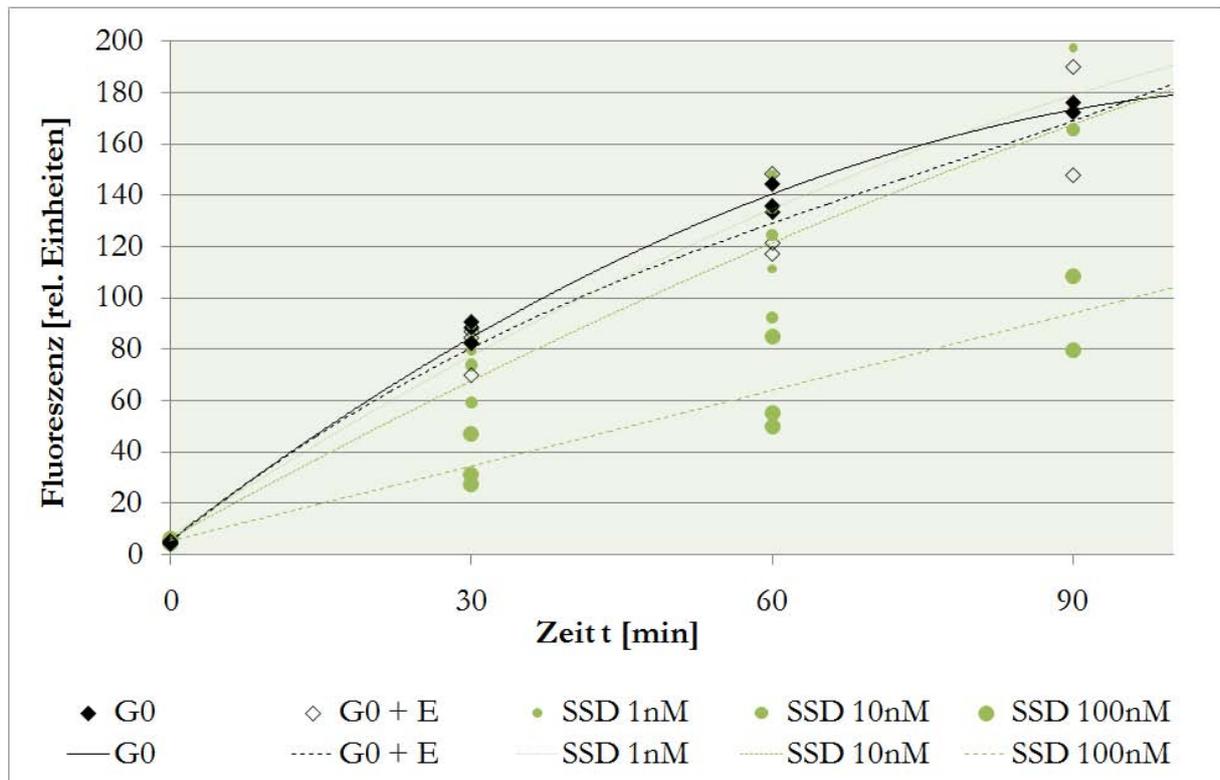


**Abbildung 32: Phagozytoseverhalten von wildtypischen Zellen unter Einfluss von bakteriell exprimierter Glutathion-S-Transferase (GST) im Medium (n=3).** Entsprechend 8.1.2.6 wurden je 14 ml einer AX2-Kultur mit jeweils 1 ml Elutionspuffer versetzt, in welchem GST unterschiedlich verdünnt vorlag (1 nM, 10 nM und 100 nM). Um Aussagen machen zu können, welche Wirkung allein der Elutionspuffer auf die Phagozytose hat, wurde einer 14 ml-Kultur 1 ml reiner Elutionspuffer zugefügt (G0+E). Als zusätzliche Kontrolle wurden Wildtypzellen mit 15 ml G<sub>0</sub>-Medium versetzt (G0). Die Kulturen wurden für 2 Stunden kultiviert und dann die Phagozytoserate nach 8.1.2.7 bestimmt.

Der Vergleich des Phagozytoseverhaltens macht deutlich, dass GST die Phagozytose der AX2-Zellen nicht verändern kann. Die wildtypischen *Dictyostelium*-Zellen, die entweder nur in G<sub>0</sub> oder aber mit zusätzlichem GST-Protein kultiviert worden waren, zeigen vergleichbare

Phagozytoserraten. Auch der Elutionspuffer allein fñhrt nicht zu einer Veränderung der Partikelaufnahme.

Ob allerdings durch die Verbindung von GST mit SSD673 (oL) ein Effekt auf die Phagozytose erzielt werden kann, zeigt Abbildung 33.



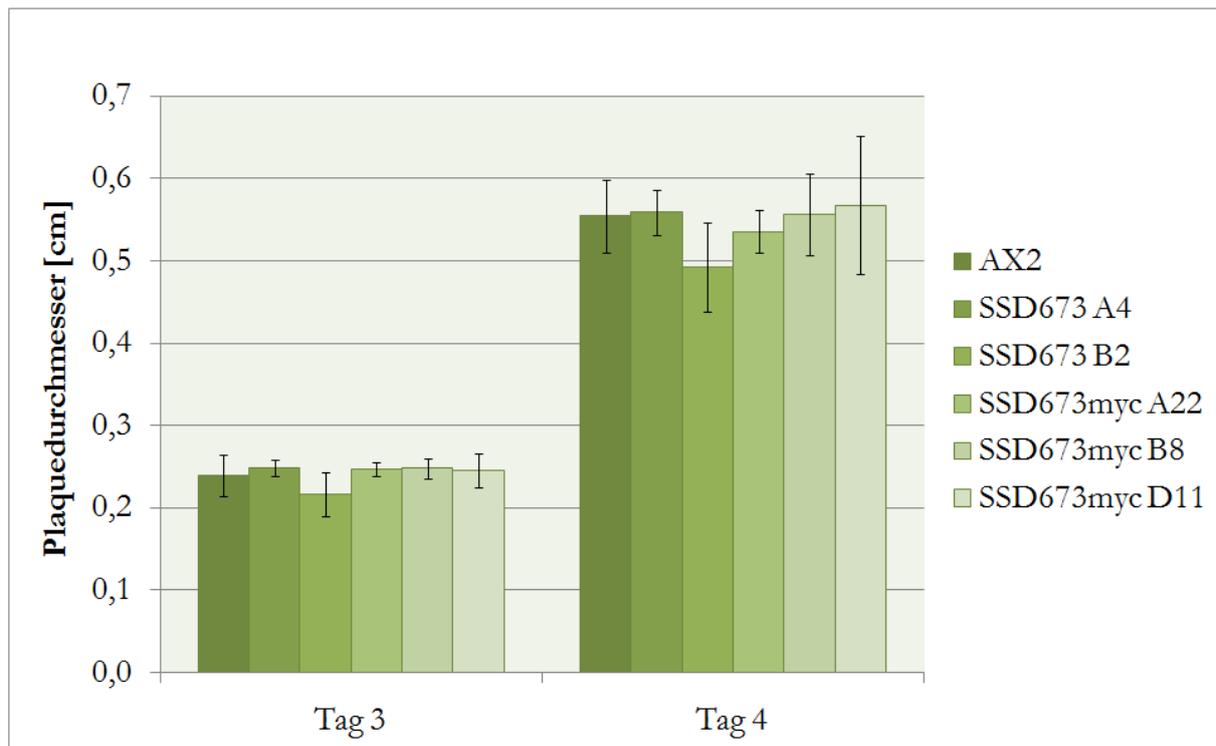
**Abbildung 33: Partikelaufnahme in AX2-Zellen in Abhängigkeit verschiedener Konzentrationen an GST-SSD673 (oL) im Medium (n=3).** 14 ml einer AX2-Kultur wurden mit jeweils 1 ml Elutionspuffer versetzt, in welchem GST-SSD673 (oL) unterschiedlich verdunnt vorlag (SSD 1 nM, 10 nM und 100 nM). Die Wirkung des Elutionspuffers allein wurde mit einer 14 ml-Kultur plus 1 ml reinem Elutionspuffer überprüft (G0+E). Wildtypzellen mit 15 ml G<sub>0</sub>-Medium versetzt dienten ebenfalls als Kontrolle (G0).

Die dreifache Bestimmung der Phagozytoserrate von AX2-Zellen unter Einfluss von GST-SSD673 (oL) im Medium in Abbildung 33 macht deutlich, dass GST-SSD673 (oL) konzentrationsabhängig die Partikelaufnahme in wildtypischen Zellen negativ beeinflusst. Das Verhalten von Zellen, deren Medium nur mit Elutionspuffer verdunnt wurde oder GST-SSD673 (oL) in einer Endkonzentration von nur 1 nM im Kulturmedium enthielt, bleibt im Vergleich zu AX2-Zellen in G<sub>0</sub>-Medium unverändert. Werden dem Medium hingegen 10 nM GST-SSD673 (oL) zugefügt, so nimmt die Phagozytose bereits leicht ab. Bei einer Konzentration von 100 nM sinkt die Partikelaufnahme in den Zellen des Wildtyps drastisch auf nur noch ca. 50 % der Rate der G<sub>0</sub>-kultivierten Vergleichszellen. Leider konnte zu keiner Zeit und mit keiner der getesteten Konzentrationen an GST-SSD673 (oL) eine Erhöhung der Phagozytose in AX2-Zellen nachgewiesen werden. Dieses Experiment zeigt sogar einen gegenteiligen Effekt von GST-SSD673 (oL) im

Vergleich zu den Phagozytosexperimenten mit einer Kultivierung in konditioniertem Medium (vgl. Abbildung 30).

### 9.2.9 Die Größe und Morphologie der Fresshöfe von SSD673-überexprimierenden und SSD673myc-exprimierenden Zellen bleibt unverändert

Bisher konnte für die SSD673(myc)-Klone gezeigt werden, dass ihre konditionierten Medien Wildtypzellen in ihrer Phagozytosefähigkeit positiv beeinflussen können. SSD673myc-überexprimierende Zellen zeigen mit dem Mikroskop betrachtet außerdem eine stärkere Aufnahme von Hefezellen. Liegt SSD673 im Signalweg zwischen AlyA und Gp70, so könnte die Überexpression von SSD673(myc) ebenfalls in vergrößerten Durchmessern der *Plaques* resultieren. Aus diesem Grund wurde auch für SSD673-Mutanten die Größe der *Plaques* bestimmt (Abbildung 34).

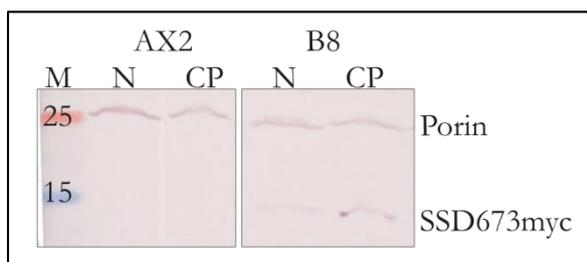


**Abbildung 34: Durchschnittliche Durchmesser der Fresshöfe von AX2-Zellen und SSD673-, bzw. SSD673myc-Exprimierern (n=5).** Zur Untersuchung der Ausbildung von Fresshöfen auf einem Bakterienrasen wurden Zellen des Wildtyps (AX2) und von SSD673-Mutanten (A4, B2), bzw. myc-markierten Mutanten (A22, B8, D11) jeweils entsprechend 8.1.2.8 mit Zellen des *E. coli*-Stammes B/2 ausplattiert und bei RT kultiviert.

Zwischen den *Plaque*-Durchmessern von wildtypischen Zellen (AX2) und SSD673-überexprimierenden (A4 und B2) sowie SSD673myc-exprimierenden Zellen (A22, B8 und D11) ist kein Unterschied feststellbar. Die erhöhte Expression von SSD673(myc) in den Klonen ver-

ändert weder die Größe der Fresshöfe noch konnte ein Unterschied in der Morphologie der Höfe zu wildtypischen *Plaques* festgestellt werden.

Die Genkopien von SSD673, die bei der Insertion der Vektoren #640 und #641 in Mehrfachwiederholungen in das Genom von *D. discoideum* eingebaut wurden, unterliegen dem Aktin15-Promotor. Dieser ist als konstitutiv aktiv bekannt. Vom Aktin6-Promotor hingegen weiß man, dass er kaum aktiv ist, wenn *Dictyostelium* auf Bakterienrasen kultiviert wird [122]. Auch für den Aktin15-Promotor sollte daher kontrolliert werden, dass SSD673(myc) während der Bildung von Fresshöfen wirklich exprimiert wird. Um nachzuprüfen, dass die unveränderten Fresshöfe nicht in der fehlenden Synthese von SSD673(myc) begründet sind, wurde eine sogenannte *Clearing Plate* (8.1.2.9) verwendet. Dafür wurden SSD673myc-exprimierende Zellen zusammen mit Bakterienzellen auf Agarplatten kultiviert. Anschließend wurde die Expression von SSD673myc in Gesamtzelllysaten der *Dictyostelium*-Klone mittels einer 15 %igen SDS-PAGE nachgewiesen (Abbildung 35).



**Abbildung 35: Westernblot mit Gesamtzelllysaten aus Schüttelkultur (N) oder von einer *Clearing Plate* (CP) von Wildtypzellen und des SSD673myc-Exprimierers B8.** Der Antikörper  $\alpha$ -Myc (9E10) bildet über den Sekundärantikörper 315-055-003 in beiden Spuren des Klons B8 eine dünne Bande. Die Ladekontrolle Porin (70-100-1) wurde getrennt entwickelt (N=5 $\cdot$ 10<sup>6</sup> Zellen, M=Marker, Größenangaben in kDa).

Für den Klon B8 zeigen sich sowohl in der Spur mit Zelllysate aus Schüttelkultur (N) als auch von der *Clearing Plate* (CP) die typischen schwachen Signale für SSD673myc. Das Signal in der Spur der Schüttelkultur fällt jedoch noch deutlich schwächer aus als das der CP-Spur. Selbstverständlich kann die SSD673myc-Expression in AX2-Zellen nicht nachgewiesen werden. Dieser Blot zeigt, dass der Aktin15-Promotor auch auf Bakterienrasen aktiv ist und der bei den SSD673(myc)-überexprimierenden Mutanten fehlende Phänotyp im *Plaque*-Durchmesser nicht in einer fehlenden Synthese von SSD673myc begründet ist.

Neben den unveränderten Durchmessern der Fresshöfe zeigen SSD673(myc)-überexprimierende Mutanten auch keine Veränderung in ihrer Gp70-Expression. Für diese Analyse wurden Gesamtzelllysate von Klonen untersucht, deren Zellen SSD673(myc) allerdings sehr heterogen synthetisieren. Für stark exprimierende SSD673myc-Mutanten konnte gezeigt werden, dass sie im Vergleich zu Wildtypzellen Hefezellen effektiver aus ihrer Umgebung aufnehmen können. Auch konditioniertes Medium der SSD673-Zellen beeinflusst die Phagozytose von AX2 positiv. Lediglich das Fusionsprotein GST-SSD673 (oL), welches in Bakterienzellen synthetisiert wurde,

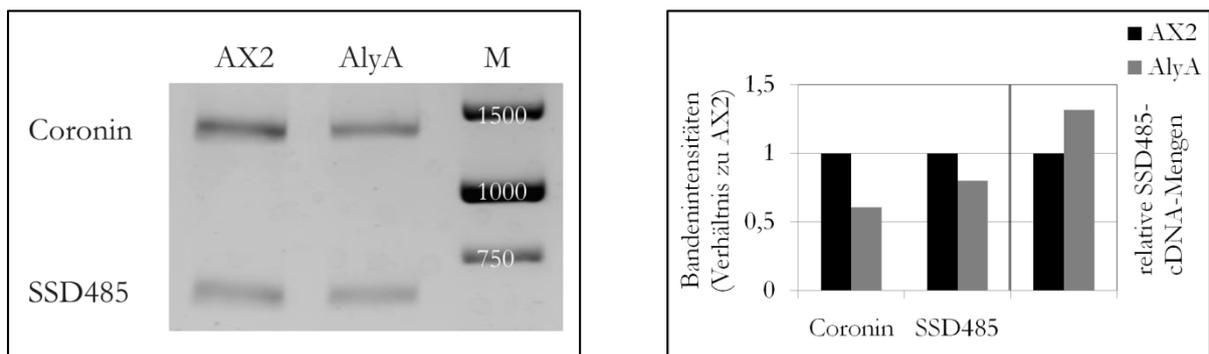
hemmt die Aufnahme der Partikel. Zellen, die SSD673 überexprimieren zeigen unter den genannten Versuchsbedingungen also einige, wenn auch nicht alle Eigenschaften, die für eine Funktion von SSD673 im AlyA-Signalweg sprechen. Dies muss jedoch im Detail diskutiert werden.

### 9.3 DDB0218583 (EST: SSD485)

Die Proteine DD3-3 und SSD673 wurden auf ihre Funktion in der Signalkaskade zwischen AlyA und Gp70 untersucht. Beide Proteine zeigten in AlyA-Mutanten eine erhöhte Expression, nicht jedoch in Gp70-Mutanten [76]. Eine Hochregulation um einen Faktor von 1,4 konnte I. Müller auch für das Protein DDB0218583 in AlyA-Mutanten zeigen. Da es auf den *Microarrays* über das EST SSD485 identifiziert wurde, wird DDB0218583 im Folgenden nur SSD485 genannt.

SSD485 ist aus 206 Aminosäuren aufgebaut, die zusammen ein Molekulargewicht von ca. 22,8 kDa ergeben. Das Gen für SSD485 liegt auf Chromosom 4 von *Dictyostelium discoideum* und hat eine Länge von 706 bp. Durch das Entfernen eines Introns bei der Prozessierung der RNA ergibt sich für SSD485 eine codierende Sequenz von 621 bp. Über SSD485 ist ebenso wie für die vorangegangenen Proteine DD3-3 und SSD673 sehr wenig bekannt. Seine Aminosäuresequenz lässt keinerlei konservierte Proteindomänen erkennen, die auf seine Funktionsweise hinweisen. Strukturell lassen sich für SSD485 allerdings neben einer ER-Signalsequenz am N-Terminus drei Transmembrandomänen und ein Glykosylphosphatidylinositol-Anker (GPI-Anker) vorhersagen.

Für DD3-3 und SSD673 wurde bereits gezeigt, dass die erhöhte Expression der beiden Gene auf den *Microarrays* der AlyA-Mutante ebenfalls in einer RT-PCR nachweisbar ist (vgl. 9.1 und 9.2). Dies gilt auch für SSD485 (Abbildung 36). Um die Expressionslevel der SSD485-mRNA relativ zu wildtypischen Zellen vergleichen zu können, wurde auch hier mit dem Oligo-dT-Primer (#418) die Gesamt-cDNA von wildtypischen Zellen und AlyA-*Knockout*-Mutanten hergestellt.



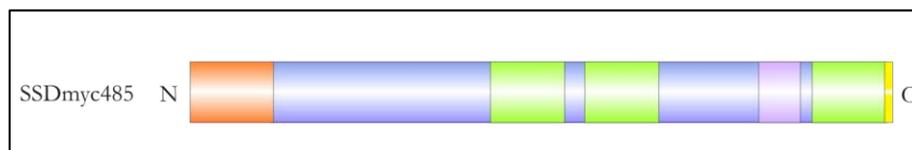
**Abbildung 36: Expressionsverhältnisse von SSD485 in Wildtyp- und AlyA-*Knockout*-Zellen.** Links: Aufgetrennte Amplifikate einer RT-PCR auf cDNA von Wildtyp- (AX2) und AlyA-*Knockout*-Zellen (AlyA) in einem *Multiplex*-Ansatz. Die größeren Coronin-Fragmente entstanden mit den *Primern* #75/#76 und die kürzeren SSD485-Fragmente mit den *Primern* #410/#411 (M=1 kb-Marker, Werte in bp). Rechts: Darstellung der Bandenintensitäten des Agarosegels links. Durch Normalisierung der Intensitäten auf die Coroninbande zeigen die AlyA-*Knockout*-Zellen relativ zu AX2-Zellen eine erhöhte Menge an SSD485-cDNA.

Nach der Anpassung der Coroninbandenstärke beider Zelltypen zeigt sich indirekt, dass die SSD485-mRNA in den AlyA-*Knockout*-Zellen in höheren Mengen vorliegt als in Wildtypzellen.

Hierbei lässt sich aus Abbildung 36 (rechts) ein Faktor von 1,3 ablesen, was fast den Ergebnissen der *Microarray*-Analyse mit einem Faktor von 1,4 entspricht. Die Übereinstimmung beider Ergebnisse war Anlass für den Versuch, auch SSD485 in wildtypischen *Dictyostelium*-Zellen überzuexprimieren.

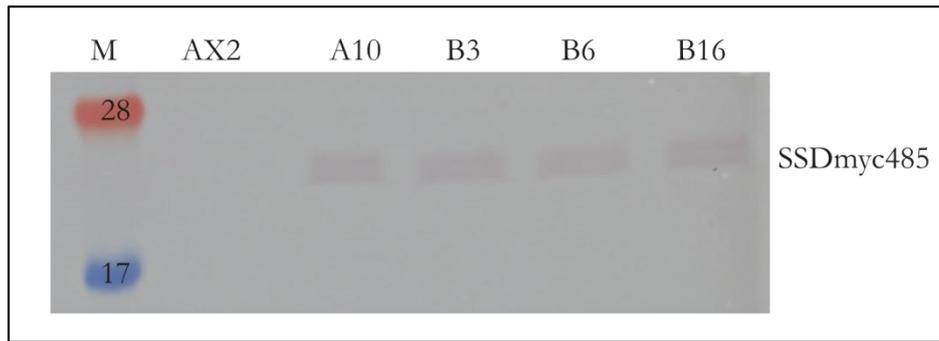
### 9.3.1 Die Lokalisation von SSDmyc485 verteilt sich auf das Endoplasmatische Retikulum, die Plasmamembran und vesikelähnliche Strukturen in der Zellperipherie

Das Fehlen eines direkt gegen SSD485 gerichteten Antikörpers musste auch für das Protein SSD485 durch Fusion mit einem fluoreszierenden Protein oder einem Epitop umgangen werden. Betrachtet man den Aufbau von SSD485, wird deutlich, dass von einer Fusion mit GFP abgesehen werden musste. Für eine Verbindung von GFP mit dem N-Terminus von SSD485 war die Wahrscheinlichkeit zu groß, dass die ER-Signalsequenz nicht erkannt wird und GFP-SSD485 folglich falsch lokalisiert. Eine C-terminale Fusion war ebenfalls unvorteilhaft, da für SSD485 ein GPI-Anker vorhergesagt wird. Um dessen mögliche Funktion ebenfalls nicht zu zerstören, fiel die Entscheidung auf eine Insertion des Myc-Epitops kurz vor der letzten Transmembrandomäne (siehe Abbildung 37).



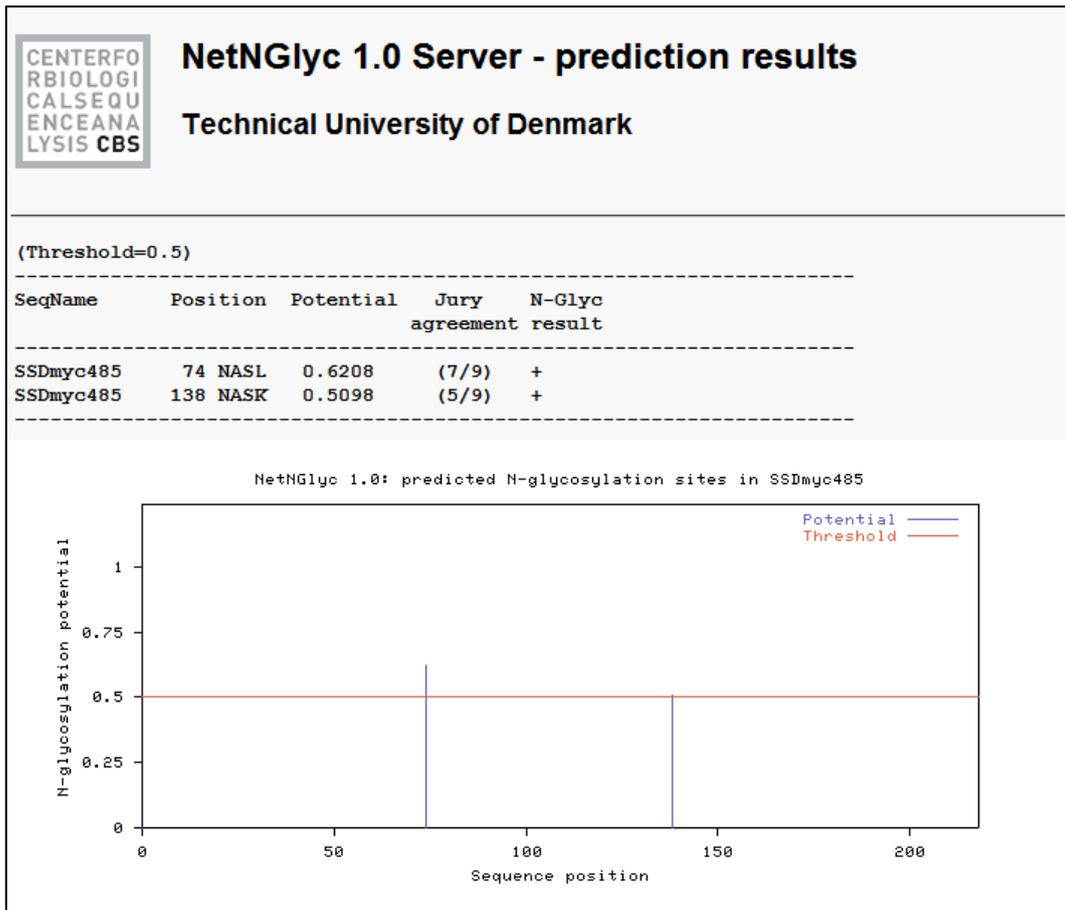
**Abbildung 37: Schema des Fusionsproteins SSDmyc485.** Um SSD485 in Immunfärbungen und -blots nachweisen zu können, wurde vor die dritte Transmembrandomäne (grün) das Myc-Epitop (violett) inseriert. Die ER-Signalsequenz (rot) und der GPI-Anker (gelb) blieben unverändert.

Um SSDmyc485 in *Dictyostelium*-Zellen synthetisieren zu lassen, wurden Wildtypzellen mit dem Vektor pDex RH SSDmyc485 (#639) transformiert und in  $G_{10}$ -Medium selektiert. Dies resultierte in vier Klonen aus zwei unabhängigen Transformationen (A und B, Abbildung 38).



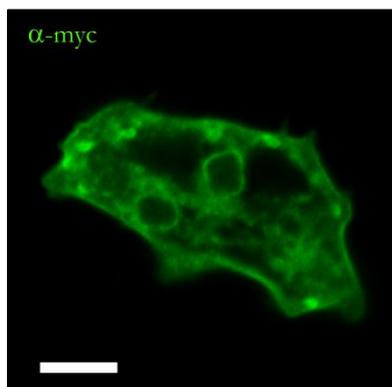
**Abbildung 38: Westernblot einer 15 %igen SDS-PAGE mit Gesamtzelllysaten positiver SSDmyc485-Klone.** Im Vergleich zum Wildtyp (AX2) zeigen die Klone A10, B3, B6 und B16 eine deutliche Bande bei ca. 24,1 kDa, welche durch den Antikörper  $\alpha$ -Myc (9E10) hervorgerufen wird (M=Marker, Größenangaben in kDa).

Alle vier SSDmyc485-Klone zeigen eine schwache Bande. Es ist jedoch auffällig, dass sie sehr unscharf ist. Die Klone A10 und B16 lassen zusätzlich eine leichte Doppelbande erkennen. Diese verschwommenen Doppelbanden konnten auch schon auf dem Westernblot mit markiertem DD3myc3-Protein beobachtet werden (Abbildung 8). Sie sind häufig ein Hinweis auf Glykosylierungen. Es wurde daher auch die SSDmyc485-Proteinsequenz auf diese Modifikationen untersucht. Der DictyOGlyc 1.1 Server konnte für SSDmyc485 keine O-Glykosylierungsposition identifizieren. Der NetNGlyc 1.0 Server sagt für das Fusionsprotein aber zwei potentielle Stellen für eine N-glykosidische Modifikation voraus (Abbildung 39).



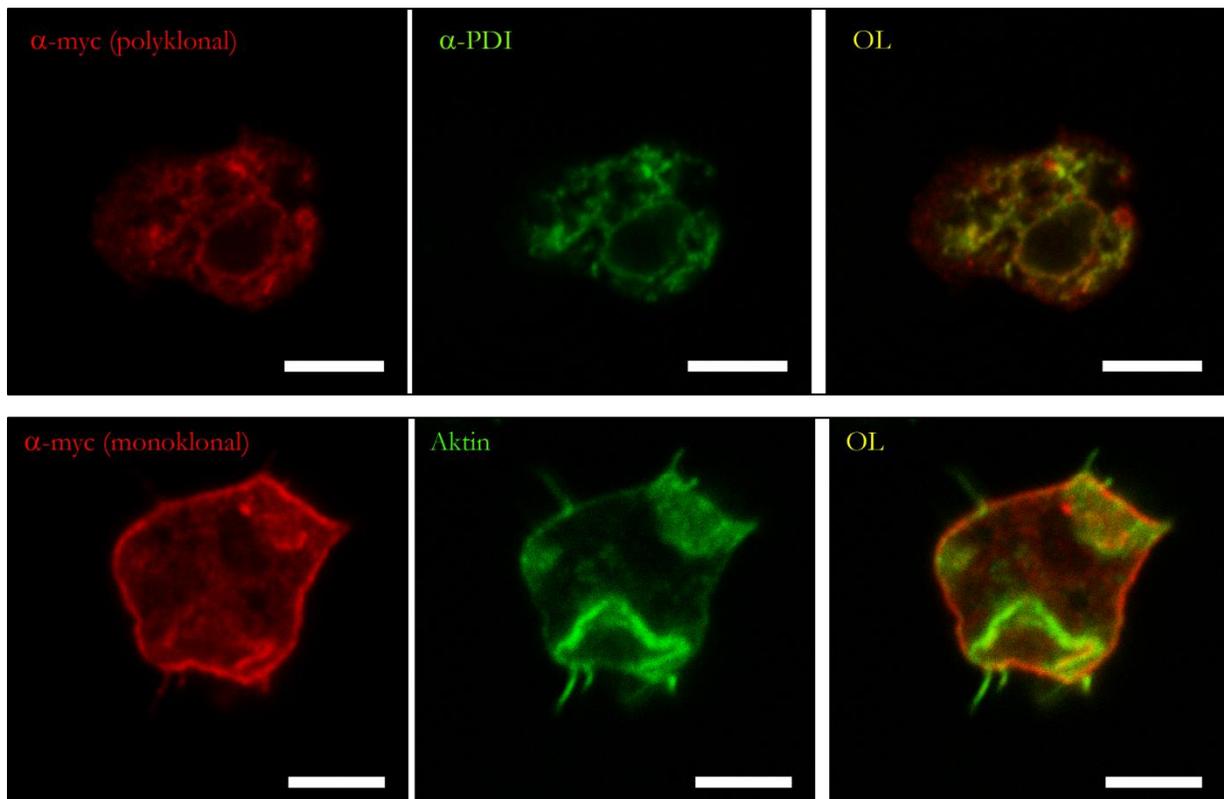
**Abbildung 39: Identifikation von N-Glykosylierungsstellen in SSDmyc485 durch den NetNGlyc 1.0 Server.** Der Server erkennt zwei potentielle Glykosylierungsstellen in SSDmyc485. Die Aminosäure 74 wird zu 62 % glykosyliert, während die Position 138 mit 51 % nur knapp über dem vorgegebenen Schwellenwert liegt.

Die N-Glykosylierung von Proteinen findet nach der Translation im ER statt. Dies passiert bevor die Proteine beispielsweise weiter an die Plasmamembran transportiert oder sekretiert werden. Indirekte Immunfluoreszenzen mit den SSDmyc485-Klonen A10 und B16 zeigen, dass SSDmyc485 tatsächlich im ER und an der Plasmamembran verteilt ist. Die indirekte Immunfluoreszenz in Abbildung 40 zeigt die intrazelluläre Verteilung von SSDmyc485 beispielhaft am Klon B16. Die Färbungen des Klons A10 wiesen die gleichen Charakteristika auf.



**Abbildung 40: Intrazelluläre Lokalisation von SSDmyc485.** Zellen des Klons B16 wurden mit dem Antikörper  $\alpha$ -Myc (9E10) inkubiert und anschließend mit dem Oregon Green-gekoppelten Sekundärantikörper (O-6380) behandelt. Der Maßstabsbalken entspricht 5  $\mu$ m.

Abbildung 40 zeigt deutlich, dass SSDmyc485 vier verschiedene Strukturen in den Zellen anfärbt. Innerhalb der Zelle sind zwei ringförmige Strukturen und Netzstrukturen im Zytoplasma erkennbar. Die Peripherie ist hauptsächlich durch stark angefärbte Punkte und eine klare Linie im Bereich der Plasmamembran charakterisiert. Die Ringe und Netzstrukturen lassen sich durch eine Kofärbung mit dem Antikörper gegen die PDI erklären (Abbildung 41).



**Abbildung 41: Partielle Kolokalisation von SSDmyc485 mit der PDI, nicht jedoch mit dem aktiven Zellkortex. Obere Reihe:** Die Zellen des Klons B16 wurden mit den Antikörpern  $\alpha$ -Myc (polyklonal, #2272) und  $\alpha$ -PDI (221-64-1) behandelt und anschließend mit den sekundären Antikörpern 315-165-003 und O-6380 inkubiert. Dies führt teilweise zu einer Kolokalisation von SSDmyc485 und der PDI (OL, Maßstabsbalken: 5  $\mu$ m) **Untere Reihe:** Vergleich der SSDmyc485-Lokalisation mit der Aktinverteilung im Klon B16. Die Zellen wurden einer Färbung mit dem monoklonalen  $\alpha$ -Myc-Antikörper (9E10) in Kombination mit dem Cy3-Antikörper 315-165-003 unterzogen. Durch den zusätzlich verwendeten Farbstoff AlexaFluor488-Phalloidin wurde filamentöses Aktin spezifisch angefärbt. Die Maßstabsbalken entsprechen 4  $\mu$ m.

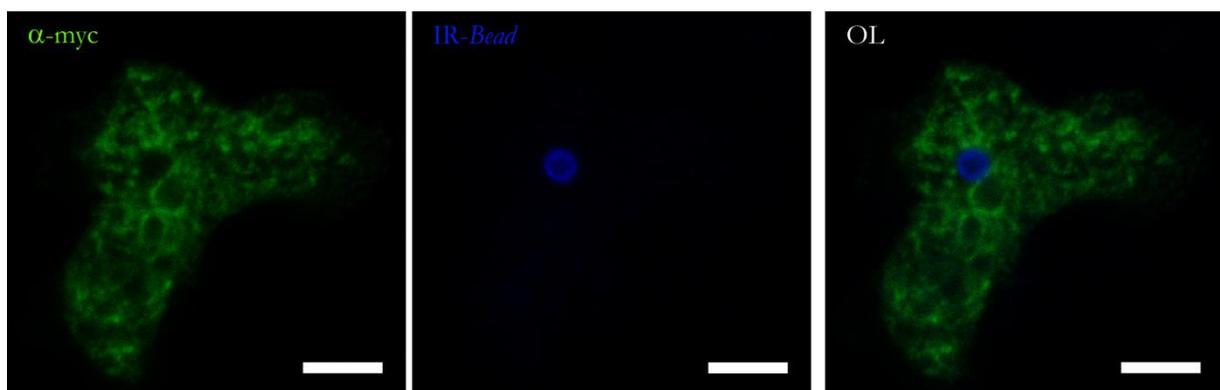
Die obere Bilderreihe der Abbildung 41 zeigt deutlich, dass die Ringe und Netzstrukturen charakteristisch für die PDI sind und daher das ER darstellen. Es werden jedoch zahlreiche Punkte und kleine Ringe nur vom polyklonalen Myc-Antikörper, nicht jedoch von  $\alpha$ -PDI erkannt.

Die untere Bilderreihe der Abbildung 41 zeigt eine Vergleichsfärbung zwischen SSDmyc485 und dem an einen Fluoreszenzfarbstoff gekoppelten Phalloidin. Da Phalloidin an filamentöses Aktin bindet [63], lässt sich dadurch in den Zellen vor allem der aktive Zellkortex anfärben. Es ist offensichtlich, dass die starke durch den monoklonalen Myc-Antikörper gefärbte Linie nicht mit

dem Großteil des Phalloidinsignals kolokalisiert. SSDmyc485 häuft sich daher in der Plasmamembran und nicht im aktiven Kortex an.

Die Lokalisation von SSDmyc485 in beiden Bilderreihen ist sehr unterschiedlich. Das liegt zum einen daran, dass für die Abbildung des Zellkortex eine andere Ebene gewählt werden musste als für die Kolokalisation mit der PDI. Darüber hinaus ist die Spezifität des polyklonalen Myc-Antikörpers nicht vergleichbar mit der des monoklonalen Antikörpers. Ersterer zeigt erfahrungsgemäß immer eine hohe unspezifische Hintergrundfluoreszenz und konnte die Plasmamembran oft nicht markieren.

Für das Lysozym AlyA konnte gezeigt werden, dass es auch auf Phagosomen lokalisiert. SSDmyc485 verteilt sich ebenfalls auf kleine Punkte und Ringe und wirkt möglicherweise in der Signalkaskade am gleichen Ort wie AlyA. Verfüttert man den Zellen Polystyrolkugeln (*Beads*), die durch Infrarotstrahlung (IR) angeregt werden können, kann mit Hilfe des CLSMs der Verbleib der *Beads* in den Zellen verfolgt werden. Die Abbildung 42 zeigt Aufnahmen einer Zelle des Klons B16, die bereits ein IR-*Bead* inseriert hat.



**Abbildung 42: Aufnahmen einer SSDmyc485-markierten Zelle mit inseriertem Latexkugelnchen.**  $1 \cdot 10^6$  Zellen/ml des Klons B16 wurden entsprechend 8.4.2 auf Deckgläschen pipettiert und nach dem Absitzen das Medium entfernt. Nach Zugabe von  $6 \cdot 10^6$  unter Infrarotstrahlung (IR) sichtbaren *Beads*/ml P-Puffer konnten die *Dictyostelium*-Zellen diese für 20 min phagozytieren. Die Zellen wurden dann wie gewohnt mittels Paraformaldehyd fixiert und mit dem Myc-Antikörper (9E10) und dem sekundären Antikörper O-6380 gefärbt (Maßstabsbalken = 5  $\mu$ m).

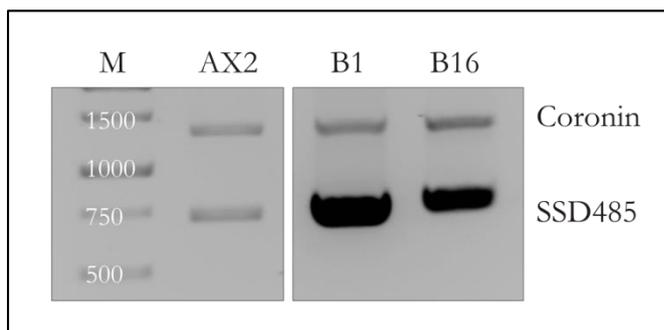
Für den abgebildeten Klon B16, aber auch für den Klon A10 (nicht gezeigt), konnte beobachtet werden, dass sich SSDmyc485 nicht um das phagozytierte Partikel anhäuft. Während der Ring neben dem *Bead* vermutlich den von SSDmyc485 umschlossenen Zellkern darstellt, bleibt der Bereich um das Kugelnchen frei von SSDmyc485. Es konnte in keiner der Zellen und auch nicht zu verschiedenen Zeitpunkten ein von einem Myc-Signal umschlossenes Partikel beobachtet werden.

### 9.3.2 Isolation von drei unabhängigen SSD485-überexprimierenden Klonen

Die Überexpression von SSD485 in einer nicht markierten Form erfolgte über die Transformation von wildtypischen *Dictyostelium*-Zellen mit dem Vektor #638. Aus drei unabhängigen Transformationen (B, C und D) wurde je ein Klon isoliert.

Die drei Transformationen wurden in sehr unterschiedlichen Zeiträumen durchgeführt, sodass die drei Mutanten teilweise aus unterschiedlichen Chargen an Wildtypzellen hergestellt wurden. Der Klon der Transformation B wurde in allen Experimenten mit seinem Elternstamm verglichen. Da auch der SSDmyc485-überexprimierende Klon B16 aus demselben Elternstamm hervorging, wurde er zum Vergleich mit dem Klon B1 zusammen untersucht. Die Klone der Transformationen C und D hingegen entstammen einer anderen Wildtypcharge. Sie sind daher in den folgenden Experimenten immer mit ihrem Elternstamm separat aufgeführt.

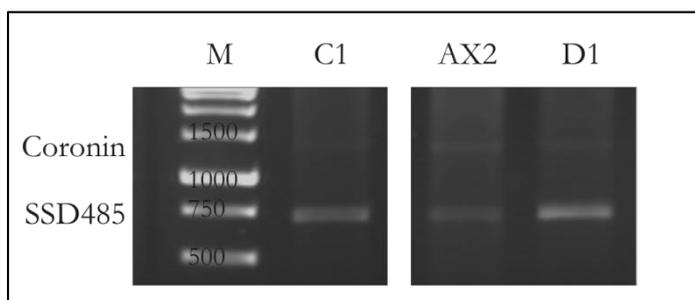
Für alle Klone konnte eine erhöhte Insertion der SSD485-Sequenz über eine PCR nachgewiesen werden (Abbildung 43 und Abbildung 44).



**Abbildung 43: Aufgetrennte Produkte einer Multiplex-PCR auf die gDNA von Wildtyp- und SSD(myc)485-Zellen der Transformation B.** Die gDNA wurde von AX2, dem SSD485-Klon B1 und dem SSDmyc485-Klon B16 nach 8.3.9.2 isoliert und mit den Primern #75/#76 das Coronin und SSD485 über die Primer-Kombination #410 und #411 amplifiziert. Coronin dient der internen Kontrolle (M=1 kb-Marker, Größenangaben in bp).

In beiden Klonen liegt die DNA-Sequenz von SSD485 um ein Vielfaches häufiger vor, als in wildtypischen Zellen. Da durch die Primer #410 und #411 die volle Länge des SSD485-Gens amplifiziert wird, ist anhand der leicht größeren SSD485-Bande beim Klon B16 die Insertion des Myc-Epitops direkt nachweisbar.

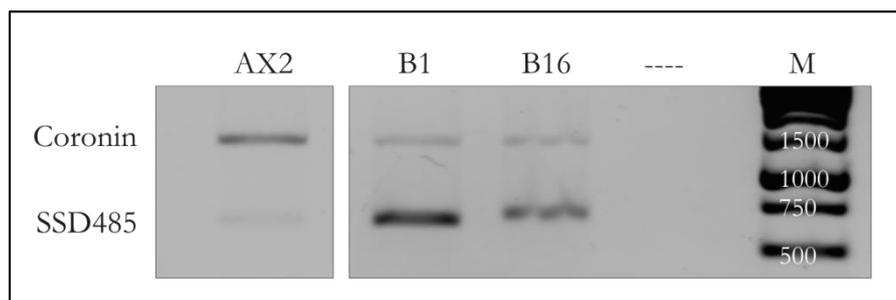
Die Klone der Transformation C und D zeigen in Abbildung 44 ein ähnliches Bild.



**Abbildung 44: Produkte einer PCR auf die gDNA von SSD485-Klonen der Transformation C und D verglichen mit dem Wildtyp.** Mit den bereits für Abbildung 43 verwendeten Primer-Kombinationen konnten das Coronin (~1300 bp) und SSD485-Gen (~700 bp) in einem Ansatz amplifiziert werden. Ersteres dient als Kontrolle (M=1 kb-Marker, Größenangaben in bp).

Auch die unabhängigen Klone C1 und D1 zeigen trotz der sehr schwachen Kontrollbanden (Coronin), dass die SSD485-Sequenz durch den Vektor #638 häufiger im Genom vorhanden ist als in wildtypischen Zellen. Der Klon D1 zeigt sogar eine leicht höhere Kopienanzahl des SSD485-Gens als der Klon C1.

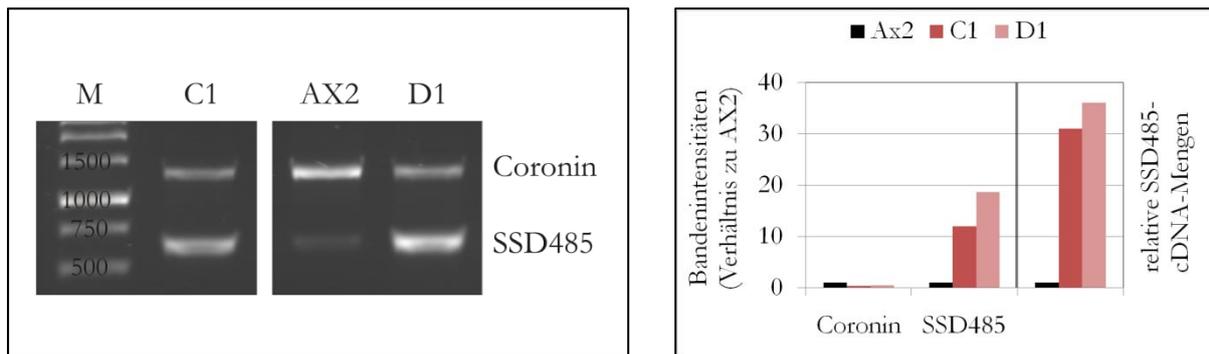
Wie bereits für DD3-3 und SSD673 beschrieben, wurde auch in den SSD485-Mutanten mit einer RT-PCR kontrolliert, ob die erhöhte Kopienanzahl des SSD485-Gens zu einer verstärkten Transkription führt (Abbildung 45).



**Abbildung 45: Gelelektrophorese einer *Multiplex-PCR* auf cDNA *SSD(myc)485*-überexprimierender Klone.** Es wurden die gleichen *Primer*-Kombinationen wie für die Abbildung 43 und Abbildung 44 eingesetzt. Die Vorlage für die PCR stellte diesmal jedoch die Gesamt-cDNA der Wildtypzellen (AX2), des SSD485-Klons B1 und des SSDmyc485-Klons B16. Die Coroninbanden dienen der Normierung auf gleiche PCR-Produktlevel (M=1 kb-Marker, Größenangaben in bp).

Die erhöhte Expression für SSD485 ist auch auf mRNA-Ebene für den Klon B1 und B16 nachweisbar. Dabei ist anhand der Fragmentgröße beim Klon B16 wieder die Insertion der Myc-Sequenz erkennbar. Vergleicht man die Stärken der SSD485-Banden zwischen Klon B1 und B16 zeigen sie untereinander ähnliche Verhältnisse wie schon auf gDNA-Ebene.

Die Ergebnisse der PCR auf die cDNA der Klone C1 und D1 ist in Abbildung 46 zu sehen. Der Einsatz der bekannten *Primer* führt auch hier zum Nachweis einer erhöhten mRNA-Synthese von SSD485 verglichen mit dem Wildtyp. Da die Coroninkontrollbande in ihren Intensitäten sehr unterschiedlich erscheint, wurde zusätzlich eine Auswertung mit dem Programm ImageJ durchgeführt (Abbildung 46, rechts).

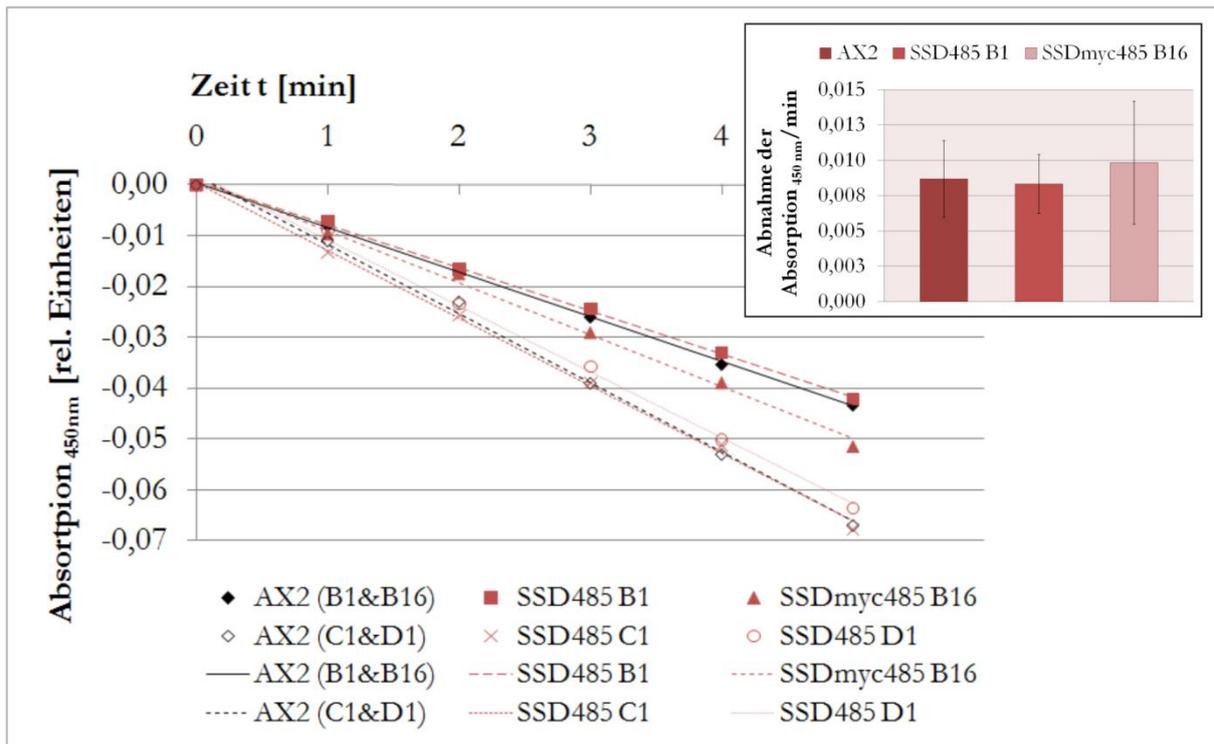


**Abbildung 46: SSD485-Expressionsvergleich zwischen Überexprimierern und Wildtypzellen anhand einer Multiplex-RT-PCR.** Links: Agarosegel mit den Produkten einer PCR auf cDNA von Wildtyp- (AX2) und den SSD485-überexprimierenden Klonen C1 und D1. Die Coroninfragmente entstanden mit den Primern #75/#76 und die kürzeren SSD485-Fragmente mit den Primern #410/#411 (M=1 kb-Marker, Werte in bp). Rechts: Darstellung der Bandenintensitäten des Agarosegels links. Die Intensitäten wurden auf die Coroninbande normalisiert (M=1 kb-Marker, Größenangaben in bp).

AX2 zeigt anhand der intensivsten Coroninbande, dass hier mehr PCR-Produkt in die Spur geladen wurde, als für die C1- und D1-Mutante. Trotzdem fällt die SSD485-Bande des Wildtyps viel schwächer aus. Nach Normierung auf die Coroninbandenintensität mittels ImageJ ist offensichtlich, dass in den Mutanten eine sehr viel stärkere Transkription von SSD485-mRNA stattfindet als im Wildtyp.

### 9.3.3 Die Lysozymaktivität bleibt von der SSD(myc)485-Überexpression unbeeinflusst

Die Auswirkungen der SSD485-, bzw. SSDmyc485-Überexpression wurden nun auf eine Rückkopplung auf die Lysozymaktivität untersucht. Die Abbildung 47 stellt die Lysozymaktivität in den Gesamtzelllysaten der vier Mutanten und den Wildtypchargen dar. Da beide Elternstämme in dieser Abbildung nebeneinander erscheinen, müssen die Mutanten stets mit dem dazugehörigen AX2 verglichen werden.



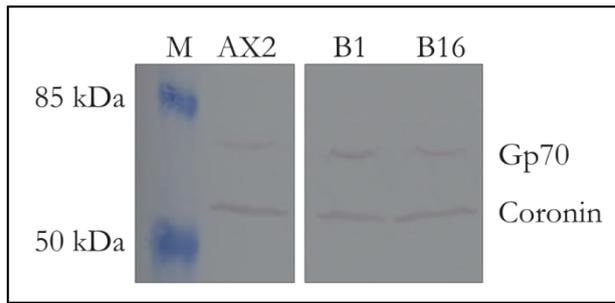
**Abbildung 47: Lysozymaktivität SSD(myc)485-überexprimierender Zellen im Vergleich mit ihrem jeweiligen wildtypischen Elternstamm.** Die dargestellte Lysozymaktivität setzt sich für Zellen des Klons B1 (SSD485), B16 (SSDmyc485) und dem zugehörigen Wildtyp (AX2 (B1&B16)) aus drei unabhängigen Experimenten zusammen (n=3). Die Klone C1 und D1 wurden mit ihrem Elternstamm (AX2 (C1&D1)) nur einmal vermessen (n=1). **Balkendiagramm:** Aus den negativen Steigungen der Lysozymaktivitäten ermittelte Lyseraten des SSD485- und SSDmyc485-überexprimierenden Klons B1 und B16 und von Wildtypzellen (Ax2 (B1&B16)). Da die Klone C1 und D1 nur einmal vermessen wurden, erfolgte die Darstellung ihrer Lyseraten mit den Standardabweichungen in einem Diagramm nicht.

Die Lysozymaktivität ist in den unmarkierten SSD485-Mutanten B1, C1 und D1 unverändert, wenn man sie mit ihren Elternstämmen AX2 (B1&B16) und AX2 (C1&D1) vergleicht. Der myc-markierte Überexprimierer (B16) zeigt im Mittel eine unwesentlich höhere Aktivität, als sein Elternstamm AX2 (B1&B16). Dass diese Abweichung nicht signifikant ist, zeigt sich an den Standardabweichungen der Lyseraten der B16-Mutanten (Abbildung 47, Balkendiagramm).

SSD485 kann daher keine Rückkopplung auf die Lysozymaktivität zugeschrieben werden.

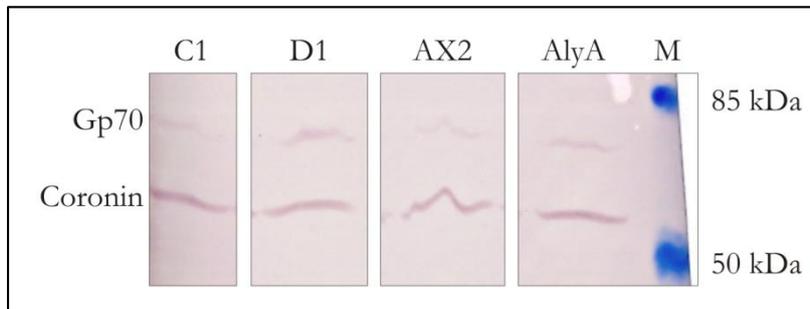
### 9.3.4 Überexprimiertes SSD485 führt zu einem Anstieg in der Gp70-Expression

Die Gp70-Expression der SSD485-Mutanten wurde genau wie für die Proteine DD3-3 und SSD673 mit Hilfe von Westernblotanalysen untersucht. Tatsächlich konnte so für alle unabhängigen Klone eine verstärkte Synthese von Gp70 nachgewiesen werden. Auch im Klon B16, der die myc-markierte Variante von SSD485 exprimiert, ist Gp70 erhöht. Die Abbildung 48 zeigt die Untersuchung an Wildtypzellen und Zellen der Klone B1 und B16.



**Abbildung 48: Gp70-Expressionsanalyse mittels Westernblot von Gesamtzelllysaten des SSD485-Klons B1, des SSDmyc485-exprimierenden Klons B16 und wildtypischer Zellen (AX2).** Die Antikörper  $\alpha$ -Gp70 (130-80-2) und  $\alpha$ -Coronin (176-3D-6) in Kombination mit dem Sekundärantikörper 315-055-003 markieren die Esterase bzw. die Ladekontrolle Coronin ( $2 \cdot 10^6$  Zellen/Spur, M=Marker).

Aufgrund der fast identischen Coroninbanden lässt sich direkt erkennen, dass die Klone B1 und B16 beide eine stärkere Gp70-Expression vorweisen können als wildtypische Zellen. Auch für die später hergestellten Klone C1 und D1 lässt sich eine erhöhte Esteraseexpression zeigen (Abbildung 49).



**Abbildung 49: Gp70-Level in SSD485-Klonen verglichen mit Wildtyp- und AlyA-Knockout-Zellen.** Gp70 lässt sich in den Klonen C1, D1, AX2 und der AlyA-Mutante in unterschiedlichen Mengen nachweisen. Coronin dient der Kontrolle geladener Proteinmengen ( $3 \cdot 10^6$  Zellen/Spur, M=Marker).

Bei ungefähr gleicher Bandenstärke von Coronin erscheinen die Gp70-Banden der Mutanten C1 und D1 leicht stärker als in Wildtypzellen. Die Bande des Klons D1 zeigt sogar eine Intensität vergleichbar mit dem Gesamtzelllysate des AlyA-Knockouts. Im Gegensatz zu den Proteinen DD3-3 und SSD673 kann ein deutlicher Effekt von SSD485 auf die Esterase Gp70 registriert werden. Wird SSD485 im Übermaß exprimiert so führt dies wie in den AlyA-Knockout-Mutanten zu einer verstärkten Expression von Gp70.

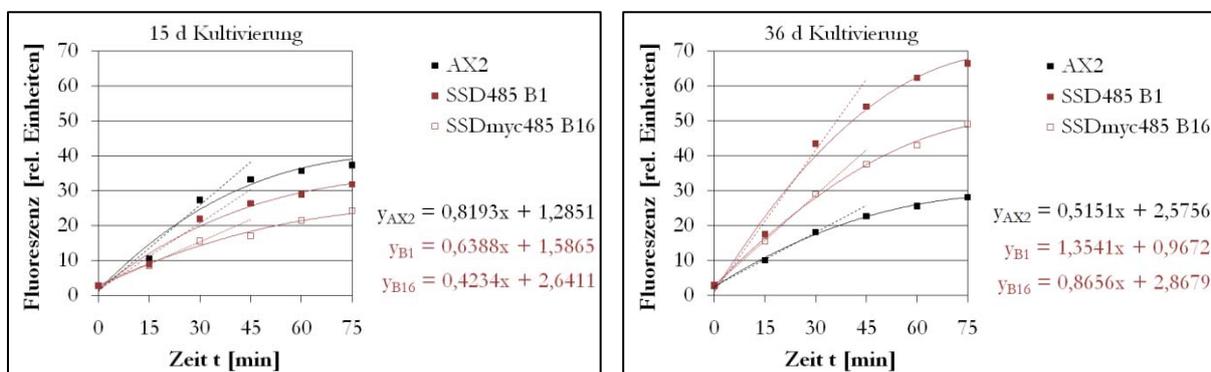
### 9.3.5 Die Überexpression von SSD485- oder SSDmyc485 führt zu einem Anstieg in der Phagozytose, der jedoch abhängig von der Kultivierungszeit ist

Die erhöhte Synthese von Gp70 in der Lysozymmutante resultiert in einer erhöhten Phagozytose. Ob die erhöhte Gp70-Expression in den SSD(myc)485-exprimierenden Zellen ebenfalls eine erhöhte Phagozytose nach sich zieht, sollte anhand der Aufnahme von TRITC-markierten Hefezellen überprüft werden. Es stellte sich jedoch bald heraus, dass das Verhalten der Mutanten sich mit fortschreitender Kultivierungszeit immer mehr veränderte.

Die Veränderung des Phänotyps in Abhängigkeit der Zeit konnte auch schon für den AlyA-Knockout gezeigt werden. Die Zellen bildeten immer größere Fresshöfe auf Bakterienrasen. Die

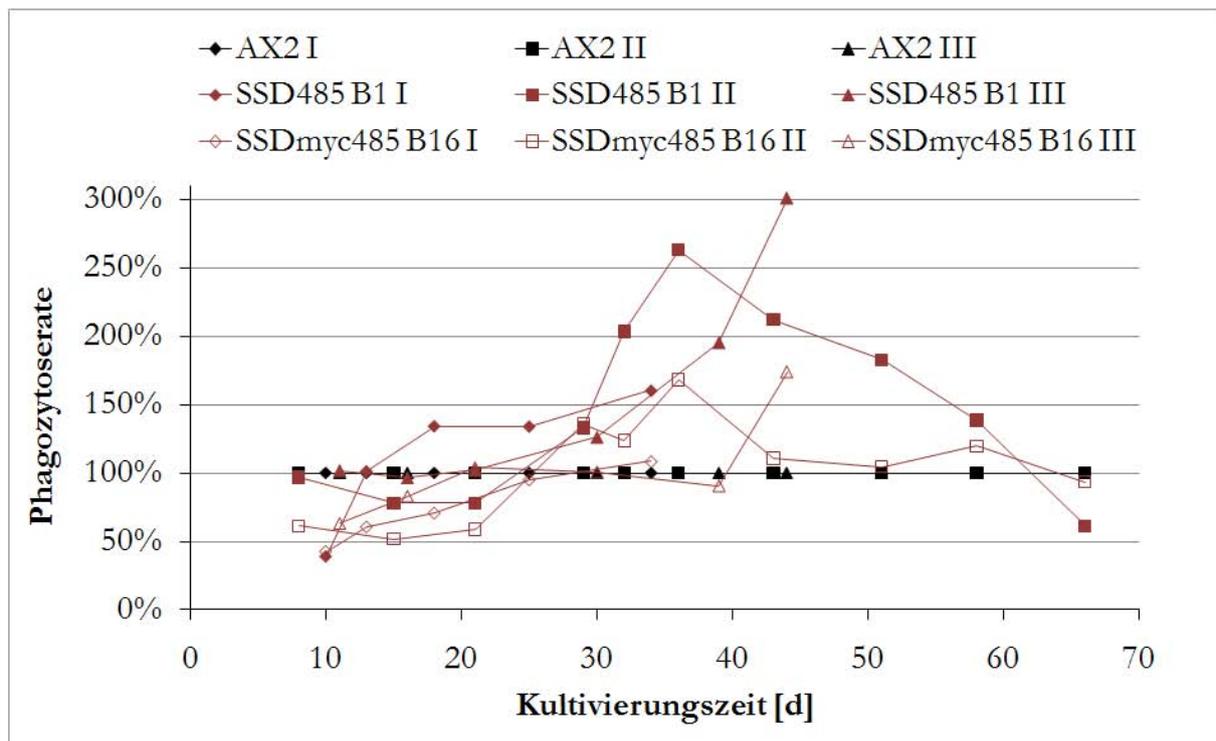
Höfe hatten im Vergleich zu AX2-Zellen einen bis zu 180 % größeren *Plaque*-Durchmesser. Dies resultierte nach 90 Tagen ebenfalls in einer erhöhten Phagozytose von Hefezellen. Für die SSD(myc)485-Mutanten wurde die Phagozytose daraufhin gezielt in Abhängigkeit der Kultivierungszeit untersucht.

Die folgenden Abbildungen stellen entweder die Phagozytoseraten der Mutanten prozentual zu der des Wildtyps (=100 %) dar oder beschreiben die Rate in relativen Fluoreszenzeinheiten pro Minute. Für beide Darstellungen wurden die Phagozytoseraten aus den Einzelerperimenten von unterschiedlichen Kultivierungszeiten berechnet. Abbildung 50 zeigt die Ermittlung der Phagozytoseraten beispielhaft anhand der nach 15 und 36 Tagen durchgeführten Phagozytoseexperimente.



**Abbildung 50: Darstellung zweier Einzelerperimente zur Bestimmung der Phagozytoserate zu unterschiedlichen Kultivierungszeiten.** Wildtypzellen (AX2) und die SSD(myc)485-exprimierenden Klone B1 und B16 wurden nach unterschiedlichen Kultivierungszeiten (links: 15 Tage, rechts: 36 Tage) auf ihre Phagozytosefähigkeit entsprechend 8.1.2.7 untersucht. Die Formeln ( $y=mx+b$ ) definieren die Trendlinien (gestrichelte Linien), die sich aus dem Phagozytoseverlauf innerhalb der ersten 45 Minuten jeden Klon ergeben. Die Steigungen  $m$  ergeben die Phagozytoseraten.

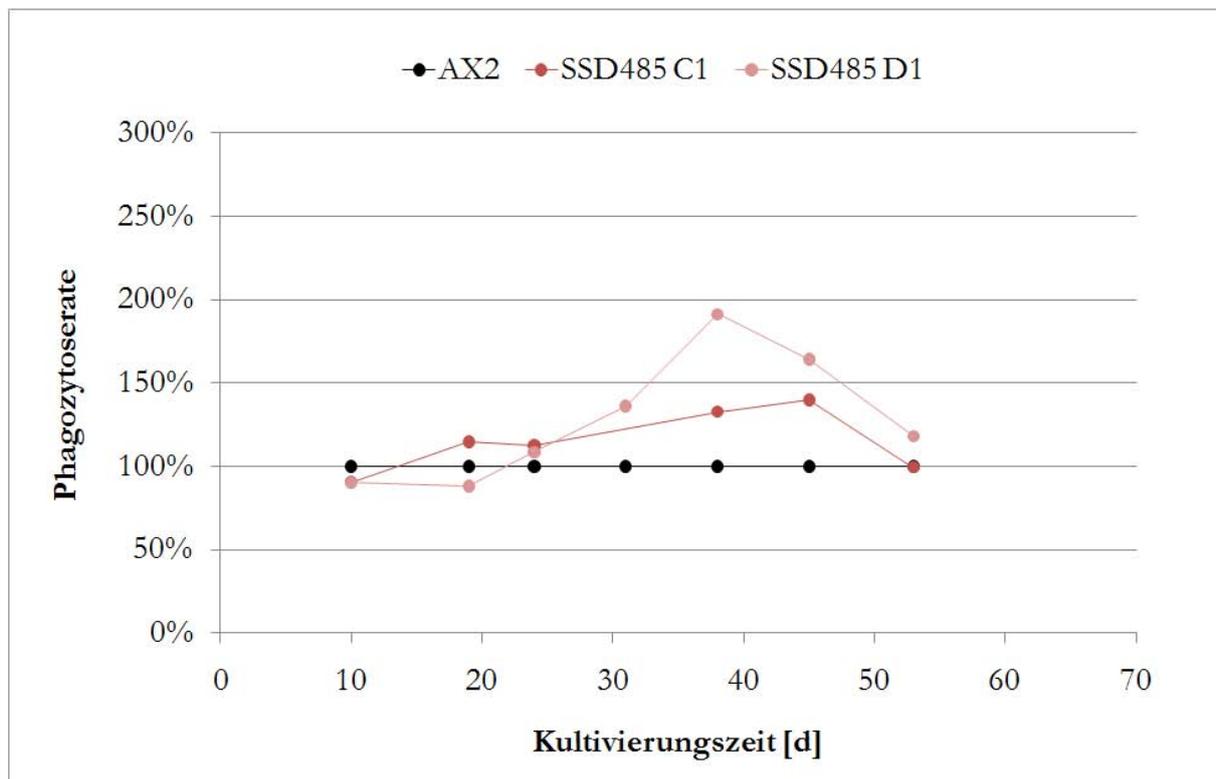
Die Phagozytoserate ergibt sich aus der relativen Fluoreszenz in Abhängigkeit von der Zeit. Sie kann direkt aus den Steigungen der Trendlinien der einzelnen Klone abgelesen werden (siehe gestrichelte Linien in Abbildung 50). Da der Zusammenhang zwischen Fluoreszenz und verstrichener Zeit jedoch nur in den ersten 30 bis 45 Minuten linear verläuft, wurden die Steigungen auch nur für diesen Zeitrahmen bestimmt. Für die miteinander vergleichbaren SSD(myc)485-Klone B1 und B16 ergab sich für drei unabhängige Durchgänge (I-III) die Abbildung 51.



**Abbildung 51: Von der Kultivierungszeit abhängige Veränderungen in der Phagozytose von SSD(myc)485-Zellen im Vergleich mit dem Wildtyp.** Für jeden Durchgang (I-III) wurden Zellen der SSD(myc)485-Mutanten B1 und B16 und des Wildtyps (AX2) am gleichen Tag aus tiefgefrorenen Sporen zurück gewonnen (vgl. 8.1.2.1). Sie wurden dann bis zu 66 Tage lang kultiviert und währenddessen ihre Phagozytoseraten in regelmäßigen Zeitabständen bestimmt. Für den nächsten Durchgang wurden wildtypische und mutante Zellen erneut gemeinsam aufgetaut. Die Phagozytoseraten des Wildtyps wurden als 100 % vorausgesetzt.

Wird die Phagozytose des Wildtyps als 100 % angesehen, zeigen sowohl der Klon B1 als auch der myc-markierte Klon B16 mit fortschreitender Kultivierungszeit eine zunehmende Aufnahme der Hefezellen. Dabei phagozytieren die Mutanten bis zu einer Kultivierungszeit von ca. 25 Tagen in fast jedem der Durchgänge schlechter als der Wildtyp. Danach übersteigen beide Klone die AX2-Zellen und sinken nach einem Höhepunkt nach 44 Tagen von 300 % beim Klon B1 und 170 % beim Klon B16 wieder unter das Niveau vom Wildtyp. In allen drei Durchgängen ist dieser Effekt beim SSD485-überexprimierenden Klon B1 deutlicher zu erkennen, als beim myc-markierten Klon B16.

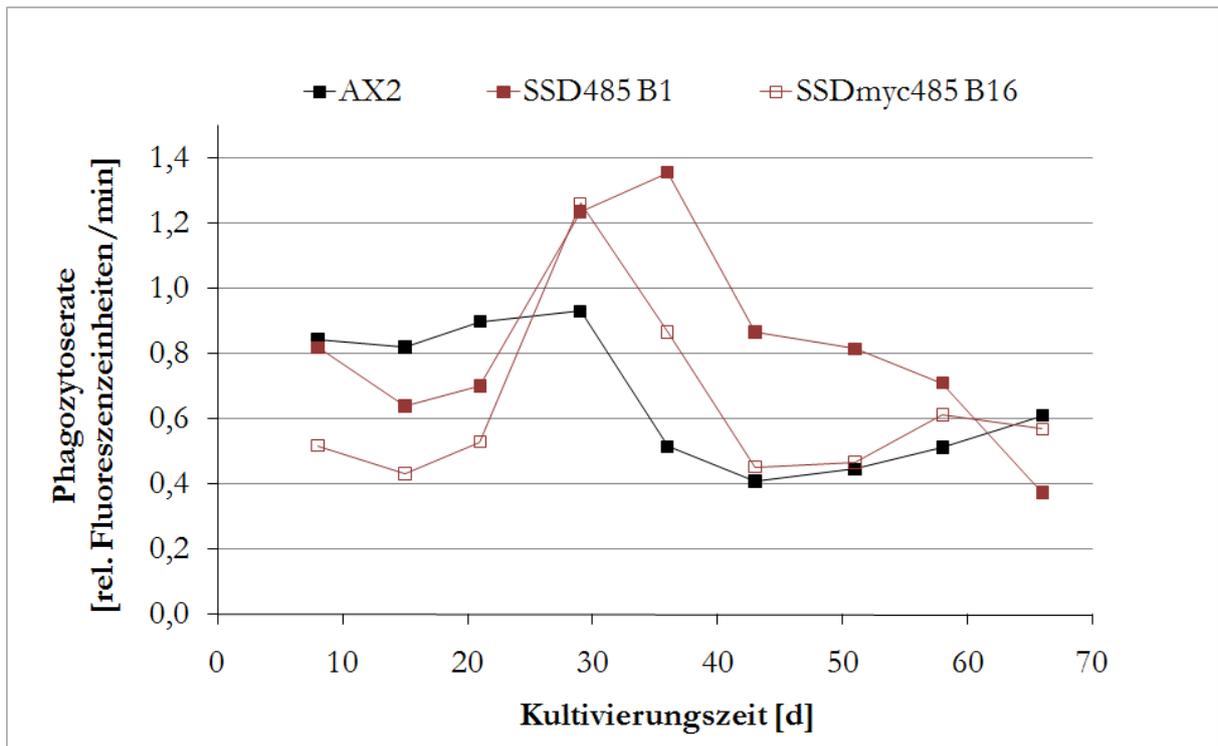
Für die unabhängigen SSD485-Klone C1 und D1 zeigt Abbildung 52 über eine Kultivierungszeit von 53 Tagen das phagozytotische Verhalten in einem Durchgang.



**Abbildung 52: Phagozytoseverhalten von SSD485-überexprimierenden Klonen zu unterschiedlichen Kultivierungszeiten verglichen mit Wildtypzellen.** Die Phagozytoserate von SSD485-Klonen (C1 und D1) und wildtypischen Zellen (AX2) wurde nach dem zeitgleichen Auftauen ihrer Sporen über einen Zeitraum von 53 Kultivierungstagen bestimmt. Die Raten wurden wie für Abbildung 50 beschrieben berechnet und für AX2 als 100 % angenommen.

Die SSD485-Überexprimierer C1 und D1 zeigen beide einen Anstieg in der Phagozytose, der nach 24 Tagen Kultivierung deutlich über der des Wildtyps liegt. Der Klon C1 erreicht nach 45 Tagen sein Maximum, während der Klon D1 bereits nach 38 Tagen fast 200 % mehr phagozytiert als AX2-Zellen. Die Maxima beider Klone liegen dabei allerdings nicht so hoch wie beim Klon B1 in Abbildung 51. Nach 53 Tagen Kultivierung phagozytieren beide Mutanten fast wieder auf wildtypischem Niveau. Die Durchgänge zeigen demnach für alle SSD(myc)485-Klone einen vergleichbaren Verlauf.

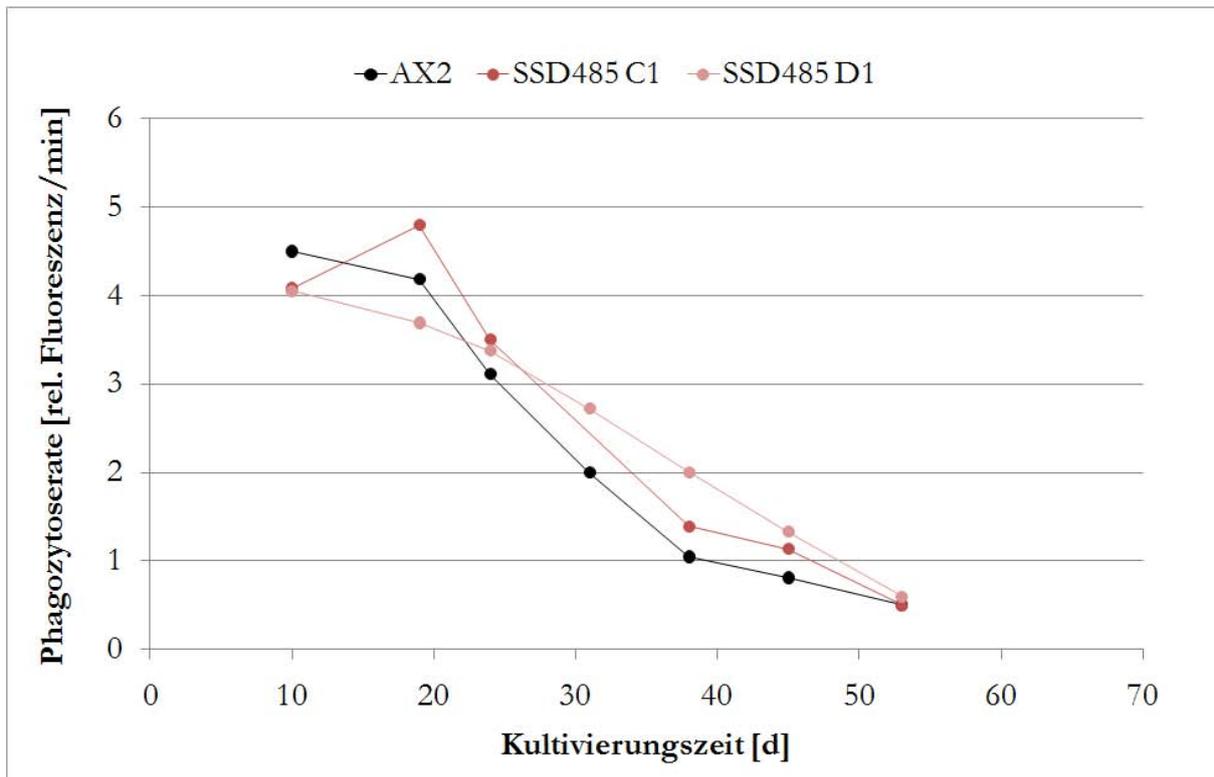
Die gezeigten Auswertungen der Phagozytoseexperimente der SSD485-Klone wurden unter der Annahme erstellt, dass die Phagozytoserate von Wildtypzellen 100 % beträgt. Diese Vorgehensweise erlaubt allerdings keine Aussagen über mögliche Veränderungen im Phagozytoseverhalten der Wildtypzellen selbst. Zu diesem Zweck wurden alle vier Durchgänge erneut ausgewertet. Hierbei wurden nun allerdings die aus den Trendlinien ermittelten Phagozytoseraten direkt gegen die Kultivierungszeit aufgetragen. Exemplarisch am Durchgang II gezeigt, ergibt sich für Wildtypzellen und die Klone B1 und B16 so die Abbildung 53.



**Abbildung 53: Phagozytoseraten von Wildtypzellen und SSD(myc)485-Mutanten in Abhängigkeit der Kultivierungszeit.** Der Durchgang II des Wildtyps (AX2) und der Klone B1 und B16 wurde erneut ausgewertet. Die absoluten Phagozytoseraten wurden hier direkt mit der Kultivierungszeit ins Verhältnis gesetzt. Sie wurden wie in Abbildung 50 beschrieben ermittelt und entsprechen direkt den Steigungen der Trendlinien der Einzelexperimente.

Die Dokumentation der Phagozytoserate von wildtypischen *Dictyostelium*-Zellen erfolgte über einen Zeitraum von mehr als 60 Tagen. Sie lässt eindeutig erkennen, dass AX2-Zellen nach ungefähr 30 Tagen in ihrer Fähigkeit, Hefezellen aus ihrer Umgebung aufzunehmen, deutlich eingeschränkt sind. Es kommt dabei zu einer abrupten Abnahme der Phagozytoserate um fast 50 %. Zellen, die SSD485 (B1) oder SSDmyc485 (B16) im Übermaß exprimieren zeigen diesen Effekt ebenfalls. Allerdings sinkt die Rate bei ihnen erst, nachdem sie wildtypisches Phagozytoseniveau noch übertroffen haben.

Für die Kultivierung von *Dictyostelium*-Zellen wird empfohlen, Kulturen alle zwei bis vier Wochen mit Hilfe von tiefgefrorenen Sporen zu erneuern. Kultiviert man sie länger, kann es zu unerwünschten Mutationen kommen [38]. Die hier durchgeführte Kultivierung von mehr als 60 Tagen entspricht also nicht dem üblichen Umgang mit *Dictyostelium*-Kulturen. Dies muss bei der Interpretation der Ergebnisse stets berücksichtigt werden und könnte den Abfall der Phagozytoseraten allein des Wildtyps teilweise erklären. Auch die später entstandenen Klone C1 und D1 zeigen ein vergleichbares Verhalten über eine verlängerte Kultivierungszeit (Abbildung 54).



**Abbildung 54: Mit fortschreitender Kultivierungszeit absinkende Phagozytoseraten in Wildtyp- (AX2) und den SSD485-exprimierenden Zellen C1 und D1.** Als alternative Darstellungsweise zum in Abbildung 52 gezeigten Durchgang wurden diesmal die Absolutwerte der Phagozytoseraten miteinander verglichen. Die Werte entstammen den Steigungen der Trendlinien der Einzelexperimente (vgl. Abbildung 50).

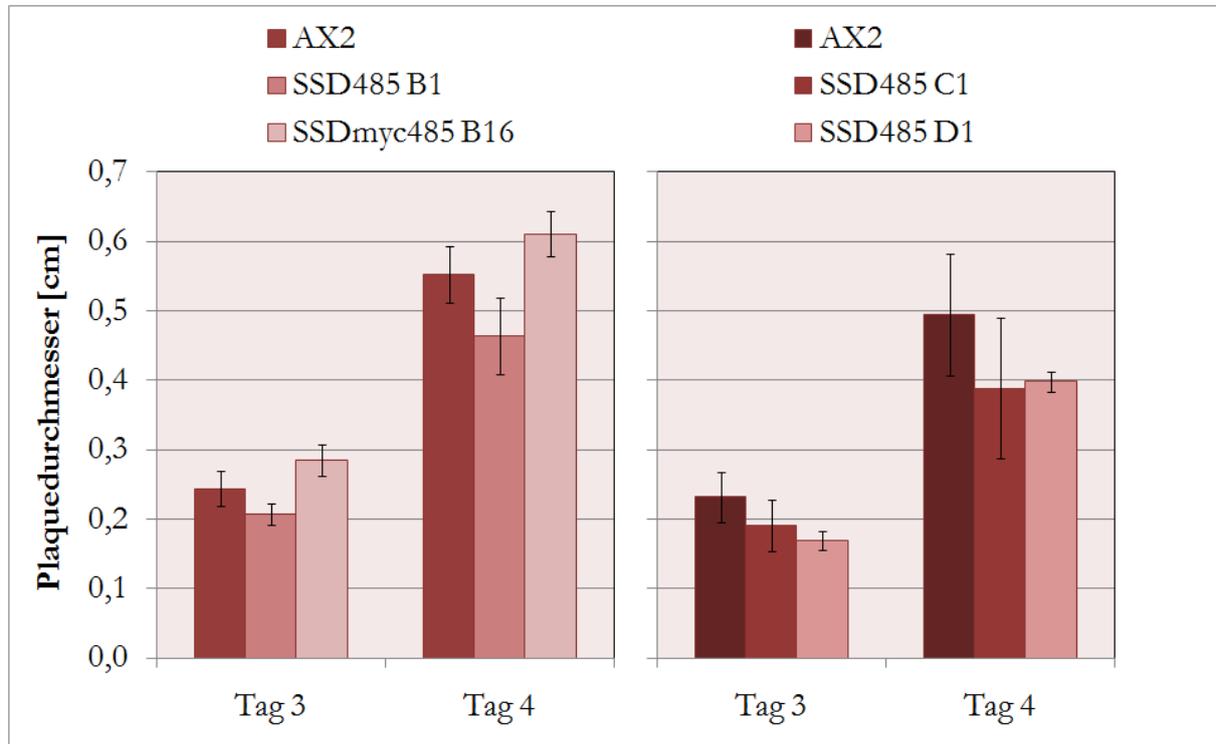
In diesen beiden Klonen (C1 und D1) sinkt die Phagozytose wie in ihren AX2-Vergleichszellen nach bereits 20 Tagen Kultivierung. Die Rate, mit der Hefezellen ins Innere aufgenommen werden, übersteigt die des Wildtyps ab dem 20. Tag aber in jedem Punkt. Dass die Rate der Wildtypzellen allerdings vor dem Einbruch erst überschritten wird, erkennt man nur anhand des Klons C1. Der Klon D1 übersteigt die Rate von AX2 erst später. Im Vergleich zu Abbildung 53 zeigt Abbildung 54 eine starke Diskrepanz in den absoluten Werten der Phagozytoseraten. Dies resultiert aus der Verwendung von zwei verschiedenen Fluoreszenzspektrometern, die sich in ihren Messbereichen unterscheiden.

Die Experimente zeigen, dass sich die Überexpression von SSD485 in einer myc- oder unmarkierten Form positiv auf die Phagozytose auswirkt. Eine entscheidende Rolle spielt dabei aber die Beachtung der Kultivierungszeit. Dies ist vergleichbar mit dem Verhalten der *AlyA-Knockout*-Zellen.

### 9.3.6 Die erhöhte Expression von SSD485 hat keine Auswirkungen auf die *Plaque*-Durchmesser

Unter 9.3.5 wurde bereits gezeigt, dass die Überexpression von SSD485 oder SSDmyc485 zu einer Erhöhung der Phagozytose führt, die jedoch abhängig von der Kultivierungszeit ist. Das

Verhalten der Zellen beim Wachstum auf einem Bakterienrasen wurde ebenfalls in Relation mit der Kultivierungszeit gesetzt. Allerdings konnte sowohl mit als auch ohne Berücksichtigung der Zeit keine Veränderung in den *Plaque*-Durchmessern festgestellt werden (Abbildung 55).



**Abbildung 55: *Plaque*-Durchmesser von SSD(myc)485-exprimierenden Klonen und Wildtypzellen (links: n=6, rechts: n=3).** Nachdem sich die Durchmesser der Fresshöfe in Abhängigkeit der Kultivierungszeit nicht veränderten, wurden für die sechs, bzw. drei unabhängigen Experimente die Mittelwerte gebildet. Die Klone sind jeweils mit dem entsprechenden AX2-Elternstamm (linker und rechter Teil der Abbildung) zu vergleichen.

Im Gegensatz zu *AlyA-Knockout*-Zellen sind die Durchmesser der *Plaques* nicht signifikant größer oder kleiner als die der Wildtypzellen. Dass SSDmyc485 auf Bakterienrasen aufgrund eines wenig aktiven Promotors nicht exprimiert wird (vgl. 9.2.9), ist auszuschließen. SSDmyc485 konnte auch nach der Kultivierung auf einer *Clearing Plate* in Gesamtzelllysaten nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Der *Plaque*-Durchmesser der SSD485-Mutanten ist somit der einzige Faktor, der nicht vergleichbar mit der Lysozymmutante ist. Unveränderte Hofdurchmesser bei erhöhter Phagozytoseaktivität konnten aber auch für Gp70-Überexprimierer [76] und bei von G. Konotop [57] hergestellten SLB350-*Knockout*-Zellen nachgewiesen werden. SSD485-überexprimierende Zellen zeigen ansonsten genau das Verhalten welches bei einer Beteiligung am Signalweg zu erwarten ist. Die oberhalb von SSD485 wirkende Lysozymaktivität bleibt in den Mutanten unverändert. Die Expression der Esterase kann aufgrund der erhöhten SSD485-Expression ebenfalls erhöht werden. All dies resultiert schließlich auch in einer von der Kultivierungszeit abhängigen

erhöhten Phagozytose. SSD485 gilt folglich als positiver Regulator der Phagozytose und wirkt entsprechend den *Microarray*-Ergebnissen unterhalb von AlyA, aber noch oberhalb von Gp70.

## 10 Diskussion

Basierend auf den Ergebnissen von *Microarray*-Analysen, sollten im Rahmen dieser Arbeit drei potentiell positive Regulatoren der Phagozytose in *Dictyostelium discoideum* näher charakterisiert werden. Da alle drei Kandidaten in der AlyA-Mutante überexprimiert und den Gp70-Überexprimierern unverändert vorlagen, sollten sie möglichst in den Signalweg unterhalb vom Lysozym AlyA, aber oberhalb von Gp70 eingeordnet werden. Dies sollte anhand der Phänotypen von Klonen geschehen, die markierte oder unmarkierte Formen der Proteine überexprimierten. Dabei zeigten sich für DD3-3, SSD673 und SSD485 sehr unterschiedliche Resultate. Die Phänotypen der Mutanten sind in Tabelle 5 zusammengefasst.

**Tabelle 5: Übersicht über die Phänotypen der untersuchten Klone, die DD3-3, SSD673 oder SSD485 in markierter, bzw. unmarkierter Form überexprimieren.**

Überexpression in AX2 von:	Lysozym-aktivität	Gp70-Expression	Phagozytose-rate	Plaque-Durchmesser	Lokalisation
DD3-3	↔	↔	↔ ↓(1 Klon ↑)	↔ (1 Klon ↓)	k.A.
DD3myc3	↔	↓	↔	↔	ER
SSD673	↔	↔	↑ (Medium)	↔	(EZ)
SSD673myc	↔	↔	↑	↔	ER, Golgi, (EZ)
in <i>E. coli</i> : GST-SSD673 (oL)	k.A.	k.A.	↓ (Medium)	k.A.	k.A.
SSD485	↔	↑	↑ (zeitabh.)	↔	k.A.
SSDmyc485	↔	↑	↑ (zeitabh.)	↔	ER, PM, Vesikel

(↔: wildtypisch, ↓: niedriger als AX2, ↑: höher als AX2, k.A.: keine Daten vorhanden, ER: Endoplasmatisches Retikulum, EZ: extrazellulär, PM: Plasmamembran)

Inwieweit die Proteine sich in den Signalweg integrieren lassen oder die Partikelaufnahme positiv beeinflussen können, soll im Folgenden diskutiert werden.

### 10.1 Die Überexpression von DD3-3

#### 10.1.1 Eine Lokalisation von DD3myc3 im ER ist wahrscheinlich

Die Fusion von DD3-3 mit GFP am N-Terminus des Proteins gelang Sakuragi *et al.* nicht [99]. Eine Kopplung von GFP an den C-Terminus von DD3-3 blieb in der vorliegenden Arbeit ebenfalls erfolglos (siehe 9.1.1). Diese Ergebnisse implizieren, dass *Dictyostelium*-Zellen eine GFP-Modifikation an beiden Enden von DD3-3 nicht tolerieren. Mittels PSORT II kann die ER-Signalsequenz am N-Terminus von DD3-3 als spaltbar diagnostiziert werden. Dies könnte erklären, warum Sakuragi *et al.* kein GFP-Signal in transformierten Zellen nachweisen konnten. Wird

die Signalsequenz auch mit einer GFP-Fusion erkannt, geht GFP möglicherweise mit dem Abspalten des Signals im ER verloren. Es ist jedoch nicht geklärt, ob die ER-Signalsequenz vom SRP trotz des angehängten GFPs überhaupt erkannt werden kann und das Protein überhaupt zum ER transportiert wird.

Durch die Fusion von GFP mit dem C-Terminus von DD3-3 wäre zu erwarten, dass eine Signalsequenz am C-Terminus überdeckt wird und so das Protein in der Zelle fehlgeleitet wird. Bei DD3-3 handelt es sich vermutlich um ein Transmembranprotein des Typs I (vgl. 9.1). Der C-Terminus von DD3-3 enthält ein Motiv, welches für den Rückhalt im ER sorgen könnte. Dieses *KKXX-like* Motiv von DD3-3 besteht aus den Aminosäuren Leucin – Lysin – Arginin – Leucin (LKRL) und wird von PSORT II als ER-Lokalisationssignal für Membranproteine des Typs I interpretiert. Dieses Signal bindet zytosolische Coat-Proteine, die das Protein in COPI-Vesikeln vom Golgi-Apparat zurück zum ER transportieren [113]. Warum die Zellen das Fusionsprotein DD3-3-GFP jedoch gar nicht erst synthetisieren oder so schnell wieder abbauen, kann nicht geklärt werden.

Aufgrund der erfolglosen Fusionen mit GFP wurde schließlich die Insertion eines Myc-Epitops gewählt und so konnte DD3myc3 im ER lokalisiert werden. Darüber hinaus zeigt eine Untersuchung der DD3-3-Sequenz vier potentielle N-Glykosylierungsstellen im Protein, deren Zuckermodifikationen im Westernblot in der Doppelbande resultieren könnten. Sakuragi *et al.* detektierten sogar fünf Positionen. Die Analyse der Arbeitsgruppe identifiziert das Asn<sub>550</sub> von DD3-3 ebenfalls als N-Glykosylierungsstelle. Diese Aminosäure entspricht dem Asn<sub>563</sub> in DD3myc3, die bei der Analyse mit dem NetNGlyc 1.0 Server mit nur einer Wahrscheinlichkeit von 49,5 % mit einer Zuckermodifikation versehen wird. Ob die Doppelbanden wirklich Asn-verknüpfte Zuckermodifikationen darstellen, könnte mit dem Einsatz einer Glykosidase, der Droge Tunicamycin oder anderer Inhibitoren [34] untersucht werden. Sie verhindern die Bindung der Oligosaccharide an die Asparagine, was zu einer einzelnen Bande auf den Westernblots führen sollte. Zur Untersuchung bezüglich der einzelnen Glykosylierungsstellen könnten die fünf vorhergesagten Positionen gezielt mutiert werden. Die Banden auf dem Westernblot sollten dann den fehlenden Oligosacchariden entsprechend auf leichtere Proteine verweisen.

Beschreiben die Doppelbanden auf dem Westernblot wirklich Glykosylierungen, so macht dies eine ER-Lokalisation von DD3-3 noch wahrscheinlicher, denn um diese Modifikationen zu erhalten, muss ein Protein das ER durchlaufen [45]. Leider konnten Sakuragi *et al.* diese Doppelbanden auf einem Westernblot mit einem polyklonalen und gegen GST-DD3-3 gerichteten Antikörper nicht zeigen. Dieser oder ein ähnlicher Antikörper könnte allerdings in Immunfluoreszenzen dabei helfen, das Protein intrazellulär nachzuweisen und die ER-Lokalisation in Zukunft zu bestätigen.

### 10.1.2 Eine Beteiligung von DD3-3 an der Signalkaskade AlyA – Gp70 – Partikelaufnahme kann ausgeschlossen werden

Anhand der *Microarray*-Analysen konnte I. Müller DD3-3 in *AlyA-Knockout*-Zellen um das 1,7fache stärker exprimiert nachweisen als in wildtypischen Zellen [76]. Eine RT-PCR auf die cDNA der Lysozymmutanten verglichen mit Wildtypzellen zeigte die erhöhte Expression ebenfalls (Abbildung 6), allerdings mit einem Faktor von 3. Diese Diskrepanz ist vermutlich auf die unterschiedliche Anzahl der Experimente zurück zu führen. Die *Microarray*-Analysen wurden mehrmals durchgeführt, bzw. die *Slides* mit revers transkribierter cDNA von mindestens drei unabhängigen RNA-Präparationen hybridisiert [76]. Der Faktor 1,7 setzt sich also aus mehreren Teilergebnissen zusammen. Die RT-PCR in Abbildung 6 zeigt hingegen ein Einzelexperiment und lässt Schwankungen zwischen mehrfach durchgeführten Experimenten unberücksichtigt. Dennoch zeigen beide Verfahren eine deutlich erhöhte Expression von DD3-3 in *AlyA-Knockout*-Zellen, die Anlass zur Herstellung von DD3-3-überexprimierenden Mutanten war.

Eine Teilnahme von DD3-3 am Signalweg setzt voraus, dass die Überexpression von DD3-3 zu einer erhöhten Gp70-Expression und Phagozytose führt. Leider konnte in keiner der hergestellten Mutanten ein Anstieg in der Esterasemenge festgestellt werden (Abbildung 14). Myc-markierte Klone zeigten sogar noch ein schwächeres Signal als die unmarkierten Klone. Darüber hinaus zeigte nur einer der Klone im Mittel eine erhöhte Phagozytose. Allen anderen konnte auch nach mehrfach wiederholter Untersuchung der Phagozytoserate kein positiver Effekt zugeschrieben werden. In der Mutante C7 scheint die Veränderung der Partikelaufnahme daher auf die Insertion der Vektorsequenz in einem die Phagozytose beeinflussenden Gen zurückzuführen zu sein. Außerdem zeigt auch dieser Klon keine erhöhte Gp70-Expression. Dies weist darauf hin, dass DD3-3 keine Komponente der Signalkaskade ist.

### 10.1.3 Die Expression von DD3-3 ist in Mutanten mit Entwicklungsdefekten, aber auch in *E. coli*-stimulierten Wildtypzellen verändert

Trotz der erhöhten Expression von DD3-3 in den *Microarray*-Analysen von I. Müller, konnte DD3-3 keine Wirkung auf die Phagozytose zugeschrieben werden. Von I. Müller und G. Konotop untersuchte Proteine konnten dem Signalweg teilweise auch nicht zugeordnet werden. H5, SSB389 oder SSH819 zeigten sich reguliert in den *Microarrays*, eine Manipulation der Genexpression führte dennoch nicht zu einer erhöhten Phagozytose, Gp70-Expression oder vergrößerten *Plaque*-Durchmessern [57, 76]. Das kann bedeuten, dass durch den Verlust von AlyA ein Signal über DD3-3 weitergeleitet wird, welches möglicherweise andere Prozesse in den Zellen reguliert. Es gibt einige Hinweise, dass DD3-3 eine Funktion in der Entwicklung zugeschrieben werden kann. Sakuragi *et al.* identifizierten DD3-3 mit Hilfe eines *mRNA Differential Displays* in einer Mu-

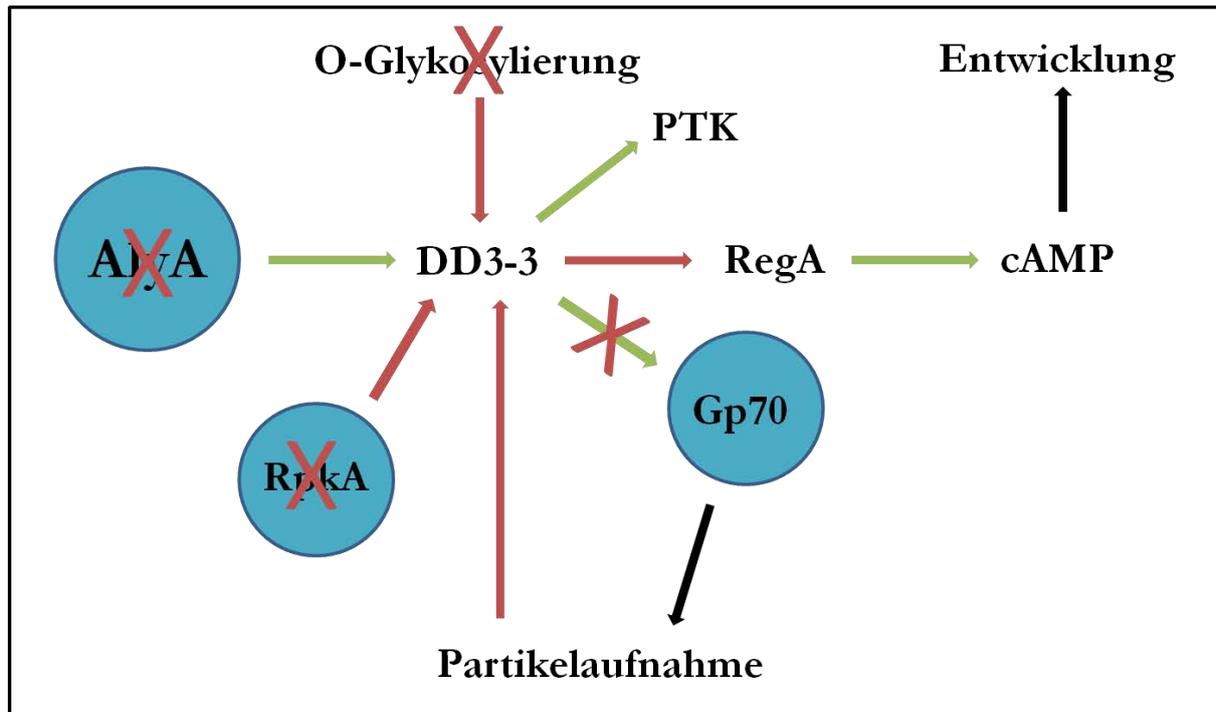
tante, die einen Defekt in der O-Glykosylierung des Zelladhäsionsproteins csA hat [99]. CsA vermittelt die Adhäsion während der Aggregation der Zellen [106] und lokalisiert auf der Plasmamembran [24]. DD3-3-*Knockout*-Zellen wiesen eine um 1,5 Stunden verfrühte Aggregation auf [99]. Außerdem konnte die Arbeitsgruppe in frühen Entwicklungsstadien dieser Zellen zeigen, dass die Phosphodiesterase RegA stark vermindert exprimiert wird. Dies resultiert in einem Anstieg der intrazellulären cAMP-Spiegel [99, 115]. Zusätzlich konnte die Proteintyrosinkinase PTK in der frühen Entwicklung der DD3-3-*Knockouts* als überexprimiert wahrgenommen werden. Sakuragi *et al.* schlossen formal, dass es sich bei DD3-3 um ein regulatorisches Protein handelt, welches eine Funktion in der Regulation von O-Glykosylierung und Phosphorylierung hat [99].

Bakthavatsalam *et al.* konnten 2007 in einer *Microarray*-Analyse DD3-3 ebenfalls als runter reguliert verzeichnen [5]. Sie verglichen die Expressionsmuster von rpkA-*Knockout*-Zellen mit wildtypischen Zellen im vegetativen Stadium. Die Rezeptorphosphatidylinositolkinase A (RpkA) ist ein 7-Transmembranrezeptor, der in der Membran von späten Endosomen lokalisiert [5]. Von dort aus ist er vermutlich in der Signalkette involviert, die über den *Conditioned Medium Factor* (CMF) die Reaktion von hungernden Zellen auf die cAMP-Pulse ermöglicht [5]. RpkA-*Knockout*-Zellen zeigen unvollkommene Aggregate und eine veränderte Expression von cAMP-regulierten Genen [5].

Wie diese Ergebnisse miteinander vernetzt sind und welche Funktion dem Lysozym AlyA in diesem Zusammenhang zukommt, kann nur spekuliert werden. Da jedoch durch das Ausschalten des Lysozyms Bakterien nicht mehr so effektiv verdaut werden können, ist nicht ausgeschlossen, dass AlyA-*Knockout*-Zellen dadurch in eine Art Hungerzustand geraten. Diesen scheinen sie durch die Kompensation mit einer erhöhten Phagozytose auszugleichen. Die herabgesetzte DD3-3-Expression resultiert laut Sakuragi *et al.* in erhöhten cAMP-Leveln [99]. Zyklisches AMP aktiviert wiederum die Proteinkinase A (PKA), welche ein wichtiger Faktor für die Aggregation der Zellen ist [39]. Damit die Zellen im Kompensationsstadium nicht schon verfrüht in die Entwicklung gehen, ist es möglich, dass die DD3-3-Expression hoch reguliert wird. Dieser Zusammenhang setzt allerdings voraus, dass auch RegA in AlyA-*Knockout*-Mutanten und den DD3-3-Überexprimierern hoch reguliert wird. Eine signifikante Veränderung der RegA-Expression konnte in den Lysozymmutanten auf den *Microarrays* nicht detektiert werden. Dies könnte jedoch über einen Northernblot, RT-PCR oder eine *Real-Time*-PCR nochmal überprüft werden.

Eine Verbindung von DD3-3 mit der Phagozytose zeigt eine *Microarray*-Analyse von Sillo *et al.* [104]. Dort erschien DD3-3 als runter reguliert, nachdem AX2-Zellen für zwei Stunden mit *E. coli*-Zellen des Stamms B/r in Schüttelkultur inkubiert worden waren. Der Vergleichsstamm wurde weiter in axenischem Medium kultiviert. Dies macht deutlich, dass die DD3-3-Expression in Reaktion auf die Phagozytose reguliert werden kann. Ebenfalls runterreguliert erschien AlyA. Da

die RNA für die *Microarray*-Analysen von I. Müller aus axenisch gewachsenen AlyA-Mutanten isoliert wurde, widersprechen sich diese Ergebnisse nicht. Es ist möglich, dass auch in AlyA-Mutanten nach einem phagozytotischen Stimulus die DD3-3-Expression reduziert wird. Dies wurde bisher jedoch nicht überprüft. Die bisher bekannten Informationen über DD3-3 sind in Abbildung 56 schematisch zusammengefasst.



**Abbildung 56: Schematische Übersicht der bisherigen Erkenntnisse über DD3-3.** Die Zusammenhänge zwischen den einzelnen Faktoren sind bisher noch völlig unklar. Die angedeuteten Signalwege müssen daher unabhängig voneinander und ausgehend von DD3-3 betrachtet werden. Die Abbildung beruht auf den Ergebnissen von [5, 76, 99, 104] und der vorliegenden Arbeit. Grüne Pfeile signalisieren eine Erhöhung der Expression, während rote Pfeile auf eine reduzierte Expression verweisen (RpKA: Rezeptorphosphatidylinositolkinase A, PTK: Proteintyrosinkinase, RegA: cAMP-abhängige Phosphodiesterase).

Die Expression von DD3-3 wird von einer Reihe anderer Proteine und auch von externen Stimuli beeinflusst. Abbildung 56 zeigt eine grobe Übersicht über die bekannten Daten zu DD3-3. Sie ist ein erster Ansatz, die Zusammenhänge zwischen AlyA und den genannten Kandidaten darzustellen. Da Signalwege meist noch viel komplizierter sind und sehr fein reguliert werden können, benötigt es weitere Forschungsergebnisse bis die Funktion von DD3-3 und seine Abhängigkeit von AlyA in *Dictyostelium discoideum* geklärt werden kann.

## 10.2 SSD673 – ein sekretorisches Protein?

### 10.2.1 Die Sekretion von SSD673 erfolgt über den Standardweg

Für Lokalisationsstudien wurde SSD673 C-terminal mit einem Myc-Epitop verknüpft. Dieses Konstrukt konnte in den drei überexprimierenden Mutanten vorwiegend im ER, aber im Gegensatz zu DD3-3 zusätzlich in einem perinukleären Bereich lokalisiert werden. Bei diesem Bereich könnte es sich um den Golgi-Apparat handeln. Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Myc-Epitop zusammen mit dem monoklonalen Antikörper gegen Comitin (p24) angefärbt (Daten nicht gezeigt). Bei Comitin handelt es sich um ein Protein, welches peripher mit Membranen assoziiert [82] und darüber hinaus Aktin bindet [110]. Weiner *et al.* konnten mit Hilfe des Antikörpers nachweisen, dass p24 am Golgi-Apparat lokalisiert [121]. Erfahrungsgemäß gelingen Färbungen mit diesem Antikörper bevorzugt, wenn die Zellen zuvor über eine Methanolfixierung (8.4.3) behandelt werden. Die Färbungen von SSD673myc hingegen zeigen unter Methanolfixierungen kaum ER- oder potentielle Golgi-Strukturen (Daten nicht gezeigt), sodass im Rahmen dieser Arbeit eine Kolo-kalisation zwischen SSD673myc und dem Golgi-Apparat nicht direkt gezeigt werden konnte. Ein Vergleich mit Bildern der Arbeitsgruppe Schneider *et al.* [100] macht deutlich, dass der mit Golvesin-GFP markierte Golgi-Apparat in *Dictyostelium* sehr ähnliche Anhäufungen am Zellkernrand anfärbt wie auch SSD673myc. Dabei tritt pro Zellkern nur ein Golgi-Apparat auf. Dies konnte auch für SSD673myc-Zellen festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Außerdem wird SSD673myc von PSORT II aufgrund der spaltbaren ER-Signalsequenz und der fehlenden Transmembrandomänen als extrazellulär vorhergesagt. Sekretorische Proteine dieser Art werden auf dem Standardweg vom ER über den Golgi zur Plasmamembran (PM) transportiert [48]. Der Golgi-Apparat ist also auch in dieser Hinsicht ein für SSD673 einleuchtendes Kompartiment.

Der Transport von Proteinen vom Golgi-Apparat zur Plasmamembran verläuft über Vesikel, die mit der Plasmamembran fusionieren und dort sekretorische Proteine in die Umgebung der Zelle abgeben. SSD673 könnte ebenfalls über solche Vesikel transportiert werden. Immunfärbungen von SSD673myc-exprimierenden Zellen zeigen jedoch diese Vesikel nicht. Alle vesikelähnlichen Strukturen, die durch den Myc-Antikörper angefärbt werden, lassen sich ebenfalls mit der PDI markieren und gehören daher zum ER (vgl. Abbildung 22). Ein Grund dafür, dass SSD673myc nicht in sekretorischen Vesikeln detektiert werden kann, könnte die starke Verdünnung des Proteins sein. Es häuft sich im Golgi an, wo es mit anderen Proteinen sortiert wird. Bei Bedarf wird es in so geringen Mengen an die Plasmamembran transportiert, dass es in Immunfluoreszenzexperimenten nicht mehr nachweisbar ist. Das Protein Cochlin trägt wie SSD673 eine ER-Signalsequenz und keine weiteren Transmembrandomänen. Robertson *et al.* konnten 2003 für

dieses von Fibrozyten im Innenohr des Menschen exprimierte Protein nachweisen, dass es im ER und Golgi lokalisiert ohne dass sich sekretorische Vesikel anfärben lassen [95]. Die Arbeitsgruppe konnte darüber hinaus HA-Cochlin mit Hilfe einer Immunpräzipitation im Kulturmedium von transfizierten Zellen nachweisen. Es handelt sich bei Cochlin also ebenfalls um ein sekretorisches Protein, welches im ER und im Golgi lokalisiert. Medium von SSD673myc-Expriemierern wurde auch auf die Präsenz von SSD673myc untersucht (Daten nicht gezeigt). Nach der Fällung von Gesamtprotein aus 30 ml konditioniertem Medium konnte das myc-markierte SSD673 allerdings in Westernblotanalysen nicht nachgewiesen werden. Da nur etwa jede 30. Zelle SSD673myc exprimiert, ist hier fraglich, ob die Menge an SSD673myc in 30 ml Medium für eine Detektion auf einem Westernblot überhaupt ausreicht. Angenommen, die Vorhersage der spaltbaren ER-Signalsequenz erwiese sich als falsch, so würde SSD673 selbst nicht sekretiert. Es könnte aber zu einer verstärkten Sekretion eines zweiten bisher unbekanntes Proteins führen, denn das konditionierte Medium SSD673(myc)-exprimierender Zellen kann gegenüber dem Medium wildtypischer Zellen die Phagozytose von AX2-Zellen leicht erhöhen (Abbildung 30). Diese Phagozytoseexperimente sprechen eindeutig dafür, dass die Überexpression von SSD673 zu einer Beeinflussung des Mediums führt.

### **10.2.2 Wird SSD673 sekretiert, so wirkt es autokrin auf die Phagozytose der sezernierenden Zelle**

Die heterogene Expression von SSD673myc zwischen den Zellen war Anlass für eine mikroskopische Untersuchung der Phagozytoserate. Dabei konnten nach 30 Minuten Kultivierung für stark fluoreszierende SSD673myc-Zellen durchschnittlich mehr aufgenommene Hefezellen verzeichnet werden, als für den Wildtyp (vgl. 9.2.5). In einem weiteren Experiment zeigte konditioniertes Medium von SSD673(myc)-exprimierenden Zellen allerdings auch eine positive Wirkung auf die Phagozytose von Wildtypzellen. Diese beiden Experimente scheinen sich auf den ersten Blick zu widersprechen, denn es ist vorerst verwunderlich, dass ein überexprimiertes Protein sowohl intrazellulär als auch sekretorisch positiv auf die Phagozytose wirkt. Es ist daher denkbar, dass SSD673myc von jeder 30. Zelle verstärkt exprimiert wird und ebenso in höherem Maße nach außen abgegeben wird. Im Medium kann SSD673myc in erster Linie auf die sekretierende Zelle selbst (autokrin) wirken. Da SSD673myc im Flüssigmedium über Diffusion verteilt werden kann, ist die sezernierende Zelle der nächstgelegene Wirkungsort. Dies resultiert in der erhöhten Phagozytose der stark fluoreszierenden Zellen. Im Experiment mit konditioniertem Medium hingegen kann das verstärkte Signal der Überexprimierer nur auf Zellen in der Umgebung (parakrin) wirken. Für diese Messungen wurden die SSD673-Zellen aus dem Medium entfernt, um nur AX2-Zellen zu beobachten. Die erhöhte Phagozytose von AX2 in konditioniertem Me-

dium ist mit 10 – 20 % nicht sehr ausgeprägt. Würden SSD673-Überexprimierer in Kombination mit AX2-Zellen in diesem Medium kultiviert, müsste die Phagozytoserate noch stärker ansteigen. Das Experiment ist in dieser Form allerdings nicht durchgeführt worden.

Die Ergebnisse der Phagozytosemessungen zeigen, dass die Fusion des Myc-Epitops mit SSD673 in einem funktionellen Protein resultiert. Sowohl die SSD673-Überexprimierer als auch der myc-markierte Klon konditionieren das Kulturmedium in gleicher Weise. Es kann daher ausgeschlossen werden, dass die erhöhte Phagozytoserate der stark fluoreszierenden Zellen aus einem fehlenden Weitertransport von SSD673myc aus dem Golgi-Apparat resultiert. Dies führt zur Annahme, dass auch das unmarkiert überexprimierte SSD673 im ER und Golgi lokalisiert und ins Medium abgegeben wird.

In *Dictyostelium discoideum* sind bereits andere Faktoren bekannt, die von den Zellen sezerniert werden. Brock und Gomer konnten 1999 einen Proteinkomplex isolieren, den sogenannten *Counting Factor* (CF), welcher eine wichtige Rolle in der Entwicklung spielt [16]. Eine Komponente dieses Komplexes ist *countin*. Die Zerstörung dieses Gens führt während der Aggregation dazu, dass die Zellen in weniger Ströme aufgeteilt werden. Dies resultiert schließlich in riesigen Fruchtkörpern [16]. Die Null-Mutanten der anderen Komponenten des Komplexes (CF45-1, CF50 und CF60) zeigen ebenfalls starke Defekte bei der Bildung von Fruchtkörpern (zusammengefasst in [52]). Da die Überexpression von SSD673 keinen Defekt bei der Ausbildung der Zellströme oder Fruchtkörper erkennen ließ (Daten nicht gezeigt), ist es zunächst unwahrscheinlich, dass auch SSD673 eine Komponente dieses Komplexes ist. Dabei muss jedoch zum einen bedacht werden, dass die heterogene SSD673-Expression nicht genügen könnte, um in der Entwicklung einen Defekt zu zeigen. Zum anderen könnte die alleinige Überexpression von SSD673 nicht ausreichen, um die Aktivität des ganzen Komplexes zu erhöhen. Es müsste daher eine zweite Komponente oder sogar mehrere Komponenten überexprimiert werden, um einen Effekt auf die Ausbildung der Sporenköpfe von SSD673 zu zeigen.

Die autokrinen Faktoren AprA and CfaD bilden in konditioniertem Medium einen Komplex, welcher in einer negativen Rückkopplung die Proliferation der Zellen herabsetzt [6]. Die Konzentration beider Faktoren steigt mit zunehmender Zelldichte und macht letztere auf diese Weise für *Dictyostelium* messbar [42]. Auch SSD673 als sekretorisches Protein könnte eine Komponente eines ähnlichen Komplexes sein. Da seine Überexpression in den Zellen eine leicht erhöhte Phagozytoserate nach sich zieht, ist es möglich, dass es in *Dictyostelium* ein Signal für ein ausreichendes Nahrungsangebot signalisiert. So könnte sichergestellt werden, dass die Zellen zuverlässig phagozytieren, während die Menge an angebotenen Bakterien noch ausreicht. Wird es überexprimiert so signalisiert dies ein erhöhtes Nahrungsangebot und die Zellen phagozytieren stärker. Diese Hypothese müsste jedoch erst überprüft werden.

### 10.2.3 Die Blockade eines Rezeptors könnte die reduzierte Phagozytose durch GST-SSD673 (oL) erklären

Ein weiteres Indiz dafür, dass SSD673 im Kulturmedium von *Dictyostelium discoideum* eine Funktion hat, zeigen die Versuche, die Phagozytose mit dem bakteriell exprimierten GST-SSD673 (oL) zu stimulieren. In diesen Experimenten bewirkt das rekombinante Fusionsprotein konzentrationsabhängig eine Reduktion der Phagozytose von Wildtypzellen. Dies zeigt, dass das Fusionsprotein extrazellulär auf *Dictyostelium*-Zellen wirken kann. Es zeigt allerdings einen genau entgegengesetzten Effekt zum konditionierten Medium der SSD673myc-Expimierer. Dass die Glutathion-S-Transferase die Phagozytose negativ beeinflusst kann ausgeschlossen werden, denn die Partikelaufnahme von AX2-Zellen ist unverändert, wenn die Zellen mit GST allein stimuliert werden. Durch die Fusion mit der Transferase könnte es für SSD673 (oL) jedoch zu einer sterischen Behinderung kommen. Wenn SSD673 (oL) im extrazellulären Raum einen Liganden für einen bisher unbekanntem Rezeptor darstellt, so könnte die Fusion mit der Glutathion-S-Transferase diese Bindung stören. Vermutlich wäre in dem Fall aber keine Auswirkung des Fusionsproteins auf die Partikelaufnahme zu erwarten.

Die reduzierte Internalisierung könnte aber in einer fehlerhaften Faltung von SSD673 (oL) begründet sein. Besitzen sekretorische Proteine Cysteine werden diese im ER zu Disulfidbrücken oxidiert [37]. Da kein *E. coli*-Stamm zur Verfügung stand, der eine periplasmatische und damit eine Expression von GST-SSD673 (oL) unter oxidierenden Bedingungen ermöglicht hätte, wurde das Protein im Zytosol von *E. coli* exprimiert. In diesem herrscht jedoch ein reduzierendes Milieu. Zwischen den vier in SSD673 (oL) enthaltenen Cysteine werden unter diesen Versuchsbedingungen Disulfidbrücken womöglich nicht richtig gebildet. Außerdem ist auch das Milieu auf der Säule reduzierend. Dies könnte in einem falsch gefalteten Protein resultieren. Die fehlerhafte Faltung könnte zwar zu einer Bindung mit dem Rezeptor führen, diesen aber blockieren anstatt aktivieren und somit die Phagozytose reduzieren.

Nach dem Verdau von GST-SSD673 (oL) mit Thrombin konnte in Coomassie gefärbten Gelen nur GST detektiert werden (9.2.7). Dieser Verlust von SSD673 (oL) ist ein Hinweis darauf, dass SSD673 (oL) ohne die Bindung an GST instabil ist. Die fehlende Stabilität ist wahrscheinlich ebenfalls den reduzierten Cysteinen zuzuschreiben.

### 10.2.4 SSD673 ist ein positiver Regulator der Phagozytose

Sowohl die mikroskopische Untersuchung der myc-markierten Zellen als auch die Experimente mit konditioniertem Medium zeigen, dass SSD673 die Phagozytose positiv reguliert. Unter Einbindung der oben genannten Überlegungen kann auch dem rekombinanten Protein eine Wirkung auf die Phagozytose zugeschrieben werden. Um ein Bindeglied zwischen AlyA und Gp70 zu sein,

müssten SSD673-überexprimierende Zellen ebenfalls eine erhöhte Gp70-Expression zeigen. Diese blieb in den Mutanten jedoch wildtypisch. Bei diesem Experiment ist aber zu beachten, dass der Westernblot in Abbildung 26 Gesamtzelllysate der Klone zeigt. Aufgrund der heterogenen Expression von SSD673myc ist es möglich, dass die Hochregulation von Gp70 in den wenigen überexprimierenden Zellen nicht ausreicht, um auf einem Westernblot detektiert zu werden. In Zukunft wäre es interessant, die Gp70-Expression der stark exprimierenden SSD673myc-Zellen mikroskopisch zu untersuchen. Ist sie erhöht, so gilt SSD673 nicht nur als positiver Regulator der Phagozytose, sondern könnte ebenfalls unterhalb von AlyA und oberhalb von Gp70 in den Signalweg eingliedert werden.

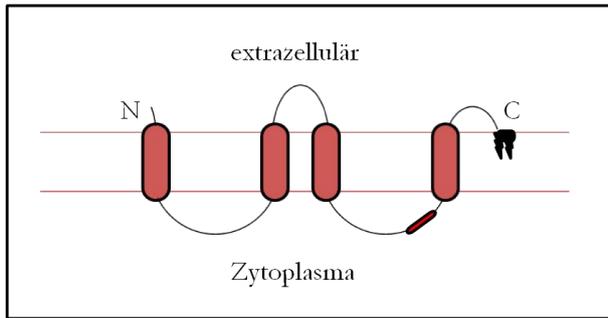
Allein der *Plaque*-Durchmesser bleibt in den Mutanten unverändert. Auch hier könnte die heterogene Expression der Überexprimierer ein Grund sein, dass die Wirkung von SSD673 auf die Fresshöfe nicht wahrgenommen werden kann. Auf der anderen Seite konnten I. Müller und G. Konotop anhand der Proteine SSJ758 und SLB350 bereits zeigen [57, 76], dass ein veränderter *Plaque*-Durchmesser unabhängig von der Phagozytoserate reguliert wird. Somit ist auch für SSD673 eine Wirkung auf die Größe der Fresshöfe nicht zwingend notwendig.

### 10.3 SSD485 als positiver Regulator der Phagozytose

#### 10.3.1 SSD485 wird in das ER translatiert und über den Golgi-Apparat an die Plasmamembran transportiert

Die Lokalisation von SSD485 wurde in dieser Arbeit mit Hilfe eines myc-markierten Fusionsproteins untersucht. Aufgrund der Lage der ER-Signalsequenz, der Transmembrandomänen und des vorhergesagten GPI-Ankers wurde das Myc-Epitop vor der letzten Transmembrandomäne eingefügt. Die Information, dass SSD485 in der Membran über GPI verankert ist, wurde zuerst der Datenbank DictyBase entnommen, kann aber mit dem Programm GPI-SOM bestätigt werden (Daten nicht gezeigt). Experimentelle Untersuchungen, die diesen Anker bestätigen könnten, gibt es jedoch nicht. Darüber hinaus erscheint die Präsenz mehrerer Transmembrandomänen kombiniert mit einem GPI-Anker zunächst merkwürdig. Es stellt sich die Frage, warum ein Transmembranprotein zusätzlich über GPI in der Membran verankert werden muss. In *Dictyostelium* wurde bereits ein Protein gefunden, welches beide Charakteristika aufweist. Die Analyse der Aminosäuresequenz des Proteins Ponticulin sagte vier bis sechs hydrophobe Bereiche und einen GPI-Anker am C-Terminus voraus. Hitt *et al.* konnten für Ponticulin anschließend eine zytoplasmatische Domäne experimentell bestätigen und wiesen den Einbau von radioaktiven Komponenten des Glykosylankers in das Protein nach [47]. Ponticulin lokalisiert ähnlich wie SSD485 an der Plasmamembran [124]. Die Funktion des GPI-Ankers in einem Transmembranprotein wird von Hitt *et al.* wie folgt diskutiert. Der Anker könnte dafür sorgen, dass Ponticulin während des Einbaus in die Membran richtig gefaltet wird und diesen Prozess so stabilisieren. Darüber hinaus könnte der Anker als Sortierungssignal in verschiedene Subdomänen der Zellmembran wirken oder die Interaktion mit anderen Membranproteinen ermöglichen [47]. Da auch SSDmyc485 an der Plasmamembran lokalisiert, sind diese Funktionen auch für die Verankerung von SSD485 denkbar.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden für SSDmyc485 Immunfluoreszenzuntersuchungen nach Charette und Cosson [21] mit impermeablen Zellen durchgeführt (Daten nicht gezeigt). Durch Inkubation mit dem Myc-Antikörper vor der Fixierung und durch Auslassen der Nachfixierung mit Ethanol lässt sich bei extrazellulärer Lage des Myc-Epitops nur die Zelloberfläche mit dem Antikörper markieren. Diese Methode gab aber Hinweise darauf, dass das Myc-Epitop in SSD485 vor der letzten Transmembrandomäne dem Zytosol zugewandt ist. Damit ergibt sich für SSDmyc485 eine ähnliche Topologie wie für Ponticulin (Abbildung 57). Sie kann mit dem Programm TopPred bestätigt werden.



**Abbildung 57: Hypothetische Struktur von SSDmyc485 in der Plasmamembran.** Die vier Transmembrandomänen (hellrot) durchspannen die Plasmamembran, sodass beide Termini (N und C) und der GPI-Anker (schwarz) extrazellulär vorliegen. Das Myc-Epitop (dunkelrot) liegt somit auf der dem Zytoplasma zugewandten Seite.

In der Plasmamembran interagiert Ponticulin mit Aktin [47]. Eine Interaktion von SSD485 mit Komponenten unterhalb der Plasmamembran untersuchte bereits G. Konotop [57]. Er koexprimierte SSD485 mit SSL793, welches in phagozytotischen *Cups* lokalisiert. Für einen der entstandenen Klone konnte er sofort eine erhöhte Phagozytose, vergrößerte *Plaques* und eine erhöhte Gp70-Expression nachweisen. SSD485-Einzelmutanten zeigen erst nach längerer Kultivierung einen Anstieg in der Phagozytoserate (9.3.5). Einzelmutanten von SSL793 zeigen sogar nur wildtypisches Verhalten [57]. Er vermutete, dass ähnliche Expressionslevel beider Proteine an der Plasmamembran benötigt werden, um diesen Effekt hervorzurufen. Es konnte allerdings kein weiterer Klon selektiert werden, der diesen additiven Phänotyp ebenfalls gezeigt hätte [57]. Ein Zusammenwirken dieser beiden Komponenten an der Plasmamembran ist daher noch unsicher. Neben der Plasmamembran lokalisiert SSDmyc485 im ER, vermutlich dem Golgi-Apparat und in bisher unbekanntem Vesikeln unterhalb der Plasmamembran. Ähnlich DD3myc3 zeigt SSDmyc485 in Westernblotanalysen eine unscharfe Bande. Außerdem werden für SSDmyc485 zwei Glykosylierungsstellen vorhergesagt. Dies lässt vermuten, dass SSDmyc485 durch seine Signalsequenz ins ER translatiert wird, dort glykosyliert und über den Golgi an die Plasmamembran transportiert wird. Welche Beschaffenheit und Funktion die SSDmyc485-positiven Vesikel haben ist bisher unklar. Die Lage der Vesikel unterhalb der Plasmamembran erinnert stark an sekretorische Vesikel, deren Inhalt bei Bedarf über die Plasmamembran ausgeschieden wird. Ein Protein, welches in kortikalen Vesikeln lokalisiert, ist das Acyl-CoenzymA-bindende Protein AcbA [18]. Diese Vesikel konnten allerdings in Vorstufen von Sporenzellen detektiert werden. Da die SSDmyc485-positiven Vesikel während der vegetativen Phase in den Zellen beobachtet wurden, ist es unwahrscheinlich, dass beide Proteine in den gleichen Kompartimenten lokalisieren.

Ravanel *et al.* identifizierten über die Herstellung von Antikörpern drei Membranproteine in *Dicystostelium discoideum*, um die Membransortierung im endozytotischen und phagozytotischen Transit genauer zu untersuchen [92]. Eines der Proteine, p25, lokalisiert ebenfalls auf der Plasmamembran und gilt zusätzlich als Marker für Recyclingvesikel [92]. Diese Vesikel transportieren Material vom Endosom zurück zur Plasmamembran. Ebenfalls in Vesikeln und in definierten Bereichen

der Plasmamembran lokalisiert p80. Dabei handelt es sich um einen Marker für späte Endosomen [92]. Gegen ein drittes Protein, p23, wurde von der Arbeitsgruppe ebenfalls ein Antikörper generiert, der das Protein teilweise an der Plasmamembran und an in der Zelle verteilten Vesikeln erkannte. P23 wurde allerdings von Ravel *et al.* aufgrund einer sehr heterogenen Markierung zwischen den Zellen nicht weiter untersucht. Bei diesen von den drei Proteinen gekennzeichneten Vesikeln könnte es sich auch um SSDmyc485-positive Vesikel handeln. Allerdings lokalisieren p25 und p80 auf frühen Phagosomen, bzw. auf späten Endosomen [92]. SSDmyc485 hingegen konnte nicht auf Phagosomen detektiert werden (Abbildung 42). Außerdem sind Endosomen über die gesamte Zelle verteilte Strukturen und nicht wie SSDmyc485 ausschließlich unterhalb der Plasmamembran zu finden. Dies schließt aus, dass SSD485 und p25 oder p80 auf die gleiche Art und Weise sortiert werden. Ob allerdings eine partielle Kolo-kalisation zwischen ihnen detektierbar ist, ließe sich in Zukunft in Immunfluoreszenzexperimenten prüfen. Bis dahin bleibt die Funktion der membrannahen SSDmyc485-Vesikel ungeklärt.

### **10.3.2 Die Aufnahme von Partikeln wird positiv von SSD485 beeinflusst, welches unterhalb von AlyA und oberhalb von Gp70 wirkt**

Die Überexpression von myc-markiertem und unmarkiertem SSD485 resultiert in allen untersuchten Klonen in einer leicht erhöhten Gp70-Expression. Damit entsprechen alle Klone dem Modell einer Weiterleitung von AlyA über SSD485 zu einer Hochregulation von Gp70. Darüber hinaus kann für beide Klonchargen, die aus unterschiedlichen Elternstämmen hergestellt wurden, die Menge an SSD485-Transkript direkt in Relation mit der Gp70-Expression gebracht werden. In RT-PCR-Experimenten wies der Klon B1 mehr SSD485-Transkript auf, als der Klon B16 für die myc-markierte Variante. Die erhöhte Expression des Klons D1 gegenüber dem Klon C1 resultierte ebenfalls in einer stärkeren Gp70-Bande in Gesamtzelllysaten des Klons D1. Diese feinen Unterschiede in der Gp70-Expression sind überdies auch in den Phagozytoseexperimenten sichtbar. Auch dort steigen die Phagozytoseraten der Klone B1 und D1 mit fortschreitender Kultivierungszeit über die der Klone B16 und C1. Dass die Phagozytose des Klons B16 zeitabhängig ebenfalls ansteigt, beweist, dass die Integration des Myc-Epitops die Funktion von SSD485 nicht stört. Damit ist auch die Lokalisation im ER, Golgi-Apparat, der Plasmamembran und den Vesikeln auch für das unmarkierte SSD485 anzunehmen.

Einigen der bisher untersuchten Proteine konnte bereits eine Funktion unterhalb von AlyA zugeschrieben werden. So erhöhte sich die Fähigkeit, Partikel aufzunehmen zum Beispiel durch die Überexpression von SSB420 oder die Stilllegung von SSE346. Allerdings konnte diese Veränderung in den Mutanten sofort und in gleichbleibendem Maße nachgewiesen werden. Die SSD485-Mutanten zeigen die zunehmende Partikelaufnahme erst, wenn sie längere Zeit kultiviert werden.

Dieses Verhalten erinnert stark an die Kompensation, die auch in den Lysozymmutanten beobachtet werden konnte. Bei ihnen vergrößerte sich der *Plaque*-Durchmesser zeitabhängig, was schließlich auch in einer erhöhten Aufnahme TRITC-markierter Hefezellen resultierte [75, 77]. Analysiert man das Verhalten der AlyA- und der SSD485-Mutanten genauer, so erkennt man, dass beide zu Beginn sogar weniger als wildtypische Zellen phagozytieren können. Diese Beobachtungen unterstützen die Vermutung, dass beide Gene einen ähnlichen Vorgang regulieren. Dass auch in den SSD485-Klonen die Gp70-Expression erhöht ist, untermauert diese Theorie. Damit ist SSD485 das bisher einzige Gen, welches die Manipulation des Signalweges über einen längeren Zeitraum kompensieren kann. Es wäre also möglich, dass SSD485 den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt bei der Kompensation darstellt. So würde der Verlust von AlyA vorerst in einer geringeren Phagozytose resultieren. Das Signal der fehlenden Lysozymaktivität würde eine erhöhte SSD485-Expression zur Folge haben. Bis diese Hochregulation jedoch ihre Wirkung zeigt, sei es durch weitere Veränderungen von Genexpressionen oder metabolische Umstrukturierungen in den Zellen, vergehen mehrere Wochen. Nach und nach könnten dann weitere Gene wie SSB420, Gp70, SSE346 oder SLB350 reguliert werden und das Signal für eine erhöhte Phagozytose sofort weitergeben.

Das setzt allerdings voraus, dass eine Manipulation von Genen, die SSD485 in der Signalkaskade vorgeschaltet sind, zuerst auch in einer reduzierten Phagozytose resultieren und dann die Kompensation zeigen. Bisher gibt es nur für SSB420 Hinweise darauf, dass es SSD485 vorgeschaltet ist [57]. Es zeigt allerdings keine Kompensation, sondern SSB420-Überexprimierer phagozytieren unabhängig von der Kultivierungszeit stärker als der Wildtyp [57]. Möglicherweise werden beide Proteine parallel vom Mangel an AlyA angesprochen. Dabei könnte SSB420 zusätzlich auf SSD485 wirken und vielleicht sogar erst den entscheidenden Impuls zur erhöhten Phagozytose geben. Parallel zum Signalweg über SSD485 zur erhöhten Phagozytose könnte SSB420 den *Plaque*-Durchmesser beeinflussen, der von SSD485 nicht berührt wird.

Die Fresshofuntersuchungen mit der Lysozymmutante und der SSB420-Mutante sind nicht mit dem hier verwendeten *E. coli*-Stamm B/2 durchgeführt worden. Man könnte annehmen, dass dies ein Grund für die unveränderten Durchmesser der DD3-3-, SSD673- oder SSD485-Mutanten ist. Allerdings konnte I. Müller bereits in ihrer Diplomarbeit zeigen, dass sich AlyA-Knockout-Zellen auf *Escherichia coli*-, *Klebsiella aerogenes*- oder *Micrococcus luteus*-Rasen gleich verhalten [75]. Auf allen zeigten die Mutanten stark vergrößerte Fresshöfe. Die starken Abweichungen und im Mittel eher kleiner erscheinenden Durchmesser der Klone C1 und D1 sind vermutlich der fortgeschrittenen Kultivierungszeit zuzuschreiben. Beide Klone und ihr Elternstamm wurden dreimal jenseits der 45 Tage Kultivierung vermessen. Bei solch langen Kultivierungszeiten ist grundsätzlich mit der Anhäufung von Mutationen zu rechnen. Dies kann wiederum zu einer ein-

geschränkten Lebensfähigkeit einzelner Zellen führen und so zu sehr unterschiedlich großen Plaques. Zusammengefasst scheint SSD485 durch seine Überexpression die Ausbildung der Höfe auf dem Bakterienrasen wirklich nicht beeinflussen zu können.

### 10.3.3 Ein Vergleich zwischen der Kompensation von AlyA- und SSD485-Mutanten

Die Phänotypen der AlyA-*Knockout*-Mutante und der SSD485-Überexprimierer erscheinen sehr ähnlich. Beide kompensieren zeitabhängig die veränderte Genexpression. Dabei zeigen beide Mutanten im Vergleich zum AX2 einen Anstieg im *Plaque*-Durchmesser oder der Phagozytoserate auf das Doppelte des Wildtyps. Dabei ist jedoch zu beachten, dass im Falle des AlyA-*Knockouts* die Kompensation anhand der Fresshöfe beobachtet wurde. Als deren Durchmesser bereits vergrößert war wurde ebenfalls die Phagozytose der Zellen beobachtet. Diese war um den gleichen Faktor erhöht wie die Durchmesser der Höfe [75, 77]. Da AlyA-Mutanten keine Veränderung in der Degradation von GFP-Bakterien zeigten, wurde schlussgefolgert, dass der vergrößerte Durchmesser das Resultat einer erhöhten Phagozytose war. Zeitabhängige Phagozytoseexperimente wurden mit den AlyA-Mutanten nicht durchgeführt.

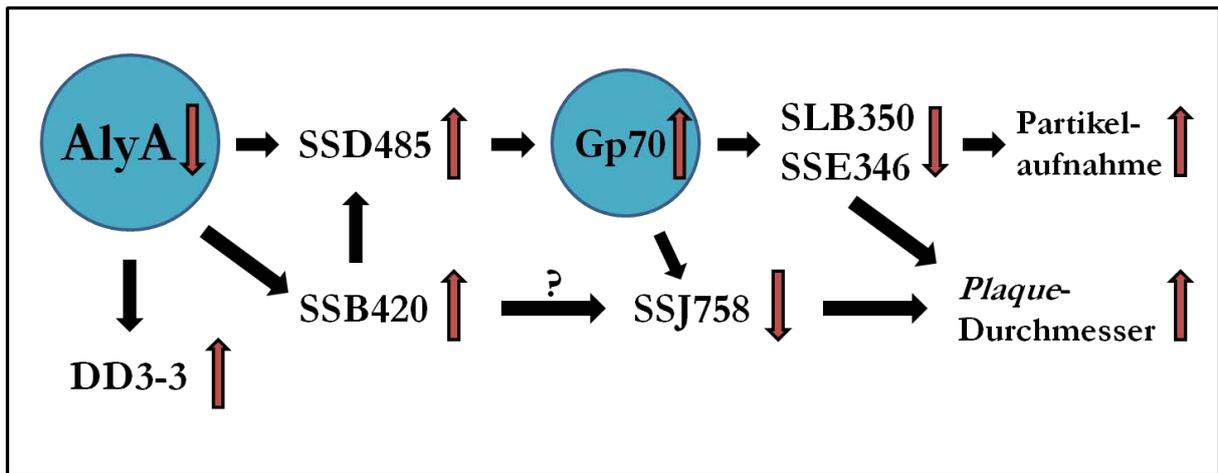
Die Untersuchung von SSD485-Mutanten in Abhängigkeit der Kultivierungszeit wurde hingegen anhand der Aufnahme TRITC-markierter Hefezellen untersucht. Eine Wirkung von SSD485 auf den *Plaque*-Durchmesser konnte auch zeitabhängig nicht detektiert werden (9.3.6). Beide Verläufe können daher nicht direkt miteinander verglichen werden. Bei der Phagozytose in Schüttelkultur spielt vor allem eine Rolle, wie gut ein Partikel gebunden und schließlich umschlossen werden kann. Die Ausbildung eines *Plaques* wird von wesentlich mehr Faktoren bestimmt. Neben der Bindung des Partikels spielen zusätzlich die Fortbewegung auf dem Substrat, die Teilungsfähigkeit, die Entwicklung und die Degradation der Bakterien eine Rolle. Die wenigsten dieser Faktoren wurden bisher in beiden Mutanten untersucht. Es ist daher formal möglich, dass die Kompensationen unabhängige Prozesse sind.

Auf der anderen Seite ist die Entwicklung des Phänotyps von Werten unterhalb des AX2, über ein wildtypisches Verhalten etwa 20 Tage später zu einem zweifach verstärkten Phänotyp beider Mutanten von gleicher Art. Dass beide Mutanten die Expression von Gp70 erhöhen, spricht ebenfalls dafür, dass sie zumindest teilweise den gleichen Signalweg aktivieren. Vermutlich benötigt SSD485 nach 40 bis 50 Tagen den Impuls eines weiteren Proteins, denn hier lässt die Wirkung von SSD485 stark nach. Die Phagozytoserate sinkt wieder unter die des Wildtyps. Diesen Impuls könnte SSB420 geben. Wird es parallel zu SSD485 angesprochen, hält es in AlyA-Mutanten den Phänotyp auf dem Plateau, zeigt aber in SSD485-Überexprimierern keine Wirkung (siehe auch Abbildung 58).

## 10.4 Der AlyA-Gp70-Signalweg

Von den etwa 50 unterschiedlich regulierten Genen in der *AlyA-Knockout*-Mutante und dem Gp70-Überexprimierer sind bisher 14 Proteine detaillierter untersucht worden. Durch die Herstellung und Charakterisierung von *Knockout*- oder überexprimierenden Mutanten konnte eine Reihe der Proteine bisher nicht in den Signalweg eingegliedert werden. So zeigten die Einzelmutanten von SSH819, TipD, SSL793, SSB389, H5, alp und SLI144 keine direkte Wirkung auf die Phagozytose oder den *Plaque*-Durchmesser [57, 76, 109]. Ob eine Veränderung der Expression mehrerer Proteine in einem Phänotyp resultiert, wurde bisher ansatzweise nur für SSL793 und SSD485 untersucht [57]. Für SSJ758 zeigte sich eine Wirkung nur auf die Ausbildung der Fresshöfe [76]. SLB350 hingegen nur auf die Phagozytose [57]. Für die Proteine SSB420 und SSE346 konnten sogar Partikelaufnahme und Fresshofdurchmesser als erhöht und vergrößert nachgewiesen werden [57, 76].

Mit DD3-3, SSD673 und SSD485 wurden in dieser Arbeit drei Proteine charakterisiert, die für eine Funktion oberhalb von Gp70 und als positive Regulatoren der Phagozytose in Frage kamen. Für DD3-3 konnte allerdings in keinem der Experimente ein Phänotyp registriert werden, der für eine Beteiligung des Proteins am Signalweg gesprochen hätte. Für SSD673 zeigten sich zumindest in einigen Experimenten wichtige Hinweise auf eine Funktion unterhalb von AlyA. SSD485 ist damit das einzige hier untersuchte Protein, welches die Bedingungen für eine indirekte Signalübertragung von AlyA auf Gp70 vollständig erfüllt. Eine Rückkopplung der Proteine auf das Lysozym AlyA kann aufgrund der unveränderten Lysozymaktivitäten in den Mutanten ausgeschlossen werden. Aus diesen Ergebnissen ergibt sich der in Abbildung 58 schematisch dargestellte Signalweg.



**Abbildung 58: Modell der Signalkaskade von AlyA über Gp70 bis hin zu einer erhöhten Partikel- und Plaque-Aufnahme.** Die roten aufwärts oder abwärts gerichteten Pfeile beschreiben die Hoch- oder Runterregulation der Proteine. Die Regulation wurde anhand von Überexpressions- oder *Knockout*-Mutanten nachgewiesen. Nachgeschaltete (schwarze Pfeile) Proteinexpressionen wurden über RT-PCR-, Westernblot- oder *Microarray*-Analysen verifiziert. Dabei geben die schwarzen Pfeile nur die Richtung, aber keine direkte Interaktion an. Die Wirkung von SSB420 auf die SSJ758-Expression ist bisher nicht nachgewiesen (Fragezeichen). Die Reihenfolge von SLB350 und SSE346 im Signalweg ist bisher unbekannt und nur letzteres bewirkt einen vergrößerten *Plaque*-Durchmesser. Während mit der vorliegenden Arbeit SSD673 (nicht abgebildet) noch nicht eindeutig in die Kaskade eingegliedert werden konnte, zeigte sich DD3-3 als nicht am Signalweg beteiligt.

Dem Signalweg von AlyA über Gp70 zu einem Anstieg der Phagozytose und/oder der *Plaque*-Durchmesser konnten mittlerweile einige Proteine zugeordnet werden. Die Zusammenhänge zwischen den in Abbildung 58 dargestellten Proteinen sind jedoch stark vereinfacht. Allein die in der Abbildung nicht berücksichtigten Kompartimente, in denen die Proteine lokalisieren, sind sehr unterschiedlich. Zum Beispiel muss das Signal, um von AlyA in lysosomalen Vesikeln zu Gp70 in anderen sauren Kompartimenten zu gelangen, bereits über SSD485 im ER, Golgi-Apparat und/oder über die Plasmamembran weitergeleitet werden. SLB350 auf den Peroxisomen müsste wiederum mit den unbekanntesten SSE436-positiven Vesikeln kommunizieren. Diese Beispiele zeigen, dass die Weiterleitung der Informationen noch keineswegs geklärt ist. Zahlreiche Interaktionen und Komponenten fehlen noch, um diese lokalen Unterschiede zu überwinden. Darüber hinaus wurden über die *Microarrays* nur Genexpressionen verglichen. Über aktivierende oder hemmende Modifikationen und Bindungspartner kann bisher keine Aussage gemacht werden.

Neben der Entschlüsselung des Signalwegs ist jedoch ein weiteres Ziel von entscheidender Bedeutung: die Identifizierung von Regulatoren der Phagozytose. Während nur SSD485 in den Signalweg eingeordnet werden konnte, so können doch wenigstens SSD485 und SSD673 mit dieser Arbeit als positive Regulatoren der Phagozytose gelten.

## 11 Referenzen

1. Aguado-Velasco, C. and M.S. Bretscher, *Circulation of the plasma membrane in Dictyostelium*. Mol Biol Cell, 1999. **10**(12): p. 4419-27.
2. Aizawa, H., K. Sutoh, and I. Yahara, *Overexpression of cofilin stimulates bundling of actin filaments, membrane ruffling, and cell movement in Dictyostelium*. J Cell Biol, 1996. **132**(3): p. 335-44.
3. Alberts, B., *Molecular biology of the cell*. 5th ed. 2008, New York: Garland Science. 1 v. (various pagings).
4. Aubry, L., et al., *Kinetics of endosomal pH evolution in Dictyostelium discoideum amoebae. Study by fluorescence spectroscopy*. J Cell Sci, 1993. **105 ( Pt 3)**: p. 861-6.
5. Bakthavatsalam, D., et al., *A G protein-coupled receptor with a lipid kinase domain is involved in cell-density sensing*. Curr Biol, 2007. **17**(10): p. 892-7.
6. Bakthavatsalam, D., et al., *The secreted Dictyostelium protein CfaD is a chalone*. J Cell Sci, 2008. **121**(Pt 15): p. 2473-80.
7. Bapteste, E., et al., *The analysis of 100 genes supports the grouping of three highly divergent amoebae: Dictyostelium, Entamoeba, and Mastigamoeba*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(3): p. 1414-9.
8. Barth, C., D.J. Fraser, and P.R. Fisher, *Co-insertional replication is responsible for tandem multimer formation during plasmid integration into the Dictyostelium genome*. Plasmid, 1998. **39**(2): p. 141-53.
9. Bertani, G., *Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic Escherichia coli*. J Bacteriol, 1951. **62**(3): p. 293-300.
10. Birnboim, H.C. and J. Doly, *A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA*. Nucleic Acids Res, 1979. **7**(6): p. 1513-23.
11. Bolt, G., C. Kristensen, and T.D. Steenstrup, *Posttranslational N-glycosylation takes place during the normal processing of human coagulation factor VII*. Glycobiology, 2005. **15**(5): p. 541-7.
12. Bomblies, L., et al., *Membrane-enclosed crystals in Dictyostelium discoideum cells, consisting of developmentally regulated proteins with sequence similarities to known esterases*. J Cell Biol, 1990. **110**(3): p. 669-79.
13. Bonner, J.T., et al., *The orientation to light and the extremely sensitive orientation to temperature gradients in the slime mold Dictyostelium discoideum*. J Cell Physiol, 1950. **36**(2): p. 149-58.
14. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal Biochem, 1976. **72**: p. 248-54.
15. Brock, D.A., et al., *Primitive agriculture in a social amoeba*. Nature, 2011. **469**(7330): p. 393-6.
16. Brock, D.A. and R.H. Gomer, *A cell-counting factor regulating structure size in Dictyostelium*. Genes Dev, 1999. **13**(15): p. 1960-9.
17. Buczynski, G., et al., *Evidence for a recycling role for Rab7 in regulating a late step in endocytosis and in retention of lysosomal enzymes in Dictyostelium discoideum*. Mol Biol Cell, 1997. **8**(7): p. 1343-60.
18. Cabral, M., et al., *Unconventional secretion of AcbA in Dictyostelium discoideum through a vesicular intermediate*. Eukaryot Cell, 2010. **9**(7): p. 1009-17.
19. Cardelli, J.A., et al., *Sulfated N-linked oligosaccharides affect secretion but are not essential for the transport, proteolytic processing, and sorting of lysosomal enzymes in Dictyostelium discoideum*. J Biol Chem, 1990. **265**(15): p. 8847-53.
20. Charette, S.J. and P. Cosson, *Preparation of genomic DNA from Dictyostelium discoideum for PCR analysis*. Biotechniques, 2004. **36**(4): p. 574-5.
21. Charette, S.J. and P. Cosson, *Exocytosis of late endosomes does not directly contribute membrane to the formation of phagocytic cups or pseudopods in Dictyostelium*. FEBS Lett, 2006. **580**(20): p. 4923-8.

22. Chen, G., O. Zhuchenko, and A. Kuspa, *Immune-like phagocyte activity in the social amoeba*. Science, 2007. **317**(5838): p. 678-81.
23. Chia, C.P., L. Bomblies, and K.K. Taylor, *Cytoskeletal association of an esterase in Dictyostelium discoideum*. Exp Cell Res, 1998. **244**(1): p. 340-8.
24. Choi, A.H. and C.H. Siu, *Filopodia are enriched in a cell cohesion molecule of Mr 80,000 and participate in cell-cell contact formation in Dictyostelium discoideum*. J Cell Biol, 1987. **104**(5): p. 1375-87.
25. Clarke, M., et al., *Dynamics of the vacuolar H(+)-ATPase in the contractile vacuole complex and the endosomal pathway of Dictyostelium cells*. J Cell Sci, 2002. **115**(Pt 14): p. 2893-905.
26. Cornillon, S., et al., *An adhesion molecule in free-living Dictyostelium amoebae with integrin beta features*. EMBO Rep, 2006. **7**(6): p. 617-21.
27. Cornillon, S., et al., *Phg1p is a nine-transmembrane protein superfamily member involved in dictyostelium adhesion and phagocytosis*. J Biol Chem, 2000. **275**(44): p. 34287-92.
28. Critchley, D.R., *Genetic, biochemical and structural approaches to talin function*. Biochem Soc Trans, 2005. **33**(Pt 6): p. 1308-12.
29. De Duve, C., *The lysosome*. Sci Am, 1963. **208**: p. 64-72.
30. de Hostos, E.L., et al., *Coronin, an actin binding protein of Dictyostelium discoideum localized to cell surface projections, has sequence similarities to G protein beta subunits*. EMBO J, 1991. **10**(13): p. 4097-104.
31. Dimond, R.L., R.A. Burns, and K.B. Jordan, *Secretion of Lysosomal enzymes in the cellular slime mold, Dictyostelium discoideum*. J Biol Chem, 1981. **256**(13): p. 6565-72.
32. Dormann, D., et al., *In vivo analysis of 3-phosphoinositide dynamics during Dictyostelium phagocytosis and chemotaxis*. J Cell Sci, 2004. **117**(Pt 26): p. 6497-509.
33. Eichinger, L., et al., *The genome of the social amoeba Dictyostelium discoideum*. Nature, 2005. **435**(7038): p. 43-57.
34. Elbein, A.D., *Inhibitors of the biosynthesis and processing of N-linked oligosaccharides*. CRC Crit Rev Biochem, 1984. **16**(1): p. 21-49.
35. Evan, G.I., et al., *Isolation of monoclonal antibodies specific for human c-myc proto-oncogene product*. Mol Cell Biol, 1985. **5**(12): p. 3610-6.
36. Fang, J., et al., *A vesicle surface tyrosine kinase regulates phagosome maturation*. J Cell Biol, 2007. **178**(3): p. 411-23.
37. Feige, M.J. and L.M. Hendershot, *Disulfide bonds in ER protein folding and homeostasis*. Curr Opin Cell Biol, 2011. **23**(2): p. 167-75.
38. Fey, P., et al., *Protocols for growth and development of Dictyostelium discoideum*. Nat Protoc, 2007. **2**(6): p. 1307-16.
39. Firtel, R.A. and A.L. Chapman, *A role for cAMP-dependent protein kinase A in early Dictyostelium development*. Genes Dev, 1990. **4**(1): p. 18-28.
40. Gerisch, G., et al., *Cell communication by periodic cyclic-AMP pulses*. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 1975. **272**(915): p. 181-92.
41. Gieselmann, V., *Lysosomal storage diseases*. Biochim Biophys Acta, 1995. **1270**(2-3): p. 103-36.
42. Gomer, R.H., W. Jang, and D. Brazill, *Cell density sensing and size determination*. Dev Growth Differ, 2011. **53**(4): p. 482-94.
43. Hacker, U., R. Albrecht, and M. Maniak, *Fluid-phase uptake by macropinocytosis in Dictyostelium*. J Cell Sci, 1997. **110** ( Pt 2): p. 105-12.
44. Han, J.W., et al., *Role of RacC for the regulation of WASP and phosphatidylinositol 3-kinase during chemotaxis of Dictyostelium*. J Biol Chem, 2006. **281**(46): p. 35224-34.
45. Hanover, J.A. and W.J. Lennarz, *N-Linked glycoprotein assembly. Evidence that oligosaccharide attachment occurs within the lumen of the endoplasmic reticulum*. J Biol Chem, 1980. **255**(8): p. 3600-4.
46. Harris, E. and J. Cardelli, *RabD, a Dictyostelium Rab14-related GTPase, regulates phagocytosis and homotypic phagosome and lysosome fusion*. J Cell Sci, 2002. **115**(Pt 18): p. 3703-13.

47. Hitt, A.L., T.H. Lu, and E.J. Luna, *Ponticulins are atypical membrane proteins*. J Cell Biol, 1994. **126**(6): p. 1421-31.
48. Hong, W. and B.L. Tang, *Protein trafficking along the exocytotic pathway*. Bioessays, 1993. **15**(4): p. 231-8.
49. Howard, P.K., K.G. Ahern, and R.A. Firtel, *Establishment of a transient expression system for Dictyostelium discoideum*. Nucleic Acids Res, 1988. **16**(6): p. 2613-23.
50. Humphries, C.L., et al., *Direct regulation of Arp2/3 complex activity and function by the actin binding protein coronin*. J Cell Biol, 2002. **159**(6): p. 993-1004.
51. Insall, R., et al., *Dynamics of the Dictyostelium Arp2/3 complex in endocytosis, cytokinesis, and chemotaxis*. Cell Motil Cytoskeleton, 2001. **50**(3): p. 115-28.
52. Jang, W. and R.H. Gomer, *Combining experiments and modelling to understand size regulation in Dictyostelium discoideum*. J R Soc Interface, 2008. **5 Suppl 1**: p. S49-58.
53. Jenne, N., et al., *Targeted gene disruption reveals a role for vacuolin B in the late endocytic pathway and exocytosis*. J Cell Sci, 1998. **111 ( Pt 1)**: p. 61-70.
54. Johns, J.A., A.M. Brock, and J.D. Pardee, *Colocalization of F-actin and 34-kilodalton actin bundling protein in Dictyostelium amoebae and cultured fibroblasts*. Cell Motil Cytoskeleton, 1988. **9**(3): p. 205-18.
55. Jung, G., et al., *The Dictyostelium CARMIL protein links capping protein and the Arp2/3 complex to type I myosins through their SH3 domains*. J Cell Biol, 2001. **153**(7): p. 1479-97.
56. Kawli, T., et al., *Correlates of developmental cell death in Dictyostelium discoideum*. Differentiation, 2002. **70**(6): p. 272-81.
57. Konotop, G., *Unveiling the components of the signaling pathway between endosomes and the phagocytic uptake machinery in Dictyostelium discoideum*, in *Fachbereich 18, Naturwissenschaften*. 2010, University of Kassel: Kassel. p. 137.
58. Kreitmeier, M., et al., *A talin homologue of Dictyostelium rapidly assembles at the leading edge of cells in response to chemoattractant*. J Cell Biol, 1995. **129**(1): p. 179-88.
59. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature, 1970. **227**(5259): p. 680-5.
60. Lee, E. and D.A. Knecht, *Visualization of actin dynamics during macropinocytosis and exocytosis*. Traffic, 2002. **3**(3): p. 186-92.
61. Lee, S.S., et al., *Dissection of functional domains by expression of point-mutated profilins in Dictyostelium mutants*. Eur J Cell Biol, 2000. **79**(2): p. 92-103.
62. Lefkir, Y., et al., *The AP-1 clathrin-adaptor is required for lysosomal enzymes sorting and biogenesis of the contractile vacuole complex in Dictyostelium cells*. Mol Biol Cell, 2003. **14**(5): p. 1835-51.
63. Lengsfeld, A.M., et al., *Interaction of phalloidin with actin*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1974. **71**(7): p. 2803-7.
64. Liu, S.L., et al., *Mechanism of a concentration-dependent switch between activation and inhibition of ARP2/3 complex by coronin*. J Biol Chem, 2011.
65. Liu, T., et al., *Altered expression of the 100 kDa subunit of the Dictyostelium vacuolar proton pump impairs enzyme assembly, endocytic function and cytosolic pH regulation*. J Cell Sci, 2002. **115**(Pt 9): p. 1907-18.
66. Maeda, M., et al., *Changing patterns of gene expression in dictyostelium prestalk cell subtypes recognized by in situ hybridization with genes from microarray analyses*. Eukaryot Cell, 2003. **2**(3): p. 627-37.
67. Malchow, D., et al., *Membrane-bound cyclic AMP phosphodiesterase in chemotactically responding cells of Dictyostelium discoideum*. Eur J Biochem, 1972. **28**(1): p. 136-42.
68. Maniak, M., *Endocytic transit in Dictyostelium discoideum*. Protoplasma, 1999. **210**(1): p. 25-30.
69. Maniak, M., *Green fluorescent protein in the visualization of particle uptake and fluid-phase endocytosis*. Methods Enzymol, 1999. **302**: p. 43-50.
70. Maniak, M., *Fluid-phase uptake and transit in axenic Dictyostelium cells*. Biochim Biophys Acta, 2001. **1525**(3): p. 197-204.

71. Maniak, M., *Conserved features of endocytosis in Dictyostelium*. Int Rev Cytol, 2002. **221**: p. 257-87.
72. Maniak, M., *Dictyostelium as a model for human lysosomal and trafficking diseases*. Semin Cell Dev Biol, 2011. **22**(1): p. 114-9.
73. Maniak, M., et al., *Coronin involved in phagocytosis: dynamics of particle-induced relocalization visualized by a green fluorescent protein Tag*. Cell, 1995. **83**(6): p. 915-24.
74. Monnat, J., et al., *Dictyostelium discoideum protein disulfide isomerase, an endoplasmic reticulum resident enzyme lacking a KDEL-type retrieval signal*. FEBS Lett, 1997. **418**(3): p. 357-62.
75. Müller, I., *Biologische Charakterisierung von Lysozym in Dictyostelium discoideum*. , in *Fachbereich 18, Naturwissenschaften*. 2002, Universität Kassel: Kassel. p. 70.
76. Müller, I., *Mögliche Komponenten in einem Signalweg zwischen endosomaler Verdauung und Partikelaufnahme in Dictyostelium discoideum*, in *Fachbereich 18, Naturwissenschaften*. 2006, Universität Kassel: Kassel. p. 128.
77. Muller, I., et al., *A Dictyostelium mutant with reduced lysozyme levels compensates by increased phagocytic activity*. J Biol Chem, 2005. **280**(11): p. 10435-43.
78. Mullins, R.D., *How WASP-family proteins and the Arp2/3 complex convert intracellular signals into cytoskeletal structures*. Curr Opin Cell Biol, 2000. **12**(1): p. 91-6.
79. Myers, S.A., et al., *A Dictyostelium homologue of WASP is required for polarized F-actin assembly during chemotaxis*. Mol Biol Cell, 2005. **16**(5): p. 2191-206.
80. Neuhaus, E.M. and T. Soldati, *A myosin I is involved in membrane recycling from early endosomes*. J Cell Biol, 2000. **150**(5): p. 1013-26.
81. Niewohner, J., et al., *Talin-null cells of Dictyostelium are strongly defective in adhesion to particle and substrate surfaces and slightly impaired in cytokinesis*. J Cell Biol, 1997. **138**(2): p. 349-61.
82. Noegel, A.A., et al., *A protein with homology to the C-terminal repeat sequence of Octopus rhodopsin and synaptophysin is a member of a multigene family in Dictyostelium discoideum*. FEBS Lett, 1990. **266**(1-2): p. 118-22.
83. Ogihara, S., J. Carboni, and J. Condeelis, *Electron microscopic localization of myosin II and ABP-120 in the cortical actin matrix of Dictyostelium amoebae using IgG-gold conjugates*. Dev Genet, 1988. **9**(4-5): p. 505-20.
84. Oishi, N., H. Adachi, and K. Sutoh, *Novel Dictyostelium unconventional myosin, MyoM, has a putative RhoGEF domain*. FEBS Lett, 2000. **474**(1): p. 16-22.
85. Padh, H., et al., *A post-lysosomal compartment in Dictyostelium discoideum*. J Biol Chem, 1993. **268**(9): p. 6742-7.
86. Pellegrini, A., et al., *Bactericidal activities of lysozyme and aprotinin against gram-negative and gram-positive bacteria related to their basic character*. J Appl Bacteriol, 1992. **72**(3): p. 180-7.
87. Peracino, B., et al., *G protein beta subunit-null mutants are impaired in phagocytosis and chemotaxis due to inappropriate regulation of the actin cytoskeleton*. J Cell Biol, 1998. **141**(7): p. 1529-37.
88. Prassler, J., et al., *Interaction of a Dictyostelium member of the plastin/fimbrin family with actin filaments and actin-myosin complexes*. Mol Biol Cell, 1997. **8**(1): p. 83-95.
89. Raper, K.B., *Dictyostelium discoideum, a new species of slime mold from decaying forest leaves*. J. Agr. Res., 1935. **50**: p. 135-147.
90. Raper, K.B. and N.R. Smith, *The Growth of Dictyostelium discoideum upon Pathogenic Bacteria*. J Bacteriol, 1939. **38**(4): p. 431-45.
91. Rauchenberger, R., et al., *Coronin and vacuolin identify consecutive stages of a late, actin-coated endocytic compartment in Dictyostelium*. Curr Biol, 1997. **7**(3): p. 215-8.
92. Ravel, K., et al., *Membrane sorting in the endocytic and phagocytic pathway of Dictyostelium discoideum*. Eur J Cell Biol, 2001. **80**(12): p. 754-64.
93. Rezabek, B.L., et al., *Phagosomal proteins of Dictyostelium discoideum*. J Eukaryot Microbiol, 1997. **44**(4): p. 284-92.
94. Rivero, F., *Endocytosis and the actin cytoskeleton in Dictyostelium discoideum*. Int Rev Cell Mol Biol, 2008. **267**: p. 343-97.

95. Robertson, N.G., et al., *Subcellular localisation, secretion, and post-translational processing of normal cochlin, and of mutants causing the sensorineural deafness and vestibular disorder, DFNA9*. J Med Genet, 2003. **40**(7): p. 479-86.
96. Rupper, A., B. Grove, and J. Cardelli, *Rab7 regulates phagosome maturation in Dictyostelium*. J Cell Sci, 2001. **114**(Pt 13): p. 2449-60.
97. Rupper, A.C., et al., *p110-related PI 3-kinases regulate phagosome-phagosome fusion and phagosomal pH through a PKB/Akt dependent pathway in Dictyostelium*. J Cell Sci, 2001. **114**(Pt 7): p. 1283-95.
98. Ruscetti, T., et al., *Clathrin heavy chain functions in sorting and secretion of lysosomal enzymes in Dictyostelium discoideum*. J Cell Biol, 1994. **126**(2): p. 343-52.
99. Sakuragi, N., et al., *Functional analysis of a novel gene, DD3-3, from Dictyostelium discoideum*. Biochem Biophys Res Commun, 2005. **331**(4): p. 1201-6.
100. Schneider, N., et al., *Golgesin-GFP fusions as distinct markers for Golgi and post-Golgi vesicles in Dictyostelium cells*. Biol Cell, 2000. **92**(7): p. 495-511.
101. Schwarz, E.C., et al., *Dictyostelium myosin IK is involved in the maintenance of cortical tension and affects motility and phagocytosis*. J Cell Sci, 2000. **113** ( Pt 4): p. 621-33.
102. Seastone, D.J., et al., *The WASp-like protein scar regulates macropinocytosis, phagocytosis and endosomal membrane flow in Dictyostelium*. J Cell Sci, 2001. **114**(Pt 14): p. 2673-83.
103. Seastone, D.J., et al., *Overexpression of a novel rho family GTPase, RacC, induces unusual actin-based structures and positively affects phagocytosis in Dictyostelium discoideum*. Mol Biol Cell, 1998. **9**(10): p. 2891-904.
104. Sillo, A., et al., *Genome-wide transcriptional changes induced by phagocytosis or growth on bacteria in Dictyostelium*. BMC Genomics, 2008. **9**: p. 291.
105. Singleton, C.K., R.L. Delude, and C.E. McPherson, *Characterization of genes which are deactivated upon the onset of development in Dictyostelium discoideum*. Dev Biol, 1987. **119**(2): p. 433-41.
106. Siu, C.H., T.Y. Lam, and A.H. Choi, *Inhibition of cell-cell binding at the aggregation stage of Dictyostelium discoideum development by monoclonal antibodies directed against an 80,000-dalton surface glycoprotein*. J Biol Chem, 1985. **260**(29): p. 16030-6.
107. Souza, G.M., et al., *Dictyostelium lysosomal proteins with different sugar modifications sort to functionally distinct compartments*. J Cell Sci, 1997. **110** ( Pt 18): p. 2239-48.
108. Steinert, M., *Pathogen-host interactions in Dictyostelium, Legionella, Mycobacterium and other pathogens*. Semin Cell Dev Biol, 2011. **22**(1): p. 70-6.
109. Stolle, C., *Untersuchung möglicher Komponenten des Signalweges zwischen lysosomaler Verdauung und Zytoskelett-Aktivität bei der Phagozytose in Dictyostelium discoideum.*, in *Fachbereich 18 Naturwissenschaften*. 2005, Universität Kassel: Kassel.
110. Stratford, C.A. and S.S. Brown, *Isolation of an actin-binding protein from membranes of Dictyostelium discoideum*. J Cell Biol, 1985. **100**(3): p. 727-35.
111. Sussman, R. and M. Sussman, *Cultivation of Dictyostelium discoideum in axenic medium*. Biochem Biophys Res Commun, 1967. **29**(1): p. 53-5.
112. Tasaka, M., T. Noce, and I. Takeuchi, *Prestalk and prespore differentiation in Dictyostelium as detected by cell type-specific monoclonal antibodies*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1983. **80**(17): p. 5340-4.
113. Teasdale, R.D. and M.R. Jackson, *Signal-mediated sorting of membrane proteins between the endoplasmic reticulum and the golgi apparatus*. Annu Rev Cell Dev Biol, 1996. **12**: p. 27-54.
114. Temesvari, L.A., et al., *Involvement of the vacuolar proton-translocating ATPase in multiple steps of the endo-lysosomal system and in the contractile vacuole system of Dictyostelium discoideum*. J Cell Sci, 1996. **109** ( Pt 6): p. 1479-95.
115. Thomason, P.A., et al., *An intersection of the cAMP/PKA and two-component signal transduction systems in Dictyostelium*. EMBO J, 1998. **17**(10): p. 2838-45.
116. Troll, H., et al., *Purification, functional characterization, and cDNA sequencing of mitochondrial porin from Dictyostelium discoideum*. J Biol Chem, 1992. **267**(29): p. 21072-9.

117. Urushihara, H., et al., *Analyses of cDNAs from growth and slug stages of Dictyostelium discoideum*. Nucleic Acids Res, 2004. **32**(5): p. 1647-53.
118. Vogel, G., et al., *Mechanism of phagocytosis in Dictyostelium discoideum: phagocytosis is mediated by different recognition sites as disclosed by mutants with altered phagocytotic properties*. J Cell Biol, 1980. **86**(2): p. 456-65.
119. von Figura, K. and A. Hasilik, *Lysosomal enzymes and their receptors*. Annu Rev Biochem, 1986. **55**: p. 167-93.
120. Watts, D.J. and J.M. Ashworth, *Growth of myxameobae of the cellular slime mould Dictyostelium discoideum in axenic culture*. Biochem J, 1970. **119**(2): p. 171-4.
121. Weiner, O.H., et al., *The actin-binding protein comitin (p24) is a component of the Golgi apparatus*. J Cell Biol, 1993. **123**(1): p. 23-34.
122. Wetterauer, B., et al., *Wild-type strains of Dictyostelium discoideum can be transformed using a novel selection cassette driven by the promoter of the ribosomal V18 gene*. Plasmid, 1996. **36**(3): p. 169-81.
123. Wienke, D.C., et al., *Disruption of a dynamin homologue affects endocytosis, organelle morphology, and cytokinesis in Dictyostelium discoideum*. Mol Biol Cell, 1999. **10**(1): p. 225-43.
124. Wuestehube, L.J. and E.J. Luna, *F-actin binds to the cytoplasmic surface of ponticulin, a 17-kD integral glycoprotein from Dictyostelium discoideum plasma membranes*. J Cell Biol, 1987. **105**(4): p. 1741-51.
125. Yang, C., et al., *Mammalian CARMIL inhibits actin filament capping by capping protein*. Dev Cell, 2005. **9**(2): p. 209-21.
126. Yoshida, M., et al., *Cleavage with phospholipase of the lipid anchor in the cell adhesion molecule, csA, from Dictyostelium discoideum*. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol, 2006. **143**(2): p. 138-44.
127. Yuan, A. and C.P. Chia, *Role of esterase gp70 and its influence on growth and development of Dictyostelium discoideum*. Exp Cell Res, 2000. **261**(2): p. 336-47.
128. Zimmermann, R., et al., *Protein translocation across the ER membrane*. Biochim Biophys Acta, 2011. **1808**(3): p. 912-24.