

Mögliche Komponenten in einem Signalweg
zwischen endosomaler Verdauung und
Partikelaufnahme in *Dictyostelium*
discoideum

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der
Naturwissenschaften

Im Fachbereich 18 Naturwissenschaften der Universität
Kassel

Vorgelegt von Iris Müller

Kassel, November 2006

Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorgelegte Arbeit selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und andere als in der Dissertation angegeben 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 anderem Promotions- oder Habilitationsverfahren verwendet worden.

Kassel im November 2006

(Iris Müller)

Kooperationen und andere Beiträge

Der Expressionvektor mit dem Konstrukt AlyA-GFP wurde von Heike Otto kloniert.

Der Northern Blot in Abb. 11 wurde von Branimira Borisova-Todorova angefertigt.

Die Microarray-Analysen wurden mit freundlicher Unterstützung von Ludwig Eichinger, Biochemie I der Universität Köln, durchgeführt.

Die Massenspektrometrie wurde von Oliver Bertinetti, Arbeitsgruppe Biochemie (Prof. Dr. Herberg) der Universität Kassel, durchgeführt.

Publikationen

Teile dieser Arbeit wurden in folgendem Artikel veröffentlicht:

Müller, I., Subert, N., Otto, H., Herbst, R., Ruhling, H., Maniak, M. and Leippe, M. A Dictyostelium mutant with reduced lysozyme levels compensates by increased phagocytic activity. *J Biol Chem* **280**, 10435-43 (2005)

Zusammenfassung

Die Amöbe *Dictyostelium discoideum* ist ein genetisch leicht manipulierbarer Organismus und dient als Modell für verschiedene zelluläre Prozesse, wie z.B. der Endocytose. Hierbei konnte vieles über die Funktion von beteiligten Proteinen anhand von Untersuchungen an spezifischen Mutanten gelernt werden.

Bei AlyA handelt es sich um ein *D. discoideum* spezifisches Lysozym. GFP-modifiziertes AlyA lokalisiert in Phagosomen und in einer neuen Klasse von Vesikeln lysosomaler Enzyme. Über Rescue Mutanten konnte der Phänotyp alyA138 Knockout Mutanten, einer erhöhten Phagocytoserate einhergehend mit einem verbesserten Wachstum auf Bakterienrasen, der gerettet werden.

In AlyA Null Zellen wurde eine erhöhte Expression von Gp70, einer lysosomalen Esterase, gefunden. Die Überexpression von Gp70 alleine führt mit geringen Unterschieden zu einem Phänotyp ähnlich der alyA Knockout Mutante. Demzufolge scheinen beide Enzyme eine Funktion in einer gemeinsamen Signalkaskade, ausgehend von der Degradation internalisierter Bakterien hin zu einer erhöhten Phagocytoserate, zu haben. Eine erhöhte Lysozymaktivität in Gp70 Überexprimierern wurde nicht gefunden.

Mit H5 konnte mittels Microarray Analysen ein Protein identifiziert werden, welches in den alyA138 Knockout Zellen, jedoch nicht in Gp70 Überexprimierern, verstärkt exprimiert wird. Eine Funktion in einer Signalkette zwischen AlyA und Gp70, wie die erhöhte Expression vermuten lässt, konnte jedoch nicht bestätigt werden. So führt die Überexpression von H5 weder zu einer erhöhten Phagocytoserate noch zu einer verstärkten Expression von Gp70.

Mittels der Microarray Analysen konnten weiterhin acht Gene identifiziert werden, die in den beiden Mutanten schwächer exprimiert vorliegen. Knockout Mutanten zweier dieser Gene, sse346 und ssj758, wurden untersucht. Sse346 Null Zellen zeigen eine erhöhte Phagocytoserate einhergehend mit effizienterem Wachstum auf Bakterienrasen, während das Fehlen von Ssj758 nur zu vergrößerten Plaquedurchmessern führte. Beide Proteine haben demnach eine Funktion in der postulierten Signalkaskade. Diese scheint, ausgehend von der Überexpression von Gp70, zweigeteilt zu verlaufen.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.2	Der endocytotische Transit in Dictyostelium discoideum	2
1.2.1	Die Signaltransduktion bei der Internalisierung von Partikeln und Flüssigkeit	2
1.2.2	Internalisierung an der Plasmamembran	6
1.2.3	Die frühe saure Phase	7
1.2.4	Die späte neutrale Phase.....	8
1.2.5	Exocytose	9
1.3	Dictyostelium discoideum als Modellorganismus für die Untersuchung der Endocytose	10
1.4	Der Transport lysosomaler Enzyme	11
1.5	Das Fehlen zweier lysosomalen Enzyme in Dictyostelium discoideum führt zu einer erhöhten Phagocytoserate	12
1.5.1	Das Lysozym AlyA	12
1.5.2	Die Esterase Gp70.....	13
1.6	Zielsetzung der Arbeit	14
2	Ergebnisse	16
2.1	Die Überexpression von Gp70 führt zu einem Phänotyp ähnlich dem der alyA138 Knockout-Mutante	16
2.2	Gp70 und alyA lokalisieren nicht in den gleichen Kompartimenten.....	19
2.3	Beide modifizierte AlyA Fusionsproteine sind funktionell	22
2.4	Erstellen einer Arbeitshypothese	23
2.5	cDNA Microarray-Analysen der alyA138 Knockout-Mutante und des Gp70 überexprimierendem Stamm	24
2.6	Validierung der cDNA Microarrays.....	27
2.7	H5	28
2.7.1	H5 lokalisiert nicht auf Endosomen sondern rein cytoplasmatisch	29
2.7.2	Der Phänotyp der H5 überexprimierenden Stämme	30
2.8	Sse346.....	33
2.8.1	Sse346 lokalisiert auf dem Endoplasmatischen Retikulum, jedoch nicht ausschließlich.....	34
2.8.2	Interaktionsstudien von Sse346 mittels Massenspektrometrie.....	37
2.8.3	Bei Sse346 handelt es sich um ein integrales Transmembranprotein	39
2.8.4	Die Knockout-Mutanten von Sse346 zeigen einen Phänotyp ähnlich dem der alyA138 Knockout-Mutante und der Gp70 überexprimierenden Stämme.....	40
2.8.5	Die Überexpression von Sse346 führt zu keiner Veränderung im Phänotyp.....	42
2.9	Ssj758	46
2.9.1	Ssj758 kolokalisiert mit Aktin.....	46
2.9.2	Der Fehlen von Ssj758 führt zu vergrößerten Plaquedurchmessern, aber nicht zu einer verbesserten Phagocytoserate	48
2.9.3	Die Diskrepanz zwischen Phagocytoserate und Plaquedurchmesser kann trotz unterschiedlicher Ansätze nicht geklärt werden	50
2.9.4	Das Fehlen von Ssj758 führt zu einer verringerten Gp70-Expression	53

2.9.5	Die Überexpression von Gp70 im ssj758 Knockout-Hintergrund führt zu keiner Veränderung des Phänotyps	55
2.9.6	Ssj758 Überexprimierer zeigen eine erhöhte Phagocytoserate dafür aber kleinere Plaques auf Bakterienrasen	57
2.10	cDNA Microarray-Analyse der Sse346 Knockout-Mutante.....	58
3	Diskussion	60
3.1	AlyA lokalisiert auf Phagosomen.....	61
3.2	Die fehlerhafte Expression zweier lysosomaler Enzyme führt zu einer erhöhten Partikelinternalisierung.....	61
3.3	Microarray-Analysen zur Identifikation weiterer Proteine der Signalkaskade	63
3.3.1	Validierung der Ergebnisse der cDNA Microarrays.....	64
3.4	Die Signalkaskade von der Degradation zur Partikel-internalisierung....	65
3.4.1	Zwei der drei untersuchten Proteine sind an der Regulation von Partikelinternalisierung und/oder Plaquesdurchmesser beteiligt.....	66
3.4.2	Die Diskrepanz zwischen Phagocytoserate und Plaquesdurchmesser in den Ssj758 Mutanten.....	69
3.4.3	Ungeklärte Phänotypen	70
3.5	Erfolgt die Expression einiger der in der Signalkaskade involvierten Proteine über Methylierung?	71
3.6	Ausblick.....	72
4	Material.....	74
4.1	Geräte	74
4.2	Verbrauchsmaterialien	76
4.3	Reagenzien	77
4.4	Puffer und Lösungen.....	79
4.5	Medien	83
4.5.1	<i>Escherichia coli</i> -Medien	83
4.5.2	<i>Dictyostelium discoideum</i> -Medien.....	84
4.6	Enzyme und Kits.....	85
4.7	Längen- und Größenstandards	85
4.8	Plasmide	85
4.9	Oligonukleotide	88
4.10	Antikörper.....	88
4.11	Fluoreszenzfarbstoffe.....	89
4.12	Online-Programme.....	90
4.13	Biologische Stämme	90
5	Methoden	91
5.1	Molekularbiologische Methoden.....	91
5.1.1	Präparation von Nucleinsäuren.....	91
5.1.2	Nucleinsäurefällung und PCIA-Extraktion	93
5.1.3	Enzymatische Reaktionen	94
5.1.3.3	Klonierung von DNA-Fragmenten	96
5.1.4	Northern Blot und cDNA Microarrays.....	96
5.1.5	cDNA Microarray-Analysen.....	98
5.2	Transformationstechniken.....	99
5.2.1	Transformationstechniken für <i>E. coli</i>	99
5.2.1.1	99
5.2.1.2	Transformation kompetenter Zellen	99

5.2.2	Transformationstechniken für <i>Dictyostelium discoideum</i>	100
5.2.2.2	Klassische Transformation.....	100
5.3	Zellbiologische Methoden	101
5.3.1	Anzucht in Flüssigmedium	101
5.3.2	Subklonierung von Transformanten	102
5.3.4	Wachstum auf Bakterienrasen	102
5.4	Proteinbiochemische Methoden	103
5.4.1	Gesamtproteinextraktion aus <i>Dictyostelium discoideum</i>	103
5.4.2	Proteinbestimmung nach Pierce BCA Protein Assay Kit.....	103
5.4.3	Photometrische Messung der Lysozym Aktivität.....	103
5.4.4	Membranassoziation.....	104
5.4.5	Immunpräzipitation.....	104
5.5	Polyacrylamid- Gele und Western- Blot Technik.....	104
5.5.1	Entnahme und Vorbereitung von Proteinproben	105
5.5.2	Herstellung von SDS- Polyacrylamidgelen	105
5.5.3	Westernblot.....	106
5.5.4	Immundetektion von Proteinen	106
5.5.5	Coomassie Färbung von Polyacrylamidgelen.....	107
5.6	Präparation von Zellen für die Immunfluoreszenz.....	107
5.6.1	Herstellung des Pikrinsäure/Paraformaldehyd-Fixativs.....	108
5.6.2	DAPI-Färbung.....	108
5.7	Endocytose Assays.....	108
5.7.1	Phagocytose Assay	108
5.7.2	Phagocytose Assay FITC markierter Bakterien/ Latexpartikel	110
5.7.2.1	Herstellung FITC-markierter Bakterien	110
5.7.4	Degradations Assay.....	110
6	Abkürzungen	112
7	Literatur.....	115
8	Anhang.....	124

1 Einleitung

1.1 *Dictyostelium discoideum*

Dictyostelium discoideum wurde zum ersten Mal 1935 von K. B. Raper beschrieben (Raper, 1935) und gehört zu der Klasse der Mycetozoa, die evolutionär vor der Ausbildung von Metazoa und Fungi eine eigene Klasse begründet haben (Baldauf and Doolittle, 1997; Loomis and Smith, 1995). Das natürliche Habitat dieser sozialen Amöbe ist der Waldboden. Dort lebt sie von der Phagozytose unterschiedlicher Bakterienarten (Raper and Smith, 1939) und vermehrt sich durch mitotische Zellteilung. Unter Nahrungsmangel wird ein Entwicklungszyklus initiiert, der nach ca. 24 Stunden abgeschlossen ist. Hierbei strömen etwa 100.000 Zellen zusammen und bilden ein so genanntes Pseudoplasmodium (Brock and Gomer, 1999). Periodische cAMP Pulse steuern dieses Zusammenströmen (Gerisch et al., 1975). Über mehrere Zwischenstadien wird ein Fruchtkörper bestehend aus einem Stiel, dem Sorophor, und einem Sporenkopf, dem Sorokarp, gebildet. Die Sporen stellen dabei eine Überdauerungsform dar, die es dem Organismus erlauben lebensfeindliche Bedingungen zu überstehen.

Durch Mutagenese (Clarke and Kayman, 1987) können die heutzutage verwendeten Laborstämme auch in axenischen Medium kultiviert werden (Watts and Ashworth, 1970). Dabei zeigen die Laborstämme eine um 60-fach erhöhte Pinocytoserate gegenüber der frei lebenden Form (Aguado-Velasco and Bretscher, 1999). Die Phagozytoserate hingegen ist nicht verändert. Im Weiteren wird der von uns verwendete Laborstamm AX2 als Wildtyp bezeichnet.

Dictyostelium discoideum besitzt ein haploides Genom mit einer Größe von ca. 34 Mb, verteilt auf 6 Chromosomen. Die Chromosomen haben dabei eine Größe von 4 bis 7 Mb. (Cox et al., 1990). Im *D. discoideum* cDNA-Projekt wurden insgesamt 26.954 expressed sequence tags (EST's) isoliert und mittels Computer Analyse (PHRAP) ausgewertet. Dabei konnten 5381 unabhängige mRNAs ausgemacht werden (Morio et al., 1998; Urushihara et al., 2004). Die Sequenzen sind unter <http://dictycdb.biol.tsukuba.ac.jp>, im Internet, zu finden. Insgesamt werden für *Dictyostelium discoideum* ca. 12.500 Gene vorhergesagt (Eichinger et al., 2005),

so dass die ESTs ca. die Hälfte aller Gene repräsentieren. Mittlerweile ist das Genom von *Dictyostelium discoideum* vollständig sequenziert (Eichinger et al., 2005) und die Sequenzen aller Chromosomen sind unter <http://www.dictybase.org/> erhältlich.

Aufgrund seiner Lebensweise, aber auch seiner genetisch guten Zugänglichkeit (Eichinger et al., 1999), dient *D. discoideum* heutzutage als Modellorganismus für eine Reihe von zellulären Prozessen, wie z.B. der Zellmotilität, Chemotaxis, Signaltransduktion, Zytokinese, Wirt-Pathogen-Interaktionen und Endocytose (vergleiche hierzu (Chubb and Insall, 2001; Chung et al., 2001; Neuhaus et al., 2002; Noegel and Schleicher, 2000; Rivero and Somesh, 2002; Rupper and Cardelli, 2001; Unal and Steinert, 2006).

1.2 Der endocytotische Transit in *Dictyostelium discoideum*

Bei der Endocytose handelt es sich um einen weit verbreiteten Prozess, welcher die Aufnahme von Partikeln (Phagozytose), Makromolekülen und Flüssigkeit (Pinocytose) umfasst, wobei zwischen Mikropinocytose und Makropinocytose unterschieden wird. Mikropinocytose spielt eine wichtige Rolle in der Aufnahme von Membran Rezeptoren und deren Liganden (Liu, 2001). Es handelt sich um einen Clathrin-abhängigen Prozess, bei dem sich kleine Vesikel von <200 nm Durchmesser in das Zellinnere abschnüren. Bei der Makropinocytose hingegen bilden sich Vesikel mit einer Größe von >1 µm. Dies erlaubt den Zellen eine größere Menge an Flüssigkeit aufzunehmen (Maniak, 2001). Im Gegensatz zu der Pinocytose, die bei vielen eukaryotischen Zellen vorkommt, findet Phagozytose nur bei speziellen Zellen, den so genannten professionellen Phagozyten (Gordon et al, 1999) statt. Hierzu gehören Neutrophile, dendritische Zellen, Makrophagen, *Dictyostelium discoideum* und andere.

1.2.1 Die Signaltransduktion bei der Internalisierung von Partikeln und Flüssigkeit

In *D. discoideum* sind Makropinocytose und Phagozytose biochemisch gesehen zwei unterschiedliche Prozesse, die jedoch große morphologische

Gemeinsamkeiten aufweisen (Cardelli, 2001). Zur Internalisierung von Partikeln und Flüssigkeit wird in beiden Prozessen Aktinpolymerisation benötigt. Eine essentielle Komponente hierbei ist der Arp2/3 Komplex. Dieser Komplex bindet seitlich an bereits existierende Aktin-Filamente, dient als Nukleationskern und generiert so Aktin-Netzwerke (Higgs and Pollard, 2001). Mittels GFP-modifiziertem Arp3 konnte in *D. discoideum* gezeigt werden, dass dieser Komplex sowohl an Orten der Flüssigkeits- als auch der Partikelaufnahme zu finden ist (Insall et al., 2001). Die prominentesten Aktivatoren des Arp2/3 Komplexes sind WASP/Scar Proteine (Higgs and Pollard, 2001). *Dictyostelium discoideum* besitzt zwei WASP und ein Scar Homolog (Rivero and Somesh, 2002). Beide Proteinklassen haben ein oder zwei WASP-homologe Domänen, die monomeres Aktin binden können, eine prolinreiche Domäne, die Profilin und SH3 Domänen anderer Proteine binden und eine am N-Terminus gelegene saure Region, die den Arp 2/3 Komplex bindet. Der restliche N-terminale Bereich ist bei den beiden Proteinklassen unterschiedlich (Rivero and Somesh, 2002). Scar defiziente Mutanten von *D. discoideum* zeigten einen deutlichen Defekt sowohl in Pino- wie auch Phagozytose (Seastone et al., 2001). Dieser Prozess der Aktinpolymerisation wird zudem durch andere Aktin interagierende Proteine stimuliert bzw. inhibiert wie z.B. Coronin (Maniak et al., 1995), Cofilin (Aizawa et al., 1997), DAip1 (Konzok et al., 1999).

Über die Signaltransduktion zur Aufnahme von Partikeln in *D. discoideum* ist vieles noch unklar. In Abbildung 1 ist das heutzutage bestehende Modell, welches im Weiteren beschrieben wird, zusammengefasst. Die Internalisierung beginnt mit der Bindung eines Partikels an einen Rezeptor. Diese sind in *D. discoideum* zum Großteil jedoch unbekannt (s.u.). Hierbei wird es sich wahrscheinlich aber um G-Protein gekoppelte Rezeptoren handeln. So zeigen G_{β} defiziente Stämme eine Phagozytoserate, die bei etwa 20-25% des Wildtyps liegt, während die Macropinocytose nicht beeinflusst ist (Peracino et al., 1998). Die weitere Signalkaskade verläuft über die Aktivierung der Phospholipase C (PLC). So konnte gezeigt werden, dass der PLC Inhibitor U73122 die Phagozytoserate um ca. 90% senkt (Seastone et al., 1999). PLC spaltet das Phosphoinosid $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ (PIP_2) in Diacylglycerol (DAG) und Inositoltriphosphat (IP_3) auf. Die Bildung von IP_3 führt dabei zu einem intrazellulären Calciumausstoß, welcher sich positiv auf die Phagozytose auswirkt (Yuan et al., 2001). Die Bildung von DAG

dient zur Rekrutierung verschiedener Proteine. So ist z.B. für den GEF (guanine exchange factor) von Rap1 bekannt, dass er an DAG bindet. Die konstitutiv aktive Form von Rap1 sowie die Überexpression des wildtypischen Proteins führen zu einer erhöhten Phagozytoserate, während die Makropinocytose inhibiert wird (Seastone et al., 1999). Ebenso zeigen RacC überexprimierende Mutanten eine dreifach erhöhte Phagozytoserate, während die Pinocytoserate um das dreifache verringert wird (Seastone et al., 1998). Auch für verschiedene andere Proteine der Ras Familie ist bekannt, dass sie eine Funktion bei der Internalisierung von Partikeln und/oder Flüssigkeit haben. So konnte für einen Komplex aus Rab21 zusammen mit CHLim und LimF ebenfalls eine Rolle bei der Partikelinternalisierung ausgemacht werden (Khurana et al., 2005). Während RacH defiziente Zellen hingegen nur einen Defekt bei der Aufnahme von Flüssigkeit zeigen (Somesh et al., 2006). Für RasS (Chubb et al., 2000), RacF (Rivero et al., 1999), Rab7 (Rupper et al., 2001a), Rac1b (Duleh et al., 2006) und RabD (Harris and Cardelli, 2002) konnte gezeigt werden, dass sie sowohl einen Einfluss auf die Phagozytose als auch auf die Makropinocytose haben. Rho-like GTPasen sind dann für die Aktivierung von WASP/Scar Proteinen verantwortlich (Higgs and Pollard, 2001; Lee et al., 2001) und somit zur Regulation der Aktinpolymerisation.

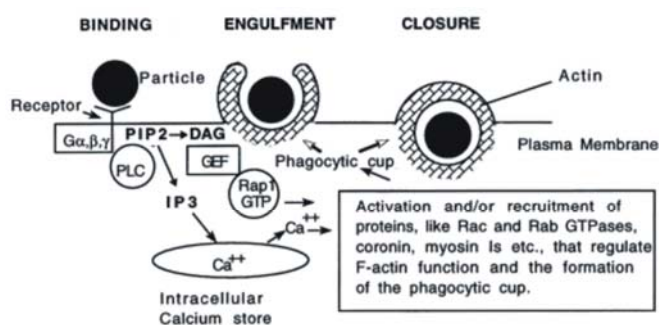


Abb. 1: Modell der Signaltransduktion zur Regulation der Phagozytose in

D. discoideum. Die Bindung von Partikeln an einen G-Protein-gekoppelten Rezeptor führt zu einer Aktivierung der PLC. PIP₂ wird in DAG und IP₃ gespalten. Hierbei führt die Bildung von IP₃ zu einem intrazellulären Calciumausstoß. DAG dient

zur Rekrutierung von Rap1, über dessen GEF. Über verschiedene andere Proteine führt dies zur Aktinpolymerisation und somit zur Internalisierung des Partikels. (Übernommen aus Seastone et al., 1999)

PIP₂ ist ebenfalls Ausgangspunkt für die Regulation in der Macropinocytose. Hierbei dient PIP₂ jedoch nicht als Substrat für die PLC sondern für PI 3-Kinasen, wobei in diesem Prozess ebenfalls PIP₃ gebildet wird (Cardelli, 2001). In *Dictyostelium discoideum* sind drei unterschiedliche PI 3-Kinasen bekannt. Es konnte gezeigt werden, dass der Doppel-Knockout von DdPIK1 und DdPIK2 eine verringerte Makropinocytoserate zur Folge hat aber keinen Einfluss auf die

Phagocytoserate ausübt (Buczynski et al., 1997b). Doppel-Knockout Mutanten von DdPIK1 und DdPIK3 sowie von DdPIK2 und DdPIK3 waren letal (Zhou et al., 1995). Dies führte zuerst zur der Annahme, dass die PI 3-Kinase- Kaskade allein die Makropinocytose reguliert. Neuere Studien zeigen jedoch, dass sie auch die Phagocytose beeinflusst. So konnte gezeigt werden, dass der PI 3- Kinase Inhibitor LY294002 bei einer Konzentration von über 50 μM ebenfalls einen negativen Einfluss auf die Phagocytose ausübt (Dormann et al., 2004). Genaueres hierzu ist jedoch nicht bekannt.

Eine wichtige Rolle bei der Internalisierung von Flüssigkeit nimmt das Aktinmonomer-bindende Protein Profilin ein. Doppelknockout Mutanten von beiden Profilin Isoformen in *D. discoideum* zeigten eine verringerte Pinocytose-Aktivität, während die Phagocytose positiv beeinflusst ist (Temesvari et al., 2000). Die Deletion von Scar im Profilin Knockout Hintergrund verstärkt den Pinocytose Defekt (Seastone et al., 2001). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Profilin die PI 3-Kinase bindet und aktivieren kann (Secko et al., 2004; Singh et al., 1996; Temesvari et al., 2000). Die Ausbildung dieses Komplexes bestehend aus Profilin, PI 3-Kinase und Scar an PIP_2 führt zur Aktinpolymerisation (Temesvari et al., 2000). PIP_3 dient als Signalmolekül für weitere Proteine, die das Aktin Cytoskelett ihrerseits modifizieren (Rupper and Cardelli, 2001).

PIP_2 nimmt also eine zentrale Rolle bei der Signaltransduktion in Macropinocytose und Phagocytose ein (siehe Abb.2). Es wird vermutet, dass hierbei die Inhibition des einen Weges den anderen Weg fördert (Rupper and Cardelli, 2001).

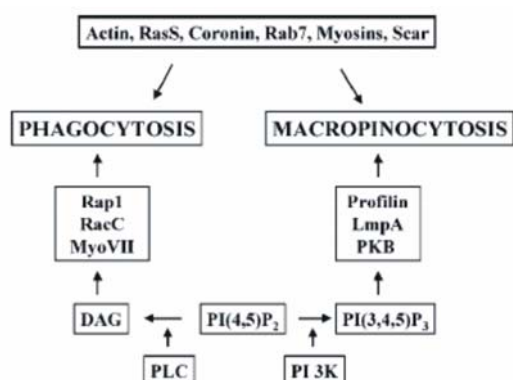


Abb. 2: Phagocytose und Macropinocytose werden über zwei unterschiedliche Mechanismen reguliert.

PIP_2 spielt eine zentrale Rolle in der Phago- und Macropinocytose. Während Phagocytose über PLC reguliert wird (s.o.), erfolgt die Signaltransduktion bei der Macropinocytose über PI 3-Kinasen, Profilin und LmpA. (Übernommen aus Duhon et al., 2002)

Im nächsten Abschnitt soll nun auf den endocytotischen Transit in *D. discoideum* eingegangen werden. Dieser kann in vier Phasen unterteilt werden: Internalisierung an der Plasmamembran, eine frühe saure Phase, sowie eine

späte neutrale Phase und Exocytose. Eine Übersicht des Transits ist in Abbildung 3 zu finden.

1.2.2 Internalisierung an der Plasmamembran

Die Internalisierung von Partikeln beginnt mit der Bindung eines Partikels an einen Rezeptor. Dies kann vermutlich bei *Dictyostelium discoideum* durch zwei unterschiedliche Mechanismen geschehen. Die Bindung eines Partikels an einen Rezeptor über Glucose-Reste, wie z.B. bei Bakterien, und eine Bindung über hydrophobe Interaktionen, wie z.B. an Latex-Beads (Vogel et al., 1980). Bei dem Transmembranprotein Phg1 handelt es sich vermutlich um einen Rezeptor der zweiten Art. Knockout Mutanten dieses Proteins zeigen selektiv einen Phagozytose-Defekt in Bezug auf Latex-Beads und *E. coli* Zellen, aber nicht bei der Internalisierung von *Klebsiella aerogenes* (Cornillon et al., 2000). Weitere Rezeptoren sind jedoch nicht bekannt.

Nachdem der Partikel an die Plasmamembran gebunden hat, kommt es zu einer trichterförmigen Ausstülpung. Hierbei wird ein phagocytotischer „cup“ um einen Partikel gebildet. Bei der Pinocytose werden so genannte „crowns“ gebildet, die ein Aliquot Flüssigkeit einschließen. Die Enden der Ausstülpungen verschmelzen nachfolgend miteinander und entlassen dann das frisch gebildete Phagosom bzw. Macropinosom in die Zelle (Hacker et al., 1997). Bei der Bildung dieser Ausstülpungen spielt die Polymerisation von Aktin (s.o.) ebenso wie verschiedene molekulare Motoren der Myosin I-Familie eine wichtige Rolle (Durrwang et al., 2006; Maniak, 2003). Für PakB (p21-activated Kinase B), einem Regulator von Proteinen der Myosin I Familie, konnte ebenfalls gezeigt werden, dass er an Orten der Partikel- bzw. der Flüssigkeitsaufnahme lokalisiert. Die Expression von katalytisch aktivem PakB stimuliert die Phago- bzw. Pinocytoserate. Die Lokalisation erfolgt hierbei wahrscheinlich über die Bindung an Rho-GTPasen wie Rac1a/b/c, RacA, RacB, RacC und RacF1 (de la Roche et al., 2005).

Ein Hülle aus Aktin und Aktin-interagierenden Proteinen bleibt bis ca. 1 Minute nach Internalisation bestehen und dissoziiert dann ab (Hacker et al., 1997; Maniak et al., 1995; Rauchenberger et al., 1997).

1.2.3 Die frühe saure Phase

Innerhalb kürzester Zeit nach Abdissoziieren der Aktin Hülle wird das Endosom auf einen pH-Wert von ungefähr 5 angesäuert (Aubry et al., 1993; Padh et al., 1993). Dies geschieht durch die Verschmelzung des frühen endosomalen Kompartiments mit Vesikeln, die eine H⁺-ATPase auf ihrer Oberfläche tragen (Clarke et al., 2002; Clarke and Madder, 2006). Dies ist ein wichtiger Schritt für die Degradation von internalisiertem Material, da viele lysosomale Enzyme ein pH-Optimum im sauren Bereich haben.

Ebenfalls mit dem Abdissoziieren des Aktin Coats wird Rab 7 eine kleine GTPase angeliefert (Buczynski et al., 1997a; Rupper et al., 2001a). Rab GTPasen funktionieren als molekulare Timer (Rybin et al., 1996) und konnten bei unterschiedlichen Fusions- und Fissionsereignissen als Regulatoren ausgemacht werden (Seachrist and Ferguson, 2003; Takai et al., 2001). Zellen die dominant-negatives Rab 7 exprimieren, zeigten eine verzögerte Anlieferung einiger lysosomaler Enzyme, wie α -Mannosidase und LmpA, während die H⁺-ATPase mit wildtypischer Kinetik zu dem Endosom gebracht wird (Rupper et al., 2001a). Weiterhin sind verschiedene SNARE Proteine an Fusionen von Kompartimenten beteiligt. So scheint ein Komplex aus Syntaxin7-Vti1-Syntaxin8 mit Vamp7 an der Fusion von Endosomen mit Vesikeln lysosomaler Enzyme beteiligt zu sein (Bogdanovic et al., 2002).

Souza et al. zeigten, dass lysosomale Enzyme mit unterschiedlichen Kinetiken in das Endosom angeliefert werden. So sind bereits 3 Minuten nach Internalisierung Cystein-Proteasen und andere Enzyme, welche eine N-Acetylglucosamin-1-Phosphat (GlcNAc-1-P) Modifikation tragen, auf dem Endosom zu finden, wohingegen Enzyme mit einer Mannose-6-Sulfat Modifizierung erst zu einem späteren Zeitpunkt zu dem so genannten Lysosom gebracht werden. Eine Kolokalisation beider Sets lysosomaler Enzyme konnte nicht detektiert werden (Souza et al., 1997). Dies lässt darauf schließen, dass lysosomale Enzyme recycelt werden. Weiterhin konnte für zwei lysosomale Enzyme, Cathepsin D und CP34, eine nicht synchrone Anlieferung bzw. Abtransport von Phagosomen sichtbar gemacht werden (Gotthardt et al., 2002).

Ein drittes Set lysosomaler Enzyme wird durch zwei Esterasen, nämlich Gp70 und D2, gekennzeichnet. Bei diesen so genannten Esterosomen wird vermutet, dass sie erst spät in das Lysosom eingebracht werden (Yuan and Chia, 2000).

Von Clarke et al. (2006) konnte gezeigt werden, dass die Fluoreszenz von Bakterienzellen, welche cytoplasmatisch GFP exprimieren, gleichzeitig mit der Ansäuerung des Endosoms verschwindet.

1.2.4 Die späte neutrale Phase

Durch vesikulären Abtransport der Vakuolären H^+ -ATPase wird das Lumen des Endosoms neutralisiert, wobei der pH Wert auf ungefähr 6 angehoben wird. Dieser Vorgang ist ca. 45 min nach Internalisierung abgeschlossen (Clarke et al., 2002; Padh et al., 1993).

Dieses post-lysosomale Kompartiment wird wiederum mit Aktin umgeben (Rauchenberger et al., 1997). Auch sind wiederum Aktin interagierende Proteine wie Scar (Seastone et al., 2001), Arp2/3 (Insall et al., 2001) und Coronin (Rauchenberger et al., 1997) an diesem Prozess beteiligt. Diese Aktin-Hülle verhindert vermutlich die homotypische Fusion von späten Endosomen. Wird sie durch ein Fusionsprotein aus Vacuolin B und Cofilin zerstört, finden sich viele aggregierte späte Endosomen in der Zelle. (Drengk et al., 2003).

Die Hülle aus Coronin dissoziiert ab und wird durch Vacuolin ersetzt (Jenne et al., 1998; Rauchenberger et al., 1997). Zellen denen Vacuolin B fehlt, zeigen ein stark vergrößertes spätes Endosom und eine verzögerte Exocytose (Jenne et al., 1998). Ähnliches gilt für Zellen, die dominant-negatives Rab 7 exprimieren. Diese zeigen ebenfalls einen Defekt in der Exocytose. Während bei Vacuolin B defizienten Zellen die Sekretion von lysosomalen Enzymen verringert ist (persönliche Mitteilung Nadine Pawolleck), zeigten dominant-negatives Rab 7-exprimierende Zellen eine verstärkte Sekretion lysosomaler Enzyme und ein vergrößertes saures Endosomen (Buczynski et al., 1997a). Hierbei wird vermutet, dass Rab 7 eine Rolle im Recycling von Membranen und lysosomalen Enzymen zukommt. Dies ist erstreckt sich auf einen Beitrag von Rab 7 in der Anlieferung von lysosomalen Enzymen an das frühe Endosom (Rupper et al., 2001b).

1.2.5 Exocytose

Die Exocytose erlaubt die Abgabe von nicht verwertbarem Material und Abbauprodukten in das umgebende Medium. Sie erfolgt ca. 60- 90 min nach der Internalisierung (Jenne et al., 1998). Hierbei werden auch lysosomale Enzyme, wie α -Mannosidase und β -Glucosidase mit ausgeschieden (Dimond et al., 1981). An Orten der Exocytose ist eine Lokalisation von Vacuolin auf der Plasmamembran zu finden (Jenne et al., 1998).

Eine schwache Hülle aus Aktin um das post-lysosomale Kompartiment, wird kurz vor der Entleerung des Inhaltes noch einmal verstärkt (Lee and Knecht, 2002). Die Funktion dieser Aktinpolymerisation wird zurzeit noch diskutiert. Zellen, die mit einer Droge behandelt wurden, welche negativ auf das Aktincytoskelett wirken, zeigten einen Exocytosedefekt (Rauchenberger et al., 1997). Ebenfalls führt das Fehlen von Triax, einem Rac-GEF welcher auf späten Endosomen lokalisiert und direkt mit Aktin interagieren kann, zu einer verzögerten Exocytose. Proteine der Rac-Familie, die auf späten Endosomen lokalisieren, sind jedoch nicht bekannt (Strehle et al., 2006).

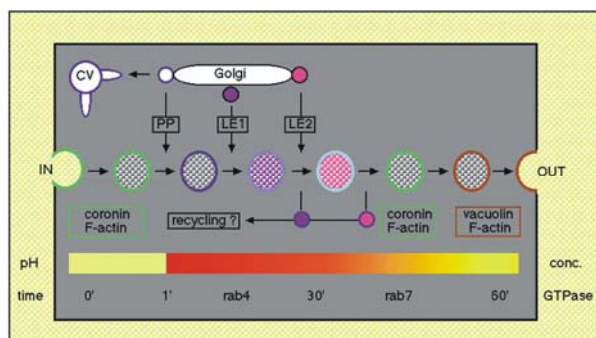


Abb. 3: Schematische Darstellung des endocytotischen Transits in *D. discoideum*.

Nach abdissoziieren der Aktinhülle und Coronin (grün) wird die vakuoläre H^+ ATPase an das Endosom angeliefert. Die damit einhergehende Ansäuerung (pH-Wert Änderung ist im unterer Balken dargestellt, rot =sauer und gelb=neutral) schafft optimale Voraussetzungen für die Degradation von internalisiertem Material (lila bzw.

pink schraffiertes Endosom). Hierzu werden lysosomale Enzyme (LE1, lysosomale Enzyme mit Glc-NAc-1-P-Modifikation; LE2, lysosomale Enzyme mit Man-6-SO₄-Modifikation) ausgehend vom Golgi an das Endosom angeliefert. Coronin auf dem postlysosomalen Kompartiment wird durch Vacuolin (braun) ersetzt. Nach ca. 60 min erfolgt die Exocytose nicht verwertbaren Materials. (Übernommen aus Maniak, 1999)

1.3 *Dictyostelium discoideum* als Modellorganismus für die Untersuchung der Endocytose

Im Gegensatz zum endocytotischen Transit in *D. discoideum* sind Lysosomen bei menschlichen Zellen „Dead-end“ Kompartimente. Defekte in wesentlichen Bestandteilen der Lysosomen führen beim Menschen zu Krankheiten, oftmals mit dramatischen Effekten für den Betroffenen (Gieselmann, 1995). Hierbei können Proteine mit unterschiedlichen Funktionen betroffen sein: 1) Proteine, welche am Transport oder bei Fusion- oder Fission-Ereignissen verantwortlich sind, 2) lysosomale Enzyme und 3) Proteine, welche an posttranslationalen Modifikationen oder am Transport von lysosomalen Enzymen beteiligt sind (Winchester et al., 2000). Verschiedene Ergebnisse lassen darauf schließen, dass die Funktion unterschiedlicher Proteine, welche am lysosomalen System beteiligt sind, konserviert in der Evolution zwischen *D. discoideum* und Mensch beibehalten wurden (Maniak, 1999). Das so genannte Chediak-Higashi-Syndrom beispielsweise wird durch Mutationen im LYST-Protein, für welches eine Funktion in Fusion- oder Fission-Ereignissen vermutet wird, bedingt und führt beim Menschen zu vergrößerten Lysosomen (Barbosa et al., 1996). *Dictyostelium discoideum* Zellen, denen das homologe Protein fehlt, hier genannt LvsB, zeigen den gleichen Defekt (Cornillon et al., 2002; Harris et al., 2002). Auch sind viele andere der beschriebenen Vorgänge in der Endocytose genauso auch in menschlichen Zellen zu finden. Anhand der Untersuchungen von lysosomalen Speicherkrankheiten im Menschen konnte vieles über diesen Prozess gelernt werden, dennoch lohnt es sich die Funktion von unbekanntem Proteinen in *D. discoideum* zu untersuchen. So konnte beispielsweise für Coronin zuerst eine Funktion im endocytotischem Transit von *D. discoideum* identifiziert werden (Maniak et al., 1995) und erst später konnte diese auch in menschlichen Zellen verifiziert werden (Rybakin and Clemen, 2005; Utrecht and Bear, 2006).

Bei vielen lysosomalen Enzymen handelt es sich um Exoenzyme, die Makromoleküle von ihren Enden aus verdauen. Fehlt eines dieser Enzyme, wird die gesamte weitere Degradation blockiert. *D. discoideum* Zellen können diese partiell verdauten Intermediate oder auch dabei entstehende toxische Abfallprodukte exocytieren, während es bei menschlichen Zellen zu einer Anhäufung in Lysosomen kommt (Winchester et al., 2000). Das Fehlen von

Cathepsin D beispielsweise führt in *D. discoideum* zu keiner offensichtlichen Veränderung im Phänotyp (Journet et al., 1999), während Mutationen in diesem Protein bei Mäusen und Schafen einen erheblichen Defekt verursachen (Tyynela et al., 2000). Deshalb könnten Untersuchungen an *D. discoideum* hierbei weitere Einblicke in die Funktion lysosomaler Enzyme geben, gerade bei solchen Enzymen, deren Mutation letal bei menschlichen Zellen wäre.

1.4 Der Transport lysosomaler Enzyme

In Säugerzellen, ebenso wie in *D. discoideum*, erfolgt der Transport lysosomaler Enzyme über mehrere Zwischenstationen zu ihrem Bestimmungsort, dem Lysosom. Nach der Transkription wird das Protein cotranslational in das ER translatiert. Ein Signalpeptid am N-Terminus steuert den Transport zum ER. Dieses Signalpeptid, bestehend aus 15-30 meist hydrophoben Aminosäuren, wird im Inneren des ERs abgeschnitten. Hier erhalten die Enzyme weiterhin Asparagin-gebundene Zuckermodifikationen, welche im weiteren Transport durch den Golgi modifiziert werden. Beim Menschen erfolgt die Sortierung am Trans-Golgi-Network (TGN) über Mannose-6-Phosphat Glycosylierung und deren spezifischen Rezeptoren (von Figura and Hasilik, 1986). Ein homologer Rezeptor wurde in *Dictyostelium discoideum* bisher nicht gefunden. Es ist unklar ob eine Mannose-6-Phosphat Modifikation bzw. ob N-gebundene Oligosaccharide überhaupt in die Sortierung lysosomaler Enzyme in *D. discoideum* involviert sind (Cardelli et al., 1990).

Ebenso wie bei menschlichen Zellen nimmt der Adaptor Protein 1 (AP1) Komplex bei *D. discoideum* eine wichtige Rolle in dem Transport lysosomaler Enzyme vom TGN zu den Lysosomen ein (Lefkir et al., 2003). Dieser kann mit Tyrosin-basierenden und/oder Dileucin-basierenden Sortierungssignalen der Rezeptoren interagieren. Der Transport ist Clathrin abhängig (Rouille et al., 2000). Im Lysosom wird das Enzym aufgrund des sauren pH-Wertes vom Rezeptor entlassen und die meisten Enzyme erfahren eine partielle proteolytische Spaltung, aus der das Enzym in seiner aktiven Form hervorgeht (Gieselmann, 1995).

1.5 Das Fehlen zweier lysosomalen Enzyme in *Dictyostelium discoideum* führt zu einer erhöhten Phagozytoserate

Ausgangspunkt für diese Dissertation war das Auffinden zweier Mutanten in lysosomalen Enzymen in *D. discoideum* (*alyA138* Knockout Zellen und Gp70 Überexprimierer), die beide eine Erhöhung der Phagozytoserate aufwiesen. Im Weiteren sollen diese beiden Mutanten charakterisiert werden.

1.5.1 Das Lysozym AlyA

Lysozym ist ein bakterizides Enzym, welches die Bakterienzellwand spaltet. Hierbei wird die β -glycosidische Bindung zwischen der N-Acetylmuraminsäure und N-Acetylglucosamin hydrolysiert. Das Polysaccharid der Bakterienzellwand wird dabei zu Disacchariden abgebaut, die Bakterien verlieren ihre mechanische Stabilität und platzen aufgrund des hohen osmotischen Druckes im Zellinneren.

Lysozyme konnten in einer Reihe von Organismen unterschiedlicher Reiche gefunden werden wie Bakterien, Bakteriophagen, Pilzen, Pflanzen und Tieren (Jolles and Jolles, 1984). Sie dienen dort als Schlüsselkomponente in der antibakteriellen Abwehr. In der Lunge von Mäusen beispielsweise stellt Lysozyme eine der prominentesten Enzyme mit bakteriolytischen Aktivität dar. Es werden zwei Isoformen von Lysozym exprimiert. Mäuse denen die M Isoform fehlt, welche stärker in der Lunge exprimiert wird, zeigen eine erhöhte Expression der P Isoform. Dennoch zeigen diese Mutanten eine erhöhte Sensitivität gegenüber Infektionen der Lunge (Markart et al., 2004). Menschliche Monocyten und Makrophagen produzieren ebenfalls Lysozym. Hierbei wird ca. ein Drittel in Lysosomen gespeichert, während der Rest sezerniert wird (Gupta et al., 1985; Ralph et al., 1976). Auch in den cytoplasmatischen Granulae, Lysosomen ähnlichen Strukturen, von *Entamoeba histolytica* sind zwei Lysozyme zu finden. Diese Granulae enthalten eine Vielzahl an proteolytisch aktiven Enzymen und dienen einerseits der Degradation von phagozytierten Bakterien und andererseits der Zerstörung der Wirtszelle (Leippe, 1999). Diese Lysozyme zeigten keine Homologien zu anderen Lysozymen und wurden deshalb einer eigenen Klasse von Amöben-Lysozymen zugeordnet (Leippe, 1999; Nickel et al., 1998). Bei

Entamoeba histolytica handelt es sich um einen engen Verwandten von *D. discoideum* (Baptiste et al., 2002). Lysozyme aus *Dictyostelium discoideum* sollten deshalb eine große Ähnlichkeit zu denen aus *E. histolytica* aufweisen. Es konnten auch zwei Lysozyme im Genom von *D. discoideum* gefunden werden, bei denen es sich um Homologe handelt.

In dem Genom von *D. discoideum* sind elf potentielle Lysozyme zu finden die vier Klassen zugeordnet werden können: die T4-Bakteriophagen ähnlichen, die der C-Klasse aus dem Hühnereiweiß und Homologe zu *Entamoeba histolytica* spezifischen Lysozymen. Die vierte Klasse beschreibt Lysozyme die spezifisch für *D. discoideum* sind, genannt AlyA (für Amöben Lysozyme A) bis AlyD. Das am stärksten exprimierte Lysozym AlyA konnte aufgereinigt werden und zeigte ein Aktivitätsoptimum in der Spaltung von *Micrococcus luteus* Zellwandbestandteilen bei einem pH Wert von 4,5 bis 6 (Müller et al., 2005). Das Protein, mit einer Größe von ca. 13 kDa, trägt keine Glycosylierungen und besitzt N-terminal ein ER Signalpeptid, gefolgt von einer katalytischen Domäne und einer Prodomäne, welche in dem reifen Enzym nicht mehr zu finden ist. (Müller et al., 2005).

AlyA defiziente Stämme zeigten anfänglich ein verringertes Wachstum auf Bakterienrasen. Dieser Defekt konnte von den Zellen jedoch innerhalb weniger Wochen kompensiert werden. In einer der Mutanten (alyA138) stieg die Phagozytoserate und der Plaquedurchmesser auf Bakterienrasen hierbei bis auf das Doppelte des Wildtyps an. Die Pinocytoserate hingegen war nicht betroffen (Müller et al., 2005). Um den Mechanismus der Kompensation zu klären, wurde die Expression unterschiedlicher Aktin interagierender Proteine und lysosomaler Enzyme untersucht. Die einzige Veränderung lag zunächst in einer verstärkten Expression von Gp70 (Müller, 2002).

1.5.2 Die Esterase Gp70

Gp 70, eine N-glycosylierte lysosomale Esterase in *D. discoideum*, lokalisiert in membranumgebenen kristallinen Strukturen in der Zelle, den so genannten Esterosomen (Bomblies et al., 1990). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass dieses Protein ebenfalls auf Phagosomen ankonzentriert wird. Diese Lokalisation und ein Aktivitätsoptimum bei einem pH-Wert von 5 bis 7,5 lässt darauf schließen,

dass diesem Protein eine Funktion in der Degradation von endocytisiertem Material zuzuschreiben ist (Yuan and Chia, 2000).

Gp70-überexprimierende Mutanten zeigten, neben einer um 22% gesteigerten Phagozytoserate, vergrößerte Plaquesdurchmesser nach 8 Tagen des Wachstums auf Bakterienrasen (Yuan and Chia, 2000).

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Bei dem am stärksten exprimierten Lysozym in *D. discoideum* handelt es sich um AlyA, einem *D. discoideum* spezifischen Lysozym (Müller et al., 2005). Einige grundsätzliche Erkenntnisse über die Funktion von AlyA konnten in meiner vorangegangenen Diplomarbeit (Müller, 2002) gewonnen werden.

Der Aufbau von AlyA, ebenso wie ein pH-Optimum im sauren Bereich, lässt darauf schließen, dass es sich bei diesem Lysozym um ein lysosomales Enzym handelt, welches in Lysosomen lokalisiert und an der Degradation von internalisierten Bakterien beteiligt ist. Lokalisationsstudien mit GFP- bzw. myc-modifizierten Fusionskonstrukten sollen hierbei weiteren Aufschluss darüber geben, welche Lokalisation und damit Funktion AlyA in der Zelle einnimmt. Ebenso soll durch Rettungsversuche untersucht werden, ob die erhöhte Phagozytoserate in den alyA138 Knockout Mutanten tatsächlich durch das Fehlen von AlyA bedingt wird. Dies wäre der zweite Fall, bei dem für die fehlerhafte Expression eines lysosomalen Enzyms in *D. discoideum* gezeigt werden könnte, dass dies einen Einfluss auf das phagozytotische Verhalten ausübt. Bei dem anderen Fall handelt es sich um die Überexpression von Gp70. Die Expression dieser Esterase war in der alyA138 Knockout Zellen ebenfalls erhöht. Beide zeigen einen ähnlichen Phänotyp. Es stellte sich die Frage, ob der Phänotyp der alyA138 Knockout Mutante alleinig durch die fehlerhafte Expression von Gp70 bedingt ist. Vergleiche der Phänotypen beider Mutanten sollte helfen dies zu untersuchen. Beide Mutanten lassen jedoch vermuten, dass ein Signalweg von der Degradation von Bakterien hin zur Internalisierung besteht. Dieser soll im Weiteren untersucht werden. Mit Hilfe von cDNA Microarray Analysen sollen Proteine identifiziert werden, deren Expressionslevel in beiden Mutanten verändert vorliegen. Durch Herstellung von Mutanten einiger dieser Proteine soll verifiziert werden, ob diese Proteine tatsächlich an der vermuteten Signalkaskade beteiligt sind.

Anmerkung:

Im Laufe dieser Arbeit wurden zwei unterschiedliche Chargen von Wildtypzellen als Elternstämme für die neukonstruierten Mutanten verwendet. Sie unterscheiden sich geringfügig in der Phagocytoserate. Die AlyA138 und die Gp70-überexprimierende Mutanten wurden dabei in einem Elternstamm gemacht, während die Mutanten von H5, Sse346 und Ssj758 in dem anderen Stamm hergestellt wurden, so dass ein direkter Vergleich der Mutanten nicht möglich ist. Daher wurden alle Ergebnisse auf den jeweiligen Elternstamm bezogen. Die generelle Schlussfolgerung der Arbeit, dass alyA, Gp70, Sse346 und Ssj758 in einer Signalkaskade liegen, bleibt davon unberührt.

2 Ergebnisse

2.1 Die Überexpression von Gp70 führt zu einem Phänotyp ähnlich dem der *alyA138* Knockout-Mutante

Wie bereits in der Einleitung (siehe 1.5.1) beschrieben, konnte mittels Western Blot Analyse gezeigt werden (Abb. 4), dass das Ausschalten von AlyA zu einer erhöhten Expression von Gp70 führt. Überexprimierer waren bereits bekannt und publiziert (Yuan and Chia, 2000) und auch sie zeigten eine erhöhte Phagozytoserate. Zum Beginn dieser Arbeit stellte sich die Frage, ob der Phänotyp der *alyA138* Knockout-Mutante allein aus der Überexpression von Gp70 resultiert. Um dies zu untersuchen, sollten beide Mutanten miteinander verglichen werden. Um vergleichbare Bedingungen zu schaffen, wurden neue Überexprimierer in dem laboreigenen Wildtyp Stamm hergestellt und untersucht. Sollte allein die Überexpression von Gp70 zu dem *alyA138* Knockout Phänotyp führen, müssten sich beide Mutanten gleich verhalten.

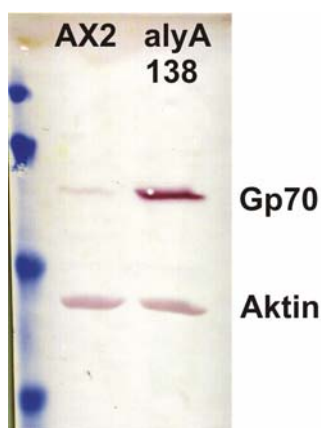


Abb. 4: Western Blot Analyse des *alyA138* Knockout Stammes. Aufgetragen wurden gleiche Proteinmengen des Wildtyps (linke Spur) und der Mutante (rechte Spur). Eine Färbung mit dem Antikörper mAB 130-80-2 (obere Bande) zeigt eine verstärkte Gp70 Expression in der Knockout Mutante. Als Auftragskontrolle dient eine Aktinfärbung (untere Bande)

Zur Herstellung von Gp70 Überexprimierern wurde der Vektor pDEX RH Gp70 durch eine klassische Transformation in den Wildtyp eingebracht und die erhaltenen Klone über Western Blot Analyse mit einem Gp70 Antikörper gescreent. Drei der so erhaltenen Überexprimierer aus zwei unabhängigen Transformationen wurden ausgesucht und analysiert. Abbildung 6A zeigt, dass die Gp70-Expression in den beiden unabhängigen überexprimierenden-Stämmen 11.1

und 6.II ca. zwanzigfach erhöht ist. Im Weiteren werden nur noch die Ergebnisse des Stammes 11.I gezeigt, die anderen untersuchten Gp70 überexprimierenden Mutanten verhielten sich ähnlich.

Im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 5A) nimmt sowohl die Anzahl als auch die Größe der Gp70 markierten Vesikel in den Überexprimierern (Abb. 5B) stark zu (vergleiche hierzu (Yuan and Chia, 2000)). Da die Vesikel in der überexprimierenden Mutante in Zahl, Form und Größe etwa Mitochondrien entsprechen, wurden die Immunfluoreszenzen hier mit dem DNA Farbstoff DAPI gegengefärbt um zu zeigen, dass Gp70 nicht auf Mitochondrien mislokalisiert.

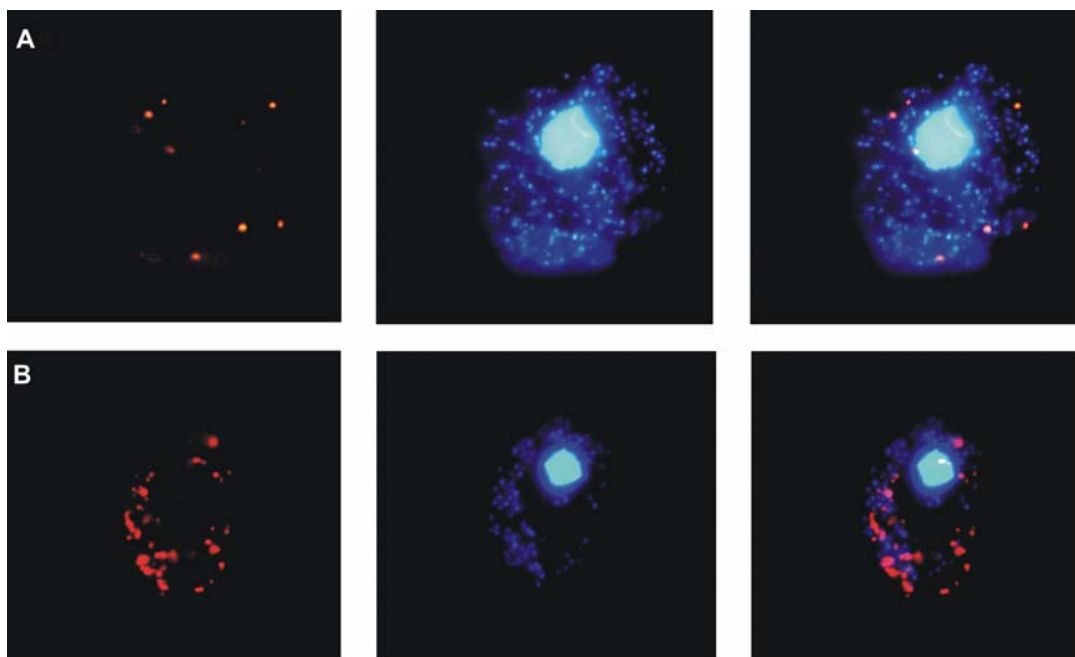


Abb. 5: Immunfluoreszenzen des Gp70 überexprimierenden Stammes. Immunfluoreszenzen mit mAB 130-80-2 (rot) und einer DAPI-Färbung (blau) im A) Wildtyp und B) im Gp70 Überexprimierer. Die Bildbreite entspricht in beiden Fällen ungefähr 27µm.

Wie erwartet, zeigte der Gp70 Überexprimierer eine um ca. 40% erhöhte Phagozytoserate. Im Vergleich zu der alyA138 Knockout-Mutante hingegen, die eine um ca. 60% erhöhte Phagozytoserate aufweist, ist die Phagozytoserate der Gp70 Überexprimierer geringer (Abb. 6B). Beim Wachstum auf Bakterienrasen war bei den Gp70 Überexprimierern nur ein geringer Unterschied zum Wildtyp zu erkennen (ca.15%), während der alyA138 Knockout Stamm deutlich vergrößerte Plaques aufwies (Abb. 6C). Laut Yuan und Chia (2000) sollten jedoch auch die Gp70 Überexprimierer vergrößerte Plaques bilden. Diese Diskrepanz könnte

dadurch zustande kommen, dass der Plaqueassay bei Yuan und Chia (2000) etwas anders durchgeführt wurde. Die Plaques wurden im Vergleich über einen größeren Zeitraum gemessen, wobei der Defekt in den Gp70 Überexprimierern erst nach acht Tagen auftrat, hier aber nur bis zum fünften Tag gemessen wurde. Auch beim Wachstum auf Bakterienrasen ist also ein Unterschied zwischen den beiden Mutanten festzustellen. Es überrascht jedoch, dass bei einer Mutante, die eine so stark ausgeprägte Erhöhung in der Phagozytoserate aufweist, wie es bei den Gp70 Überexprimierern der Fall ist, sich diese nicht auch bei dem Plaquedurchmesser bemerkbar macht.

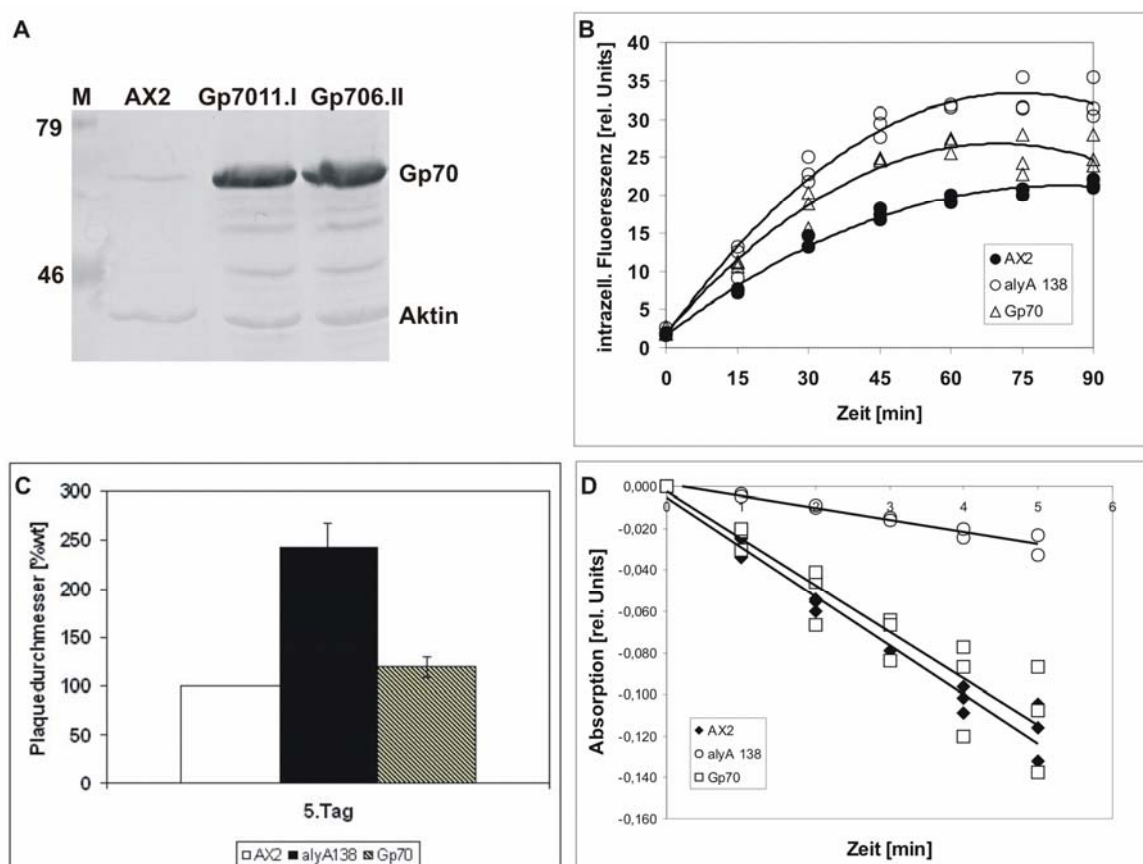


Abb. 6: Die Überexpression von Gp70 führt zu einer verbesserten Phagozytoserate, aber nicht zu vergrößerten Plaquedurchmessern. A) Die Gp70 Expression (obere Bande) ist in den beiden unabhängigen Überexprimierern stark erhöht. Als Auftragskontrolle dient eine Aktinfärbung (untere Bande). Bei den anderen Banden handelt es sich vermutlich um Kreuzreaktionen bzw. Abbauprodukte. Markerangaben in kDa. B) Die Überexpression von Gp70 (offenes Dreieck) führt zu einer erhöhten Phagozytoserate, die Erhöhung fällt jedoch schwächer aus als die der alyA138 Knockout Mutante (offener Kreise). Beide im Vergleich zum Wildtyp (geschlossener Kreis) (n=3). C) Während der alyA138 Knockout größere Plaques auf Bakterienrasen aufweist (schwarzer Balken), zeigt die Gp70 überexprimierende Mutante (schraffierter Balken) wildtypisches Verhalten (schwarzer Balken). Die Plaquedurchmesser des Wildtyps dreier Messungen wurden jeweils hundert Prozent gesetzt und die Plaquegrößen der Mutanten prozentual berechnet und gemittelt. D) Die Lysozymaktivität des Gp70 Überexprimierers (offenes Viereck) ist gegenüber dem Wildtyp (gefüllte Raute) unverändert. Der alyA138 Stamm (offene Kreise) zeigt eine um 60% verminderte Lysozymaktivität (n=3).

Sowohl bei der Phagocytoserate als auch im Fall des Plaquedurchmessers ist ein deutlicher Unterschied zwischen den beiden Mutanten zu erkennen. Auch wenn sie sich tendenziell gleich verhalten, ist der Phänotyp des *alyA138* Knockout-Stammes immer noch stärker ausgeprägt als der der Gp70 überexprimierenden Mutante. So lässt sich vermuten, dass der Phänotyp des *alyA138* Knockout-Stammes nicht allein durch die Überexpression von Gp70 erklärt werden kann. Da AlyA einen Einfluss auf die Expression von Gp70 hat, liegt die Möglichkeit nahe, dass auch Gp70 einen Einfluss auf AlyA ausüben könnte. Die Lysozymaktivität war in dem Gp70 überexprimierendem Stamm jedoch wildtypisch (Abb.6D).

2.2 *Gp70 und alyA lokalisieren nicht in den gleichen Kompartimenten*

Für *Dictyostelium discoideum* ist bekannt, dass drei unterschiedliche Sets an Vesikeln existieren, die lysosomale Enzyme transportieren: 1) Vesikel mit lysosomalen Enzymen mit einer GlcNAc-1-P Modifikationen, 2) solche mit einem Mannose-6-Sulfat Rest und 3) Esterosomen. Da Gp70 und AlyA anscheinend im engen Kontakt miteinander stehen, lag die Überlegung nahe, dass beide Proteine in den gleichen Vesikeln lokalisieren könnten. Für AlyA existierte im Gegensatz zu Gp70 kein Antikörper, deshalb wurde zur Untersuchung der Lokalisation Fusionskonstrukte sowohl mit GFP als auch mit einem myc-Epitop hergestellt. Das myc-Epitop wurde mittig in die AlyA Sequenz kloniert, während das GFP anstelle der Pro-Domäne eingefügt wurde (Abb. 7).

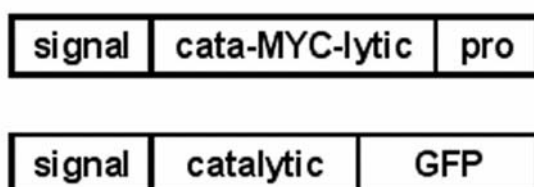


Abb. 7: Schematische Darstellung der GFP- und myc-modifizierten AlyA Fusionsproteine.

N-Terminal befindet sich das Signalpeptid (signal) für das ER. Der katalytischen Domäne (catalytic) folgt eine Pro-Domäne (pro). Das MYC-Epitop bzw. das GFP wurde mittig in der katalytischen Domäne bzw. anstelle der Pro-Domäne eingefügt. (Abbildung aus Müller et al., 2005)

Es wurden zwei unterschiedliche Fusionsproteine benutzt, um die Wahrscheinlichkeit einer richtigen Lokalisation zu erhöhen. Durch die Modifikation

mit GFP bzw. einem myc-Epitop bestand die Möglichkeit, dass eine wichtige Domäne des Proteins überdeckt werden könnte, so dass das Protein nicht mehr funktionell ist und dementsprechend auch falsch lokalisieren könnte. Die Fusionskonstrukte wurden über eine klassische Transformation in die alyA138 Knockout-Zellen eingebracht. Eine Expression im Wildtyp war nicht stabil. Abbildung 9A zeigt mittels Western Blot Analyse die Expression beider Fusionsproteine in den entsprechenden Stämmen.

Beide Fusionsproteine lokalisierten in vielen kleinen Vesikeln innerhalb des Zytoplasmas der Zelle (Abb.8). Mittels einer Kotransformation beider Konstrukte konnte gezeigt werden, dass es sich um die gleichen Vesikel handelt. In diesen Zellen zeigten die meisten GFP markierten Vesikel ebenfalls eine Färbung mit einem myc-Antikörper (Abb. 8A). AlyA-GFP lokalisiert mit keinem anderen bekannten Set von lysosomalen Enzymen (Abb. 8B und 8C). Eine Kolo-kalisation von AlyA-GFP mit Gp70 konnte ebenfalls nicht detektiert werden (Abb. 8D). Gp70 und AlyA scheinen in unterschiedlichen Vesikeln transportiert zu werden, was die Möglichkeit von direkten Wechselwirkungen zwischen den beiden drastisch reduziert. Dass es sich jedoch tatsächlich um Vesikel handelt, die lysosomale Proteine zu einem Endosom transportieren, kann durch Abbildung 8E gezeigt werden. Hier wurden AlyA-GFP exprimierende Zellen mit Latex-Partikeln gefüttert. In einigen Fällen war ein grüner Ring um den internalisierten Partikel zu finden. AlyA-GFP wird also mittels kleiner Vesikel, wie es für lysosomale Proteine üblich ist, in das Phagosom transportiert. Somit markiert AlyA ein neues, viertes Set an Vesikeln in *Dictyostelium discoideum*, die lysosomale Enzyme transportieren.

Der normale Transportweg für lysosomale Enzyme läuft über das ER und den Golgi hin zu Lysosomen. Ein ER-Leader wird für AlyA vorhergesagt. AlyA-GFP exprimierende Zellen, die in Immunfluoreszenzen mit einem GFP Antikörper behandelt wurden, zeigten, dass AlyA-GFP zum Teil in ER ähnliche Struktur zu finden ist (Daten nicht gezeigt). Auch in den AlyA-myc exprimierenden Mutanten ist in einigen Zellen ein Ring um den Kern zu erkennen, bei dem wir vermuten, dass es sich um ER ähnliche Strukturen handelt. Es ist also davon auszugehen, dass AlyA über das ER und den Golgi zu seinem Bestimmungsort transportiert wird.

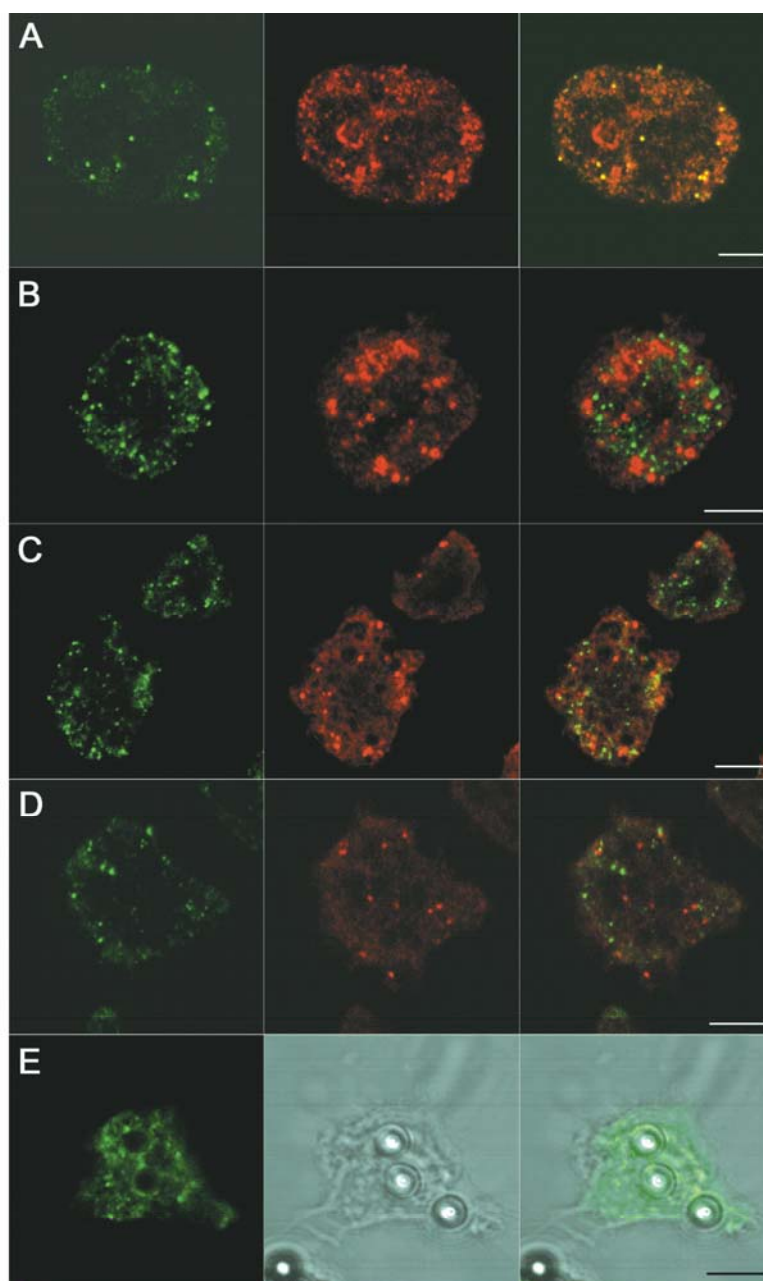


Abb. 8: Lokalisation von GFP- und myc- modifiziertem AlyA. Optische Schnitte von AlyA-GFP exprimierenden Zellen (grün) in Immunfluoreszenzen mit unterschiedlichen Antikörpern (rot). A) Kotretransformanten mit myc-modifiziertem AlyA und mAB 9E10. B) MAB 221-342-5 zur Detektion von lysosomalen Enzymen mit Manose-6-SO₄ Zuckermodifikationen. C) Immunfluoreszenzen mit mAB AD7.5 gegen Proteine mit einer N-Acetyl-Glucosamin-1-P Modifikation. D) MAB 130-80-2 gerichtet gegen Gp70. E) Fixierte Zellen, denen vorher Latex Beads zum Fressen gegeben wurde. Größenbalken=5 µm (Abbildung aus Müller et al, 2005)

2.3 Beide modifizierte AlyA Fusionsproteine sind funktionell

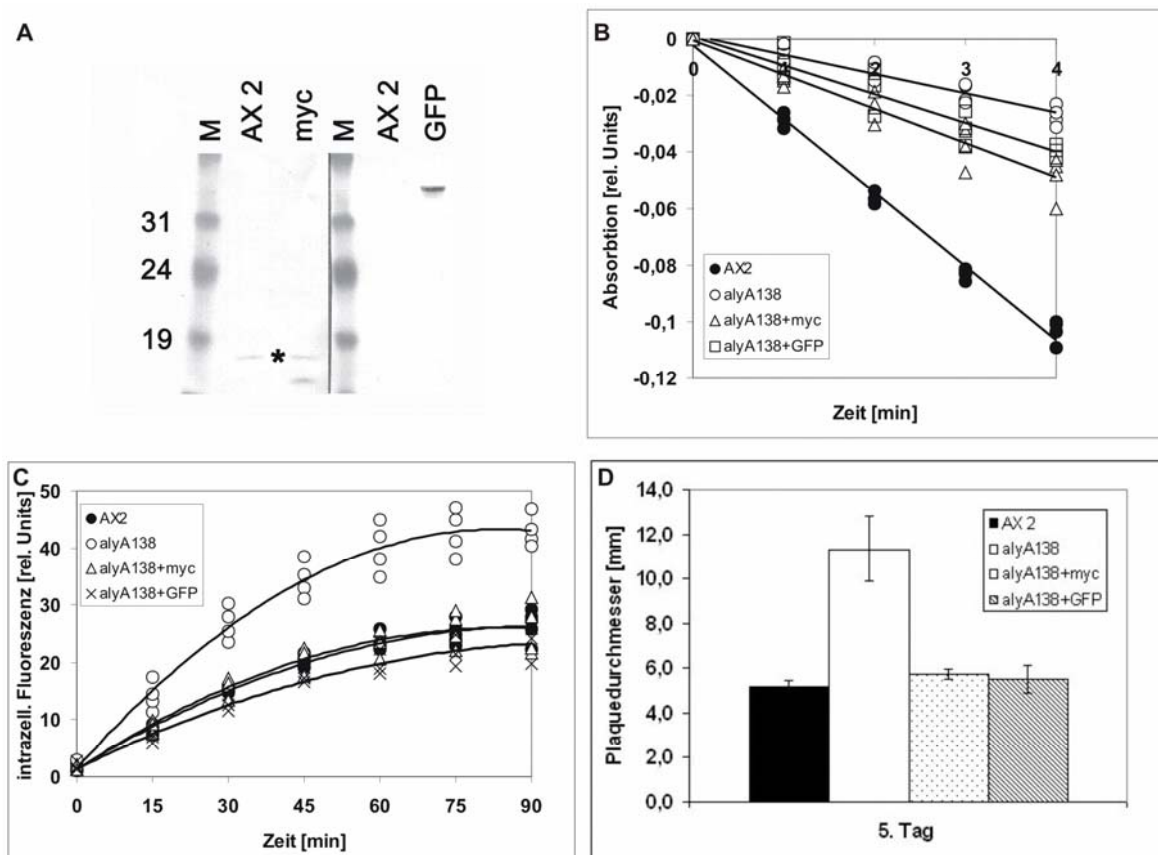


Abb. 9: Myc- und GFP-modifiziertes AlyA kann den Phänotyp der alyA138 Knockout Mutante retten.

A) Die beiden modifizierten Fusionsproteine mit myc- (linker Western- Blot) bzw. GFP- (rechter Western- Blot) werden mit der erwarteten Größe von 15 bzw 40 kDa im Knockout Hintergrund exprimiert. Marker (M) Angaben in kDa. Der Stern markiert eine Kreuzreaktion des myc-Antikörpers.

B) Die Lysozymaktivität der beiden Rescue Mutanten (offenes Dreieck bzw. Viereck) ist gegenüber der alyA138 Knockout Mutante (offener Kreis) erhöht jedoch nicht wildtypisch (geschlossene Raute)(n=3).

C) Die Phagozytoserate der Rescue Mutanten (offenes Dreieck bzw. Kreuz) entspricht der des Wildtyps (gefüllter Kreis), während die alyA138 Knockout Mutante (offener Kreis) eine um ca. 60 % erhöhte Phagozytoserate zeigt (n=3). D) Das Wachstum auf Bakterienrasen ist bei den beiden Rescue Mutanten (schraffierte Balken) wieder gleich dem Wildtyp (schwarzer Balken), während die alyA138 Knockout Mutante (weißer Balken) stark vergrößerte Plaques aufweist (n=3).(Abbildung verändert aus Müller et al., 2005.)

Um sicherzustellen, dass ein modifiziertes Protein funktionell ist, kann es im Knockout Hintergrund exprimiert werden und sollte so in der Lage sein, den Phänotyp der Knockout-Mutanten zu retten (Cox et al., 1996). Um dies zu untersuchen, wurden die gleichen Stämme wie unter 2.2 beschrieben analysiert. Sowohl im Fall von AlyA-GFP als auch AlyA-myc waren beide Proteine in der Lage den Phänotyp der AlyA138 Knockout-Mutante zu retten. Es wurden in beiden Fällen mehrere unabhängige Mutanten untersucht, die sich jedoch alle gleich

verhielten, so dass hier nur noch auf jeweils eine Rescue-Mutante pro Fusionsprotein eingegangen werden soll.

Überraschenderweise führte bereits eine geringfügig erhöhte Lysozymaktivität im Knockout Hintergrund (Abb. 9B) wieder zu einer wildtypischen Phagocytoserate (Abb. 9C). Dies könnte zum einen dadurch erklärt werden, dass die Fusionsproteine eine etwas reduzierte Aktivität als das endogene AlyA aufweisen, zum anderen könnte jedoch auch bereits eine geringere Menge AlyA ausreichend für wildtypisches Verhalten sein. Die Größe der Plaques waren in beiden Stämmen ebenfalls wieder wildtypisch (Abb. 9D) und auch die Gp70-Expression war auf Wildtyp Niveau zurückgesetzt (Daten nicht gezeigt). Ein von außen eingebrachtes endogenes AlyA war ebenfalls in der Lage den Phänotyp der alyA138 Knockout-Mutante zu retten (siehe hierzu Müller et al 2005).

Diese Rescue-Mutanten zeigen nicht nur, dass die beiden Fusionskonstrukte funktionell sind, sondern auch, dass der Phänotyp des alyA138 Knockout-Stammes tatsächlich durch das Fehlen von AlyA bedingt ist.

2.4 Erstellen einer Arbeitshypothese

Nimmt man die bisher beschriebenen Ergebnisse zusammen, so lässt sich die in Abbildung 10 gezeigte Arbeitshypothese daraus zusammenfassen. Eine AlyA defiziente Mutante zeigt eine erhöhte Phagocytoserate sowie eine erhöhte Gp70-Expression. Die Überexpression von Gp70 führt zu einer erhöhten Phagocytoserate. Beide Mutanten lassen darauf schließen, dass eine gemeinsame Signalkaskade von der Degradation von Nahrung in Phagosomen zur Internalisierung von Partikeln bestehen muss. Betrachtet man sich alleine die räumliche Trennung zwischen Degradation in Phagosomen und Ort der Internalisierung oder auch nur allein die räumliche Trennung zwischen AlyA und Gp70, so ist klar, dass weitere Proteine an dieser Signalkaskade beteiligt sind. Die geringfügigen Unterschiede in dem Verhalten beider Mutanten lassen vermuten, dass neben einer Signalkaskade ausgehend von AlyA über Gp70 noch andere Pathways ausgehend von AlyA existieren.

Die weitere Arbeit sollte sich mit der Identifikation und Verifizierung einiger dieser Proteine beschäftigen. Zur Identifikation boten sich unterschiedliche Verfahren und Methoden an. Da Expressionslevel anscheinend eine wichtige Rolle in diesem

Signalweg spielen, entschieden wir uns dafür Microarray-Analysen von beiden Mutanten zu machen.

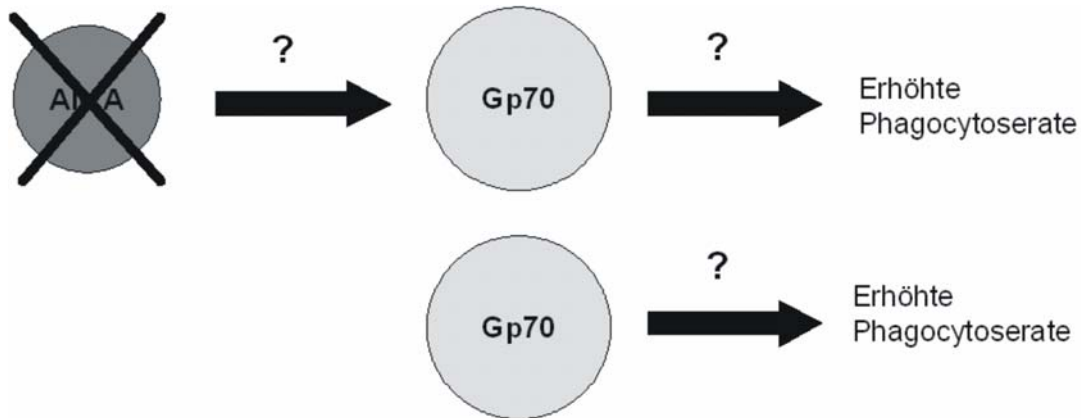


Abb. 10: Arbeitshypothese. Das Ausschalten von AlyA führt zu einer Erhöhung der Phagocytoserate, über eine verstärkte Expression von Gp70. Die Überexpression von Gp70 alleine führt ebenfalls zu einer verstärkten Phagocytoserate. Die Fragezeichen sollen unbekannte Proteine darstellen, die an diesem Pathway beteiligt sind.

2.5 cDNA Microarray-Analysen der *alyA138* Knockout-Mutante und des *Gp70* überexprimierendem Stamm

Microarray-Analysen dienen dazu Expressionsmuster von Tausenden von Genen gleichzeitig zu analysieren. Auf dem hier verwendeten cDNA Microarrays befanden sich 5423 EST Klone des cDNA Projektes in Japan (Urushihara et al., 2004), verschiedene positive und negative Kontrollen sowie Teilsequenzen von 450 ausgewählten Genen. Mit einem Genom von ca. 12500 Genen bei *Dictyostelium discoideum* (Eichinger et al., 2005) wurde somit fast die Hälfte aller *Dictyostelium* Genen untersucht. Alle Proben lagen doppelt gespottet auf den Microarrays vor.

Pro Mutante wurden sechs Slides mit revers-transkribierter cDNA aus mindestens drei RNA Präparationen hybridisiert. Die RNA Präparationen für die Microarrays wurden mit dem RNAeasy Mini Kit von Qiagen durchgeführt. Es wurden unterschiedliche RNA Präparationen benutzt um tagesabhängige Variationen in der Genexpression auszumerzen (Farbrother et al., 2006). Weiterhin wurde darauf

geachtet, dass die Schüttelkulturen, aus denen die RNA präpariert wurde, eine Zelldichte von 3×10^6 Zellen/ml nicht überschritten, damit Expressionunterschiede von entwicklungsabhängig exprimierten Genen minimiert wurden. Jeweils drei Slides wurden mit Cy3 markierter Wildtyp cDNA und Cy5 markierter Mutanten cDNA hybridisiert, bei den anderen 3 Slides wurde die cDNA komplementär markiert hybridisiert. Dies diente dazu den Fehler, bedingt durch den jeweils verwendeten Fluoreszenzmarker (so genannte „dye swaps“), möglichst gering zu halten. Die Analysen wurden während meines Aufenthaltes in Ludwig Eichingers Labor in Köln durchgeführt.

	alyA138 Knockout	Gp70 Überexprimierer
Positiv signifikant reguliert	V4, H5, Discoidin, NDPK und 18 weitere Gene	Gp70 und 4 weitere Gene
Negativ signifikant reguliert	Lysozym (SSF615), tipD, SLB350, SSB389, SSE346, SSJ758, alp, SSL845, VSI401 und 4 weitere Gene	V4, Discoidin, tipD, SLB350, SSB389, SSE346, SSJ758, alp, SSL845, VSI401 und 8 weitere Gene

Tab. 1: Ergebnisse der Microarray-Analyse im Überblick. Die Tabelle zeigt im Überblick die Ergebnisse der Microarray-Analyse für beide Mutanten. Hierbei wurden nur die für am wichtigsten erachteten Gene aufgeführt. Eine genaue Liste findet sich im Anhang unter A1. Für EST Nummern, denen ein bereits bekanntes Protein zugeordnet werden konnten, wurde der Name des Proteins angegeben.

Differentiell exprimierte Gene wurden durch das Program „Significance Analysis of Microarrays“, kurz SAM, identifiziert (Tusher et al., 2001). Als wirklich signifikant wurden jedoch nur die Gene betrachtet, deren Expression um einen Faktor $>1,5$ verschieden waren.

Tabelle 1 zeigt einen groben Überblick der Ergebnisse der Microarray-Analyse. Eine genaue Auflistung findet sich im Anhang unter A1 und A2. Hier wurden die für uns wichtigsten Ergebnisse zusammengefasst. Die Expression von Gp70 wurde in den Gp70 Überexprimierern wie erwartet als ungefähr 18-fach verstärkt gefunden. Im Wildtyp wie auch in den alyA138 Knockout-Mutanten konnte aufgrund der schwachen Expression von Gp70 kein Signal detektiert werden. Für die alyA138 Knockout-Mutanten wurde der EST SSF615 als negativ signifikant angegeben. Bei dem dazugehörigen Gen handelt es sich um alyB. Die Homologie

von 94% zwischen alyB zu alyA führte zu der Annahme, dass es sich hier um eine Kreuzreaktion handelte und somit das Fehlen von alyA an dieser Stelle detektiert wurde.

Interessanterweise wurden in beiden Mutanten acht gleiche Gene als negativ signifikant reguliert gefunden (Tab.1). Diese erschienen uns als gute Kandidaten für eine mögliche Rolle in einer Signalkaskade zwischen AlyA, Gp70 und einer erhöhten Phagozytoserate. Mittels einer Datenbankrecherche in Dicty Base konnten zwei der acht ESTs bekannten Genen zugeordnet werden, diese waren tipD und alp (alkalische Phosphatase). Mutanten beider Gene waren publiziert, allerdings war nicht bekannt, wie sich die Mutanten beider Gene im endocytotischen Transit verhielten. Dies wurde in der Diplomarbeit von Christian Stolle (Stolle, 2005) untersucht und es soll deshalb an dieser Stelle nicht näher darauf eingegangen werden. Bis auf SSL845 konnte den anderen sechs ESTs ebenfalls ein Gen in Dicty Base zugeordnet werden, so dass einfache Aussagen über Domänen oder Homologien gemacht werden konnten. Bei VSI401 handelt es sich um ein ABC Transporter der G3 Klasse sowie SLB350 große Ähnlichkeit zu einem HSP20 Chaperone aufweist. Datenbanksuchen für SSB389 ergaben keine weiteren Erkenntnisse. Für SSJ758 wurden drei SH3 Domänen vorausgesagt und für SSE346 ein Signalpeptid.

Gene, die in der alyA138 Knockout-Mutante als positiv signifikant reguliert erkannt wurden und in den Gp70 Überexprimierer nicht betroffen waren, stellen gute Kandidaten als Signalmoleküle zwischen beiden Proteinen dar bzw. Proteine für parallele Signalkaskaden. Dabei war das interessanteste Protein H5, da es in Gotthardt et al. (2006) als ein Protein beschrieben wurde, welches auf frühen Endosomen zu finden sei. H5 ebenso wie V4 wurden bei Screens entdeckt, bei denen nach Genen gesucht wurde, die mit Beginn des Entwicklungszyklus in *Dictyostelium discoideum* deaktiviert werden (Singleton et al., 1987). Bei V4 ebenso wie Discoidin handelt es sich anscheinend um Gene, die häufig in Microarrays als reguliert auftauchen (persönliche Mitteilung Ludwig Eichinger). Für Discoidin ist bekannt, dass bereits bei geringen Abweichungen in den Wachstumsbedingungen, bei unterschiedlichen Stämmen oder auch nur bei geringen Unterschieden in der Zelldichte, etc. es zu unterschiedlichen Expressionsstärken dieses Proteins kommt (persönliche Mitteilung Wolfgang Nellen).

Ich habe mir für weitere Analysen Sse346, Ssj758 und H5 ausgesucht, da diese für mich die interessantesten Proteine darstellten. Um die Funktion dieser Proteine zu untersuchen, erschien es sinnvoll sowohl Knockout-Mutanten als auch Überexprimierer herzustellen. Ebenso sollten GFP- bzw. myc-modifizierte Fusionsproteine zur Lokalisationsanalyse der Proteine dienen. Sollten diese Proteine wirklich in der gleichen Signalkaskade wie Gp70 und AlyA agieren, so wäre im bestmöglichen Fall zu erwarten, dass sich die entsprechenden Mutanten, also ein H5 Überexprimierer bzw. sse346 und ssj758 Knockout-Mutanten, genauso verhalten wie ein Gp70 Überexprimierer bzw. eine alyA138 Knockout-Mutante.

2.6 Validierung der cDNA Microarrays

Die Expression der ausgesuchten drei Gene sollte in der alyA138 Knockout-Mutante und dem Gp70 überexprimierendem Stamm Northern Blot verifiziert werden.

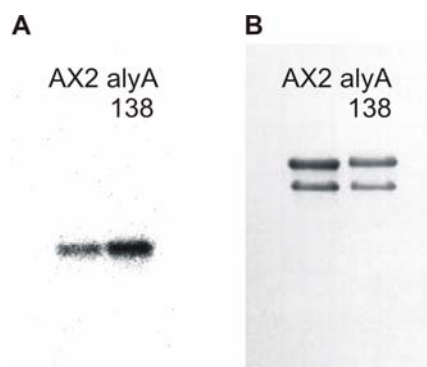


Abb. 11: Verifizierung der Überexpression von H5 in der alyA138 Knockout-Mutante. A) Northern Blot Analyse des Wildtyps (linke Spur) und der alyA 138 Knockout-Mutante (rechte Spur) mit einer H5 spezifischen Sonde. B) Ethidium Bromid Färbung des dazu gehörigen RNA Gels (gleiche Auftragung). (Branimira Borisova-Todorova)

Für H5 konnte mittels Northern Blot-Analyse gezeigt werden (Abb. 11), dass das Gen in den alyA138 Knockout-Zellen ca. doppelt so stark exprimiert wird wie im Wildtyp. Dies ist konsistent mit den Ergebnissen der Microarray-Analyse, wo H5 ebenfalls in dem alyA138 Knockout als zweifach hochreguliert erkannt wurde. Die Expression von H5 war in den Gp70 Überexprimierern nicht beeinträchtigt, deshalb findet sich in Abbildung 11 keine Spur für diese Mutante. Als Kontrolle, dass gleiche Mengen RNA aufgetragen wurde, dient das mit Ethidiumbromid

gefärbte RNA Gel (Abb. 11B). Es lässt vermuten, dass die Menge an H5 eher unter- als überschätzt wurde.

Auch für die beiden anderen Gene wurden mehrfach Northern Blot-Analysen durchgeführt. Es konnte jedoch nie ein Signal detektiert werden. Hierbei wurden unterschiedliche Sonden, die zu unterschiedlichen Bereichen des Gens komplementär waren, unterschiedliche RNA Präparationen, unterschiedliche Protokolle, unterschiedliche Hybridisierungstemperaturen sowie auch RNA-anstatt DNA-Sonden getestet. Eine semiquantitative RT-PCR ergab für beide Gene ebenfalls kein Signal. Ein Northern Blot mit einer Sse346 spezifischen Sonde gab im Falle von einer Überexpression des Gens jedoch Banden (vergleiche Abb. 24), so dass anzunehmen ist, dass die Expression beider Gene normalerweise unterhalb der Sensitivität der Methoden lag.

2.7 H5

Wie bereits erwähnt wurde H5 als ein Protein identifiziert, welches mit Beginn der Entwicklung von *Dictyostelium discoideum* deaktiviert wird (Singleton et al., 1987). Als diese Entdeckung gemacht wurde, war jedoch nichts Weiteres über das Protein bekannt. Neuere Datenbankrecherchen ergaben, dass es sich hierbei um ein Protein handelt, welches eine Lipase/Esterase/Thioesterase-Domäne beinhaltet. Besonders interessant wurde dieses Protein dadurch, dass es in einem proteomischen Screen (Gotthardt et al., 2006) auf frühen Endosomen gefunden wurde. Das Gen mit einer Länge von ca. 1000 bp, genannt cinB, liegt dreimal im Genom von *Dictyostelium discoideum* (DDB0220110, DDB0189182, DDB0187546) auf Chromosom 5 vor. Hierbei sind alle drei Gene zu über 99% identisch. Für eine Knockout-Mutante wurde ein Konstrukt, welches das Gen unterbrochen durch eine geflochte Bs^r -Kassette trägt, kloniert und in Wildtyp Zellen transformiert. Es konnten so zwei unabhängige Einzelknockout-Mutanten identifiziert werden. Aus zeitlichen Gründen war es jedoch nicht möglich Dreifachknockout-Mutanten herzustellen. Die Einzelmutanten zeigten bei einer ersten Analyse einen wildtypischen Phänotyp (Daten nicht gezeigt). Im Weiteren soll auf die Überexprimierer dieses Proteins eingegangen werden, da H5 in den alyA138 Knockout-Mutanten verstärkt exprimiert wurde.

2.7.1 H5 lokalisiert nicht auf Endosomen sondern rein cytoplasmatisch

Für Lokalisationsstudien wurden zwei Fusionsproteine aus GFP und H5 hergestellt. Im ersten Fall wurde H5 in frame hinter GFP kloniert (GFP-H5), beim zweiten wurde GFP an den C-Terminus von H5 fusioniert (H5-GFP). Beide Konstrukte wurden über Elektroporation in Wildtyp Zellen eingebracht und über Western Blot Analyse mittels eines GFP-Antikörper gescreent (Abb. 12).

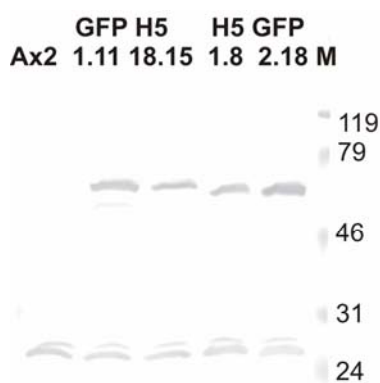


Abb. 12: Western Blot Analyse der GFP-modifizierten H5 Überexprimierer. Die Membran wurde zuerst mit einem monoklonalem GFP-Antikörper inkubiert und entwickelt. Bei den Mutanten sind Banden mit den erwarteten Größen von 66 kDa für GFP-H5 und 64 kDa für H5-GFP zu erkennen. Der Größenunterschied kommt durch einen unterschiedlich großen Spacer zwischen H5 und GFP in beiden Konstrukten zustande. Eine zweite Inkubation mit einem Antikörper gegen mitochondriales Porin dient als Auftragskontrolle (untere Bande). Markergrößen in kDa.

Erste Immunfluoreszenzstudien zeigten, dass beide GFP-Fusionsproteine cytoplasmatisch lokalisieren. Um zu untersuchen, ob H5 auf Endosomen angereichert wird, wurden Zellen für 1h mit Latex-Beads gefüttert und die Zellen dann fixiert. Es konnte jedoch nie eine Lokalisation von GFP-markierten H5 um internalisierte Beads gefunden werden (Abb. 13), so wie das für AlyA gezeigt werden konnte (vergleiche Abb. 8). Entgegen dem Befund in Gotthardt et al. (2006) scheint H5 also nicht auffallend auf Phagosomen zu lokalisieren.

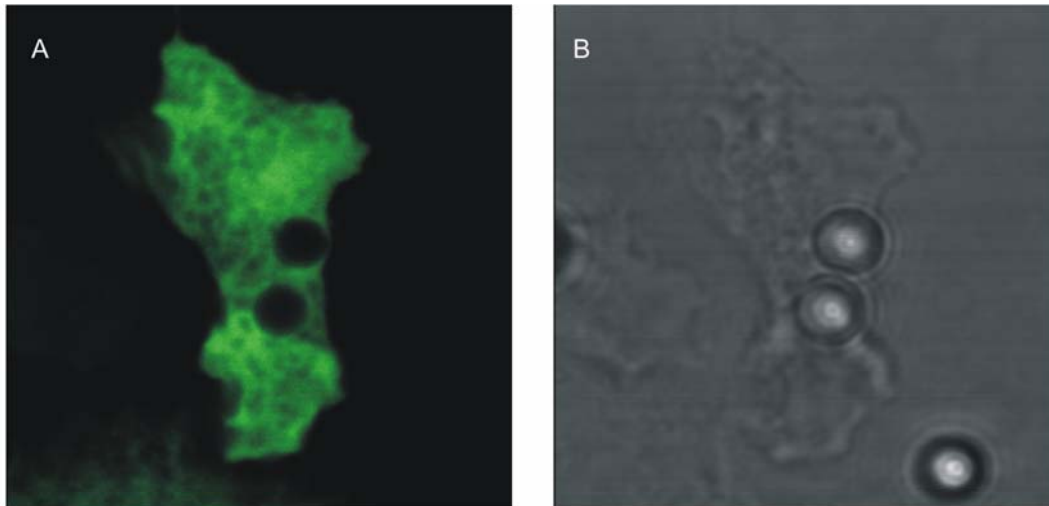


Abb. 13: Lokalisation von GFP-modifizierten H5. Die GFP-modifizierten H5 exprimierenden Zellen wurden mit Latex-Partikeln inkubiert und die Zellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten fixiert. A) zeigt eine H5-GFP exprimierende-Zelle (grün) die 2 Partikel internalisiert hat (schwarze Löcher). B) Zeigt die gleiche Zelle im Durchlicht. Die Latex-Partikel sind hier deutlich zu erkennen. Die Bildbreite beträgt 20µm.

2.7.2 Der Phänotyp der H5 überexprimierenden Stämme

In vielen Fällen dienen Stämme, die GFP-Fusionsproteine des jeweiligen Gens exprimieren, als Überexprimierer. Aus diesem Grund wurde der Phänotyp der GFP-exprimierenden Stämme untersucht (vergleiche 2.7.1). Die Mutanten beider Fusionsproteine verhielten sich jedoch nicht gleich (Abb. 14). So führte die Expression von GFP-H5 zu einer leicht erhöhten Phagozytoserate (Abb. 14A), während die Expression von H5-GFP keine Veränderung im Vergleich zum Wildtyp zur Folge hatte (Abb. 14B). Wachstum auf Bakterienrasen, Gp70-Expression und Lysozymaktivität waren für beide Stämme wildtypisch (Daten nicht gezeigt).

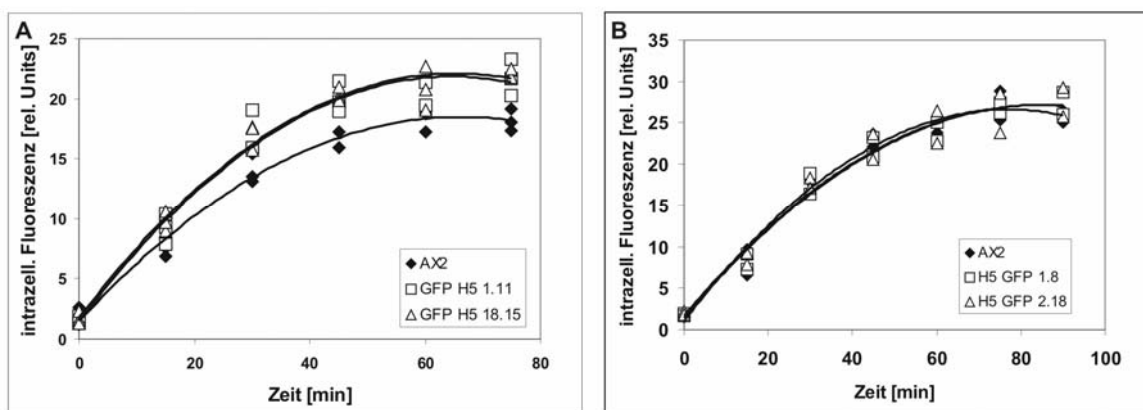


Abb. 14: Die beiden GFP-modifizierten H5 überexprimierenden-Mutanten verhalten sich unterschiedlich in der Phagozytose. Phagozytoseassays von jeweils 2 GFP-modifizierten H5 überexprimierende-Stämme (jeweils offenes Drei- und Viereck) im Vergleich zum Wildtyp (geschlossenen Raute). A) GFP-H5 Überexprimierer zeigen eine erhöhte Phagozytoserate (n=3) während B) die H5-GFP überexprimierenden-Mutanten keine Veränderung in der Phagozytoserate gegenüber dem Wildtyp zeigen (n=2).

Wie bereits erwähnt, kann die Fusion von GFP an ein Gen die Funktionalität des Proteins zerstören. Dies schien bei einem der beiden GFP-modifizierten H5 Fusionsproteine zuzutreffen. Knockout Stämme des H5 Gens waren nicht vorhanden, somit konnte nicht durch einen Rettungsversuch die Funktionalität eines der beiden Fusionskonstrukte bewiesen werden. Aus diesem Grund wurden neue überexprimierende-Mutanten erzeugt, indem das wildtypische H5 im Vektor pDEX RH über Elektroporation in die Zellen transformiert und die Überexpression des unmarkierten Konstrukts mittels Northern Blot Technik nachgewiesen wurde (Abb.15). Abbildung 15A zeigt, dass die Stämme 5.3, 5.4, 5.24 und 12.4 deutlich stärker H5 exprimieren als der Wildtyp.

Im Weiteren sollen die Ergebnisse der Klone 5.3 und 12.4 vorgestellt werden. Beide stammen aus zwei unabhängigen Transformationen und weisen eine unterschiedlich starke Überexpression von H5 auf.

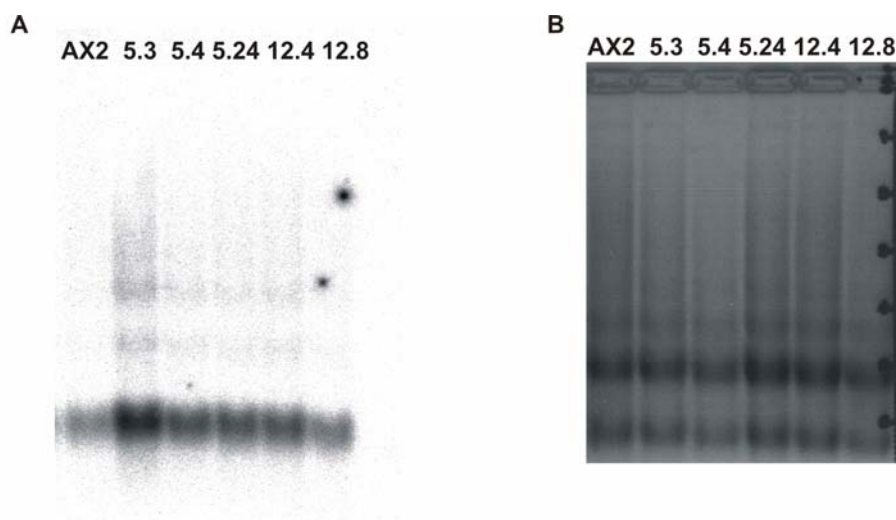


Abb. 15: Northern Blot Analyse der unmodifizierten H5 Überexprimierer. A) Northern Blot mit einer H5 spezifischen Sonde. Die Klone 5.3, 5.4, 5.24 und 12.4 zeigen eine deutlich stärkere Bande als der Wildtyp. Der Klon 12.8 zeigt eher wildtypische Expression. B) Ethidium Bromid Färbung des dazu gehörigen RNA Gels. Dieses dient als Kontrolle, dass ungefähr gleiche Mengen an RNA aufgetragen wurden.

Beide Stämme zeigten in jeglicher Beziehung ein wildtypisches Verhalten. Weder in der Phagozytoserate noch beim Wachstum auf Bakterienrasen noch in der Lysozymaktivität oder auch in der Gp70-Expression konnte ein Defekt festgestellt werden (Abb. 16). Auch war weder das Wachstumsverhalten noch der Entwicklungszyklus in diesen Überexprimierern verändert.

Da keine phänotypische Ähnlichkeit zu der alyA138 Knockout-Mutanten oder dem Gp70 Überexprimierern gefunden wurde, kann das H5 Genprodukt keine Komponente des zu untersuchenden Signaltransduktionsweges sein. Seine zelluläre Funktion bleibt unbekannt.

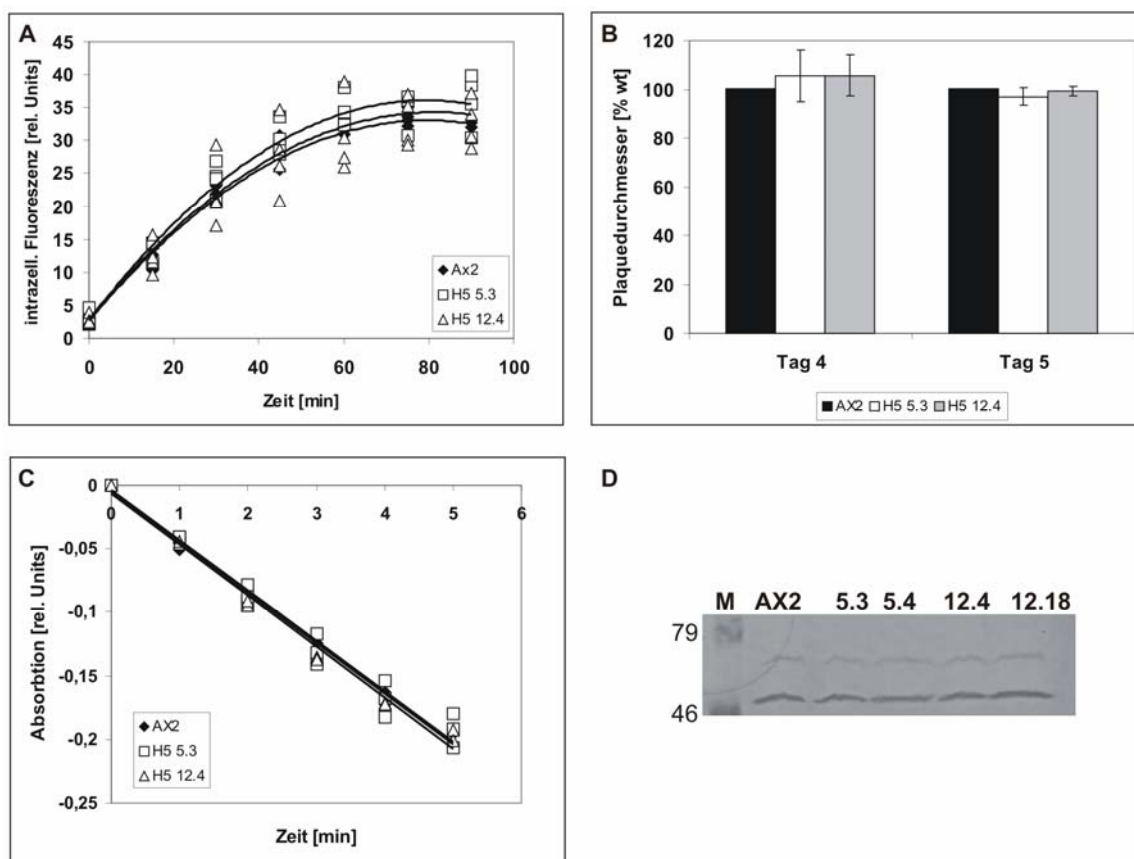


Abb.16: Phänotyp der unmodifizierten H5 Überexprimierer. A) Die H5 Überexprimierer (offenes Drei- bzw. Viereck) zeigen keine Veränderung in der Phagozytoserate gegenüber dem Wildtyp (geschlossene Raute) (n=4). B) Das Wachstum auf Bakterienrasen ist durch die Überexpression von H5 (weißer und grauer Balken) nicht beeinflusst (n=2). C) Die Lysozymaktivität der H5 überexprimierenden Mutanten (offenes Drei- bzw. Viereck) ist gleich der des Wildtyps (geschlossene Raute) (n=3). D) Western Blot-Analyse der Gp70 - Expression in den H5-überexprimierenden Stämme. Die obere Bande entspricht Gp70, welches sowohl im Wt als auch in den Mutanten in gleichen Mengen vorhanden ist. Die untere Bande markiert Coronin und soll zeigen, dass in allen Spuren gleich viel Protein aufgetragen wurde. Markergrößen in kDa.

2.8 Sse346

Bei *sse346* (DDB0167826) handelt es sich um eines der 8 Gene die, laut Microarray-Analysen, sowohl in der *alyA138* Knockout-Mutante als auch in dem Gp70-überexprimierenden Stamm, vermindert exprimiert wurden. Das Gen liegt im Genom von *Dictyostelium discoideum* einmal auf Chromosom 2 vor und hat keine Introns. Mit einer Länge von ca.1500 bp bzw. 523 Aminosäuren sollte das Protein ca. 60 kDa groß sein. Für *Sse346* wurde laut Dicty Base ein Signalpeptid vorausgesagt. Vergleiche mit anderen Datenbanken bestätigten dies. Zudem wurden in dem Programm TMpred zusätzlich zum Signalpeptid, welches hier als Transmembrandomäne erkannt wurde, zwei weitere Transmembrandomänen

vorhergesagt. Diese sollten zwischen den Aminosäuren 161-179 und 340-359 liegen. Das Signalpeptid sollte die Aminosäuren 1-21 ausmachen, mit einer möglichen Schnittstelle zwischen Aminosäure 21 und 22. Weitere konservierte Domänen wurden nicht gefunden. Auch eine Homologiesuche ergab keine weiteren Informationen.

2.8.1 Sse346 lokalisiert auf dem Endoplasmatischen Retikulum, jedoch nicht ausschließlich

Für die Funktion eines Proteins ist es wichtig die Lokalisation in der Zelle zu kennen. Sollte ein Signalpeptid in Sse346 wirklich existent sein, würde dieses Protein zum Endoplasmatischen Retikulum (ER) gebracht werden. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass dies nicht die eigentliche Lokalisation ist, sondern dass das Protein vom ER über den Golgi an einen anderen Ort in der Zelle gebracht wird, wie das zum Beispiel für lysosomale Enzyme der Fall ist. Für Lokalisationsuntersuchungen wurden GFP- und myc-markierte Fusionskonstrukte hergestellt (Abb. 17A) und über Elektroporation in *Dictyostelium discoideum* Zellen eingebracht.

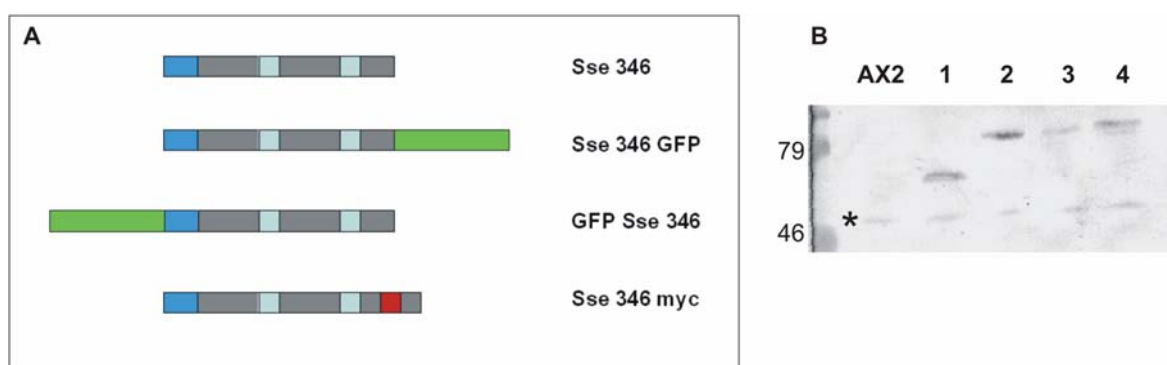


Abb. 17: GFP- und myc-modifizierte Sse346 Fusionsproteine. A) Schematische Darstellung der Fusionskonstrukte. Grau stellt das Protein an sich dar, in blau das Signalpeptid, hellblau sind die Transmembrandomänen. Der grüne Balken soll GFP darstellen und in rot das myc-Epitop. B) Western Blot Analyse der einzelnen Stämme. In Spur 1 wurde ein Proteinextrakt von 1×10^6 Zellen der Sse346-myc Mutante aufgetragen, bei Spuren 2+3 Proteinextrakt aus 2 unterschiedliche Mutanten von Sse346-GFP und in Spur 4 aus GFP-Sse346. Der Blot wurde mit monoklonalem myc- und GFP-Antikörper inkubiert. Der Stern markiert eine Bande, die durch eine Kreuzreaktion zustande kam. Markergrößen in kDa.

Zuerst wurde ein Fusionskonstrukt von sse346 mit GFP, welches in frame an den C-Terminus von sse346 kloniert wurde (Sse346-GFP) (Abb. 17A), hergestellt und dieses mittels Elektroporation in den Wildtyp eingebracht. Die erhaltenen Klone wurden über Western Blot Analyse gescreent und Zelllinien ausgewählt, die das erwünschte Fusionsprotein mit einer Größe von 84 kDa enthielten (Abb. 17B). Die so erhaltenen Stämme zeigten in Immunfluoreszenzstudien jedoch keine GFP-Fluoreszenz. Der Transport von Proteinen, die von der Zelle sezerniert werden, läuft ebenfalls über das ER und die Sortierung erfolgt am TGN. Da in Western Blot Analysen jedoch eine Bande zu erkennen ist, ist nicht davon auszugehen, dass das Protein sezerniert wird. Vermutlich wird die Struktur des GFP durch die Fusion an den C-Terminus von Sse346 durch Wechselwirkungen beider Proteine miteinander beeinträchtigt und somit ist das GFP nicht mehr funktionell. Immunfluoreszenzstudien mit unterschiedlichen Antikörpern gegen GFP ergaben keine weiteren Erkenntnisse, da die Antikörper eine starke Hintergrundfärbung über die gesamte Zelle zeigten.

Um nähere Erkenntnisse über die Lokalisation zu erhalten wurde ein zweites Fusionsprotein, in dem GFP unter Beibehaltung des Leserasters an den N-Terminus von Sse346 fusioniert (GFP-Sse346), hergestellt (Abb. 17A). Durch diese Fusion wird allerdings der vorhergesagte ER-Leader überdeckt und es war nicht klar, wie sich das Fusionsprotein verhalten würde. Die Transformation dieses Fusionskonstruktes in Wildtyp Zellen ergab ebenfalls Stämme, die das Protein mit der richtigen Größe von 86 kDa exprimierten (Abb. 17B). Beide GFP Fusionsproteine unterscheiden sich etwas in ihrer Größe aufgrund der unterschiedlichen Länge des Linkers zwischen GFP und Sse346 und der Prozessierung des ER-Signalpeptides. Immunfluoreszenzstudien dieser Stämme mit einem Antikörper gegen die Protein Disulfid Isomerase (PDI), einem Protein welches im ER lokalisiert (Monnat et al., 1997), zeigten eine deutliche Kolokalisation mit GFP-Sse346 (Abb. 18A). Es bleibt allerdings unklar, ob diese ER Lokalisation der endgültige Bestimmungsort des Proteins ist oder ob aufgrund des überdeckten ER-Leaders dieses Protein im ER sozusagen „stecken bleibt“. Bei diesem Fusionsprotein wird das Signalpeptid wahrscheinlich nicht wie in seiner eigentlichen Bestimmung nach Translation in das ER abgeschnitten, sondern wird als Transmembrandomäne verwendet. Weiterhin ist davon auszugehen, dass C- und N-Terminus dieses Fusionsproteins sich jeweils auf der

falschen Seite der ER-Membran befinden. Höchstwahrscheinlich ist dieses Protein nicht mehr funktionell, gibt jedoch erste Auskünfte darüber, dass Sse346 zum ER transportiert wird.

Um zu untersuchen ob das ER das eigentliche Zielkompartiment von Sse346 ist, wurde ein drittes Fusionsprotein hergestellt. Hierbei wurde das myc-Epitop, gegen welches sowohl ein monoklonaler Antikörper aus Maus aber auch ein polyklonaler Antikörper aus Kaninchen (Firma Delta Biolabs) vorhanden waren, in eine EcoRI Schnittstelle relativ weit am 3' Ende des Gens einkloniert. Diese Schnittstelle liegt hinter der zweiten putativen Transmembrandomäne, so dass das Einbringen des myc-Epitops an dieser Stelle keine Auswirkungen auf die Insertion des Proteins in die Membran haben sollte (Abb. 17A). Auch hier konnten Stämme erzeugt werden, die das gewünschte Konstrukt mit einer Größe von 61 kDa exprimieren (Abb. 17B). Dieses Fusionsprotein lokalisiert ebenfalls im ER, zeigt aber überdies einzelne kleine rote Punkte, die nicht mit dem ER-Marker kolokalisieren (Abb. 18B). Diese waren bei GFP-Sse346 nicht zu erkennen. Das ER scheint also nicht das endgültige Ziel von Sse346 in den Zellen zu sein.

Aufgrund der Zahl und Größe dieser Vesikel und des Kontextes lag die Vermutung nahe, dass es sich um Vesikel handelt, die lysosomale Enzyme, und hierbei insbesondere AlyA oder Gp70, transportieren. Immunfluoreszenzstudien zeigten, dass diese Vesikel weder mit den Antikörper Common Antigen 1 noch AD7.5, welche gegen lysosomale Enzyme gerichtet sind, angefärbt werden konnten (Daten nicht gezeigt). Auch konnte keine Kolokalisation dieser Strukturen mit Gp70 detektiert werden (Abb. 18C). Um eine Kolokalisation mit AlyA zu überprüfen, wurden Kotransformationen von AlyA-GFP und Sse346-myc durchgeführt. Innerhalb von ca. 80 untersuchten Klonen konnte keiner identifiziert werden, der beide Proteine produzierte. So kann über eine Kolokalisation mit AlyA keine Aussage getroffen werden.

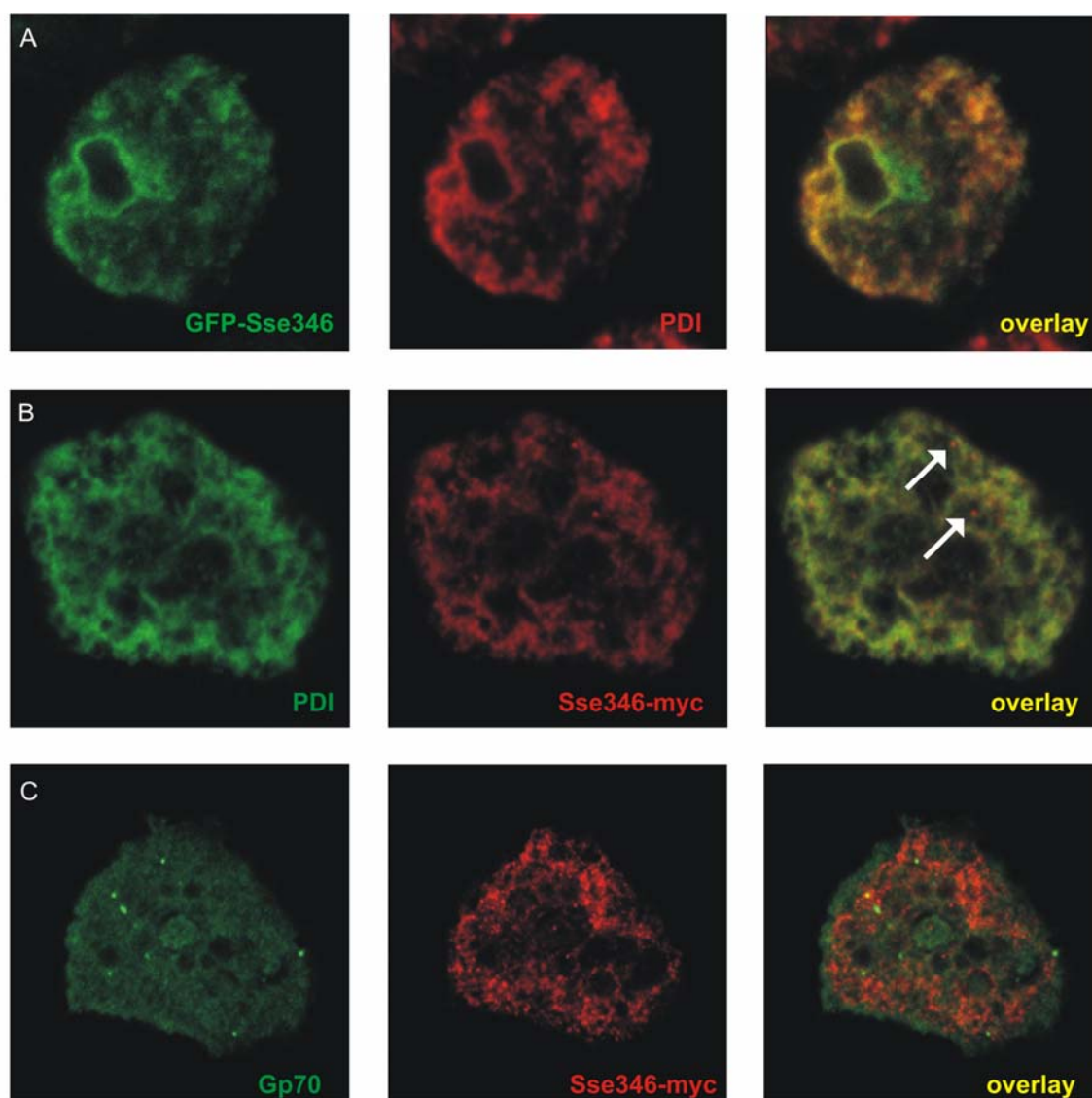


Abb. 18: Lokalisationstudien verschiedener Fusionsproteine von Sse346. A) Immunfluoreszenzstudien von GFP-Sse346 (grün) mit mAB 221-135-1 (rot). Der Overlay zeigt eine deutliche Übereinstimmung zwischen ER und GFP-Sse346. (Bildbreite 14µm) B) Immunfluoreszenzen von Sse346-myc (rot) (es wurde der polyklonale myc Antikörper der Firma Delta Biolabs verwendet) und mAB 221-135-1 (grün): Die Pfeile zeigen auf Sse346-Strukturen, die nicht auf dem ER liegen. (Bildbreite 17 µm) C) Gp70 Färbung (grün) in Sse346-myc (rot) exprimierenden Zellen. Es ist keine Kolokalisation zu sehen (Bildbreite 32µm).

2.8.2 Interaktionsstudien von Sse346 mittels Massenspektrometrie

Da mit den gegebenen Mitteln (siehe oben) nicht geklärt werden konnte, welche Vesikel von Sse346-myc markiert werden, insbesondere ob Sse346-myc in den gleichen Vesikeln wie AlyA lokalisiert, wurden Immunpräzipitationen von Zellen, die dieses Fusionsprotein exprimieren, durchgeführt. Das so erhaltene Proteingemisch wurde mittels SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt (Daten nicht

gezeigt) und die Banden über Massenspektrometrie analysiert. Hierbei könnte die Identifikation von Interaktionspartnern möglicherweise Aufschluss darüber geben, um welche Art von Vesikeln es sich handelt.

Bande (Größe)	Dicty Base	Gen Name
Bande I (~70 kDa)	DDB0233951 *	Atp5B ATP Synthase Beta Chain, mitochondrial
	DDB0191163 *	hspD Hitzeschockprotein
	DDB0167826	Sse346
Bande II (~55 kDa)	DDB0231504	Aldehyd Dehydrogenase
	Immunglobulin schwere Kette	
Bande III (~50kDa)	DDB020439 *	Serin- hydroxymethyltransferase
	DDB0231355	enoA, Enolase, Phosphopyruvat- hydratase enolase
Bande IV (~30kDa)	DDB0231242	Rpl5 60S ribosomales Protein
	Immunglobulin leichte Kette	
Bande V (~25 kDa)	DDB0190881	Discoidin I C und B Kette

Tab 2: Ergebnisse der Immunpräzipitation von Sse346-myc nach Massenspektroskopie. Neben der leichten und schweren Kette des Antikörpers sind in der Tabelle alle Proteine mit ihren Dicty Base Nummern aufgeführt, die nach Immunpräzipitation mittels Massenspektrometrie als Interaktionspartner von Sse346-myc identifiziert werden konnten. Für die DDBs mit Sternchen konnte laut (Gotthardt et al., 2006) eine Lokalisation auf Phagosomen gefunden werden.

Mittels des monoklonalen Antikörpers mAB 9E10 konnte Sse346-myc sowie einige andere Proteine präzipitiert werden (Tab.2). Die mitochondriale ATPase kann als Interaktionspartner ausgeschlossen werden, da Sse346 nicht in Mitochondrien lokalisiert (Abb. 18). Eine Interaktion mit ribosomale Proteinen wäre möglich, da

sich diese während der Translation auf Sse346-myc befinden könnten. Das Auffinden von Discoidin stellt vermutlich ein Artefakt dar, da es häufig in Immunpräzipitationen als Interaktionspartner gefunden wird und wahrscheinlich Affinität zu den verwendeten Protein-A-Sepharose-Beads besitzt (persönliche Mitteilung Oliver Bertinetti). Weiterhin konnten drei Proteine als Interaktionspartner von Sse346-myc identifiziert werden, die laut Gotthardt et al. (2006) auf Phagosomen lokalisieren. Dies lässt vermuten, dass Sse346 über Vesikel zum Phagosomen transportiert wird. Für die anderen Proteine in Tabelle 2 ist keine Lokalisation in der Zelle bekannt. Somit konnten auch über Immunpräzipitation der Typ der Vesikel, die mit Sse346-myc angefärbt werden, nicht identifiziert werden.

2.8.3 Bei Sse346 handelt es sich um ein integrales Transmembranprotein

Neben einem Signalpeptid wurden für Sse346 zwei weitere Transmembrandomänen vorausgesagt. Um zu überprüfen, ob diese auch wirklich vorhanden sind, wurden eine Membranassoziationen (Becker et al., 1999) durchgeführt. Für diese Untersuchung wurde der Stamm Sse346-myc verwendet.

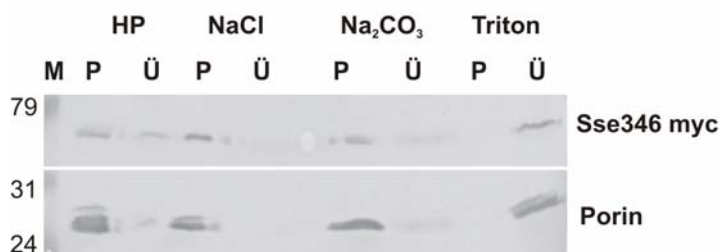


Abb. 19: Membranassoziation des Sse346-myc exprimierenden Stamms. Membranassoziation von Sse346-myc (obere Bande) und mitochondrialem Porin (untere Bande). Zelllysate wurden mit Homogenisationspuffe (HP) bzw. in HP mit 1M NaCl, 100 mM Na₂CO₃ oder 1% Triton X100 inkubiert und bei 100000g in Pellet (P) oder Überstand (Ü) fraktioniert. Markergrößen in kDa.

In Abbildung 19 ist zu erkennen, dass sich Sse346-myc in der Membranassoziation genauso verhält wie mitochondriales Porin, welches als ein integrales Transmembranprotein bekannt ist (Troll et al., 1992). Beide Proteine sind in trotz steigender Salzkonzentrationen oder alkalischem pH Wert zum Großteil im Pellet zu finden. Erst bei einer Inkubation mit Triton X100, bei der die Membranen vollständig zerstört werden, werden beide Proteine löslich und sind dann im Überstand zu finden.

2.8.4 Die Knockout-Mutanten von Sse346 zeigen einen Phänotyp ähnlich dem der alyA138 Knockout-Mutante und der Gp70 überexprimierenden Stämme

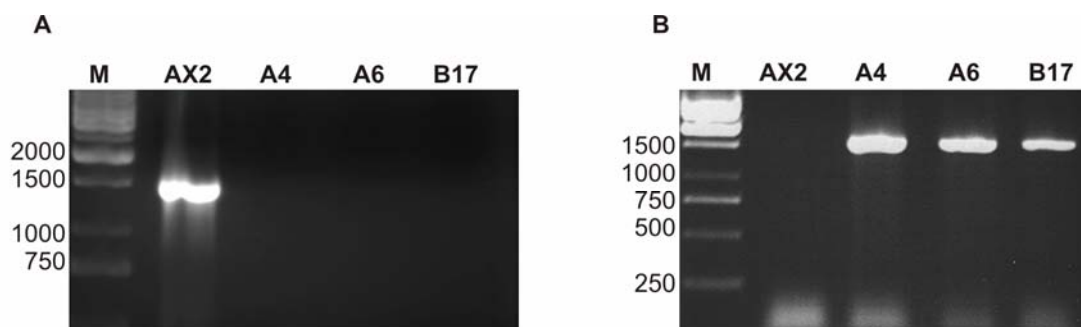


Abb. 20: Nachweis der sse346 Knockout-Mutanten mittels PCR. A) Mit dem Primerpaar #114 und #153 konnte im Wildtyp das endogene sse346 Gen mit einer Größe von 1,5 Kb amplifiziert werden. In beiden Knockout-Mutanten ist keine Bande zu erkennen, da bei den gewählten Bedingungen nicht über die Bs^I Kassette hinweg amplifiziert werden konnte. B) Um zu zeigen, dass das eingebrachte Konstrukt an der richtigen Stelle ins Genom inseriert war, wurde eine zweite PCR mit dem Primer bsr-G1 (#57) und einem 3' Primer (#153) durchgeführt, der 3' unterhalb des sse346 Gens und außerhalb des eingebrachten Konstruktes band. Mit dieser Primerkombination war im Wildtyp nichts zu amplifizieren und bei den Knockout-Mutanten konnte eine Bande mit der erwarteten Größe von 1,6 kb amplifiziert werden. Markergrößen in bp.

Um zu überprüfen, ob die erniedrigte Expression von Sse346 in den beiden Ausgangsmutanten für deren Phänotyp verantwortlich sein könnte, wurden Knockout-Mutanten von sse346 hergestellt. Hierzu wurde linearisierte DNA, bestehend aus dem Gen für sse346, unterbrochen durch eine gefloxtete Blasticidin-Resistenz Kassette, über Elektroporation in Wildtyp Zellen eingebracht. Das Leseraster der eingebrachte Bs^I Kassette ist dem Leseraster des Gens entgegengesetzt. Durch homologe Rekombination sollte bei richtigen Klonen das endogene sse346 Gen durch das modifizierte Gen ersetzt werden. Die erhaltenen Klone wurden über PCR auf ihre Richtigkeit überprüft. Die Effizienz richtiger Knockout-Mutanten lag bei ca. 90%. Es wurde mit den richtigen Klonen A6 und B17 (Abb. 20) weitergearbeitet.

Da sowohl die alyA138 Knockout-Mutante als auch der Gp70 überexprimierenden-Stamm eine verringert Expression von Sse346 zeigten, sollte dieses Protein hinter AlyA und Gp70 in der vermuteten Signalkaskade liegen und Knockout-Mutanten sollten im Idealfall eine erhöhte Phagozytoserate sowie verbessertes Wachstum

auf Bakterienrasen zeigen. Andererseits war nicht davon auszugehen, dass sich die Gp70-Expression oder die Lysozymaktivität in den Knockout-Mutanten verändert. Dies traf für die Gp70-Expression auch zu. In Western Blot Analysen zeigten *sse346* Knockout-Mutanten nie einen veränderten Gp70 Gehalt im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 21A). Überraschenderweise ist die Lysozymaktivität hingegen im Mittel bei den *Sse346* Null-Stämmen um ca. 35 % höher als beim Wildtyp (Abb. 21B).

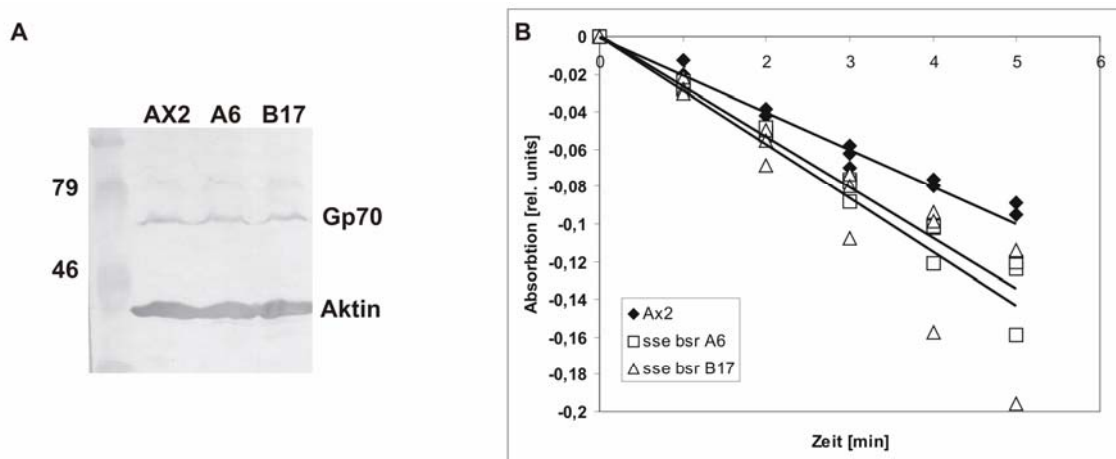


Abb. 21: Das Fehlen von *Sse346* hat keinen Einfluß auf die Gp70-Expression, führt allerdings zu einer erhöhten Lysozymaktivität. A) Western Blot Analyse der *sse346* Knockout-Mutante A6 und B17 mit Gp70-Antikörper (obere Bande) und einem Aktin-Antikörper (untere Bande) als Auftragskontrolle. Gp70 wird in beiden Mutanten gleich dem Wildtyp exprimiert. Markergrößen in kDa B) Beide Knockout-Mutanten (offenes Drei- bzw. Viereck) zeigen eine erhöhte Lysozymaktivität im Vergleich zum Wildtyp (gefüllte Raute) (n=3).

Ansonsten verhielten sich die *sse346*⁻ Stämme wie erwartet. Die Phagozytoserate war zwar nicht so stark erhöht wie bei den beiden Ausgangsmutanten (*alyA138* Knockout-Mutante um 60% und der Gp70 überexprimierende Stamm um 40 %), trotzdem war eine Steigerung um ca. 20% auszumachen (Abb. 22A). Dies spiegelte sich auch im Wachstum auf Bakterienrasen wieder. Hier zeigten beide Mutanten Plaquedurchmesser, die um ca. 17% im Vergleich zum Wildtyp vergrößert waren (Abb. 22B). Man kann also sagen, dass das Fehlen von *Sse346* zu einem tendenziell ähnlichen Phänotyp führt, wie der der Ausgangsmutanten und damit *Sse346* ein guter Kandidat für ein mögliches Mitglied der vermuteten Signalkaskade darstellt.

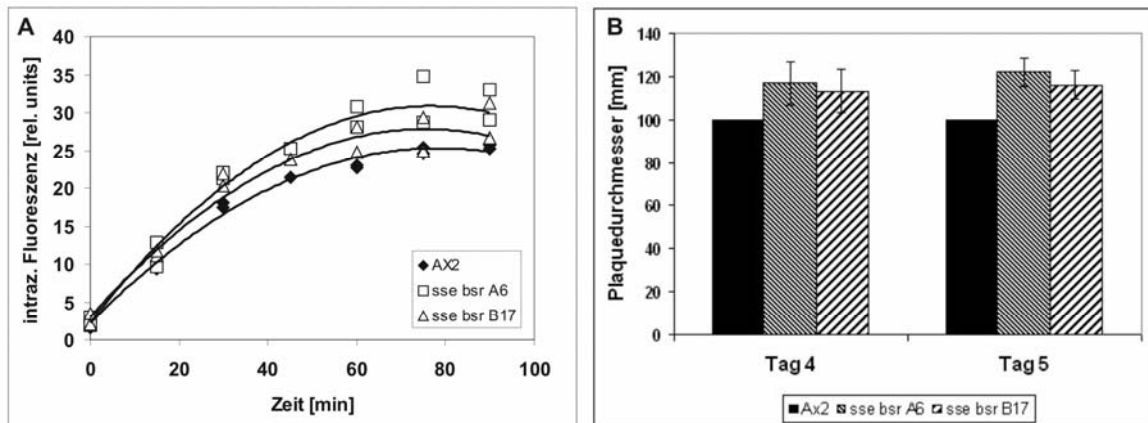


Abb. 22: Das Fehlen von Sse346 führt zu einer erhöhten Phagozytoserate und zu vergrößerten Plaques
 A) Die Phagozytoseraten zweier unabhängiger sse346 Knockout-Stämme (offenes Drei- und Viereck) sind gegenüber dem Wildtyp (gefüllte Raute) leicht erhöht (n = 3). B) Die gleichen Mutanten (gemusterte Balken) zeigen beim Wachstum auf Bakterienrasen einen prozentual vergrößerten Plaquesdurchmesser (n = 4). Der Wildtyp (schwarzer Balken) wurde für jedes Experiment gleich 100 % gesetzt.

2.8.5 Die Überexpression von Sse346 führt zu keiner Veränderung im Phänotyp

Da für Lokalisationsstudien von Sse346 bereits modifizierte überexprimierende Stämme hergestellt worden waren und der Phänotyp von Überexprimierern weiteren Aufschluss über die Funktion des Proteins geben könnte, wurden diese Mutanten ebenfalls untersucht. Unabhängige Mutanten der unterschiedlich markierten Fusionskonstrukte verhielten sich untereinander alle gleich, deshalb sollen hier nur die Ergebnisse jeweils einer Mutante gezeigt werden. Neben Sse346-myc und der Sse346-GFP Mutante, die das GFP-Fusionskonstrukt zwar exprimiert, welches aber nicht grün fluoresziert, wurden auch die GFP-Sse346 exprimierenden Stämme untersucht, auch wenn schon vorab zu vermuten war, dass das Fusionsprotein wahrscheinlich nicht funktionell ist.

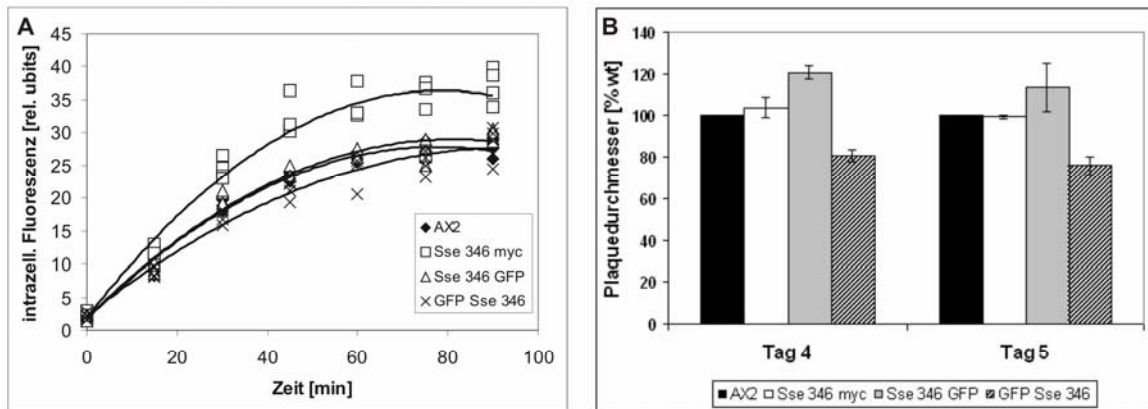


Abb. 23: Der Phänotyp der modifizierten Sse346 überexprimierenden Stämme. A) Beide GFP markierten Überexprimierer (offenes Dreieck und Kreuz) phagozytieren wildtypisch (gefüllte Raute). Zellen die Sse346-myc exprimieren (offenes Viereck) hingegen zeigen eine erhöhte Phagozytoserate (n=3-4). B) Während die Sse346-myc Mutante (weißer Balken) keine Veränderung in der Plaquesgröße aufwies, zeigte der GFP- Sse346 exprimierende-Stamm (grauer Balken) vergrößerte Plaques. Die Sse346-GFP exprimierenden-Mutante (schraffierter Balken) hingegen wiesen deutlich kleinere Plaques gegenüber dem Wildtyp (schwarzer Balken) auf (n=2-3).

Die einzelnen Mutanten verhielten sich alle unterschiedlich. Beide GFP-markierten Sse346 Überexprimierer zeigten gegenüber dem Wildtyp eine unveränderte Phagozytoserate, während der myc-modifizierte eine deutlich höhere Phagozytoserate aufwies (Abb. 23A). Bei den Plaques hingegen war es genau umgedreht. Hier zeigte der Sse346-myc Überexprimierer keine Veränderung gegenüber dem Wildtyp, jedoch die beiden Anderen. So zeigten die Sse346-GFP Stämme deutlich größere Plaques und die GFP-Sse346 überexprimierenden Mutanten deutlich kleinere Plaques (Abb. 23B). Wie bereits erwähnt, ist davon auszugehen, dass die zuletzt erwähnten Mutanten kein funktionelles Sse346 exprimieren, so dass der erhaltene Phänotyp wohl eher ein „Zufallsprodukt“ darstellt. Aber auch beide anderen potentiellen Überexprimierer verhielten sich unterschiedlich, wobei bei diesen nicht offensichtlich einer von beiden als falsch auszuschließen war. Um eine Idee davon zu bekommen, welches nun der Richtige ist, wurden neue unmodifizierte Überexprimierer hergestellt. Hierzu wurde das sse346 Gen in den pDEX RH Vektor kloniert und in Wildtypzellen über Elektroporation eingebracht. Der Nachweis einer Überexpression von Sse346 erfolgte über Northern Blot Analyse.

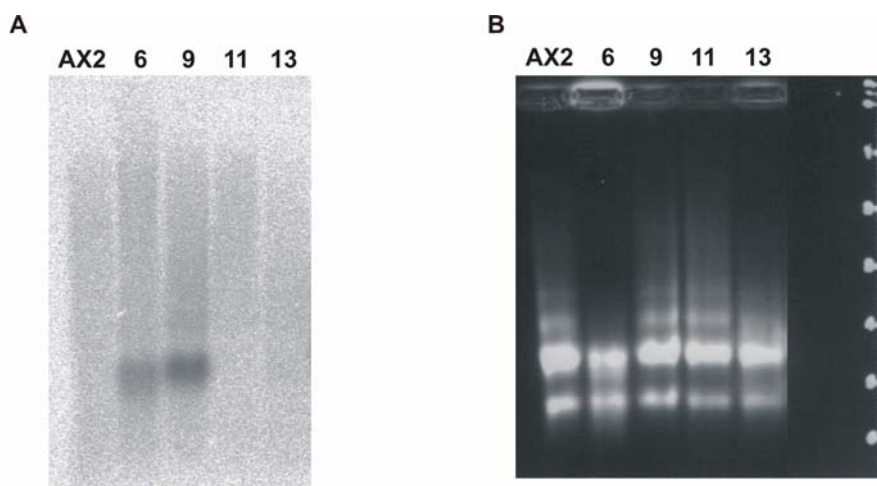


Abb. 24: Northern Blot-Analyse der unmodifizierten Sse346 überexprimierenden-Mutanten. A) Mittels Northern Blot-Technik mit einer radioaktiv markierten sse346-Sonde konnte gezeigt werden, dass die Klone 6 und 9 deutlich mehr sse346 mRNA transkribieren. Weder im Wildtyp noch in den beiden anderen Stämmen, kann sse346 detektiert werden. B) Die Ethidium Bromid Färbung des dazu gehörigen RNA Gels zeigt, dass bis auf den Stamm 6 ungefähr gleiche Mengen an RNA aufgetragen wurden. Stamm 6 zeigt weniger und auch etwas degradierte RNA.

Für die Klone 6 und 9, die aus der gleichen Transformation stammten, konnte mittels Northern Blot-Analyse gezeigt werden, dass sie sse346 stärker als der Wildtyp transkribieren (Abb. 24A). Hier scheint das Gen so stark überexprimiert zu werden, dass die Nachweisgrenze, die beim Wildtyp anscheinend den limitierenden Faktor für die Northern Blot-Analyse ausmacht, überschritten wird. Für die beiden anderen Klone 11 und 13 wurde keine Überexpression gefunden. Für die unmodifizierten Sse346 Überexprimierer konnte keine Veränderung im Phänotyp im Vergleich zum Wildtyp festgestellt werden. Phagocytoserate, Wachstum auf Bakterienrasen, Lysozymaktivität und auch Gp70-Expression waren vollkommen wildtypisch (Abb. 25). Bei den Veränderungen im Phänotyp der modifizierten Sse346 Überexprimierer handelt es sich wahrscheinlich um Artefakte. Sie kommen vermutlich durch Wechselwirkungen mit anderen Proteinen zustande.

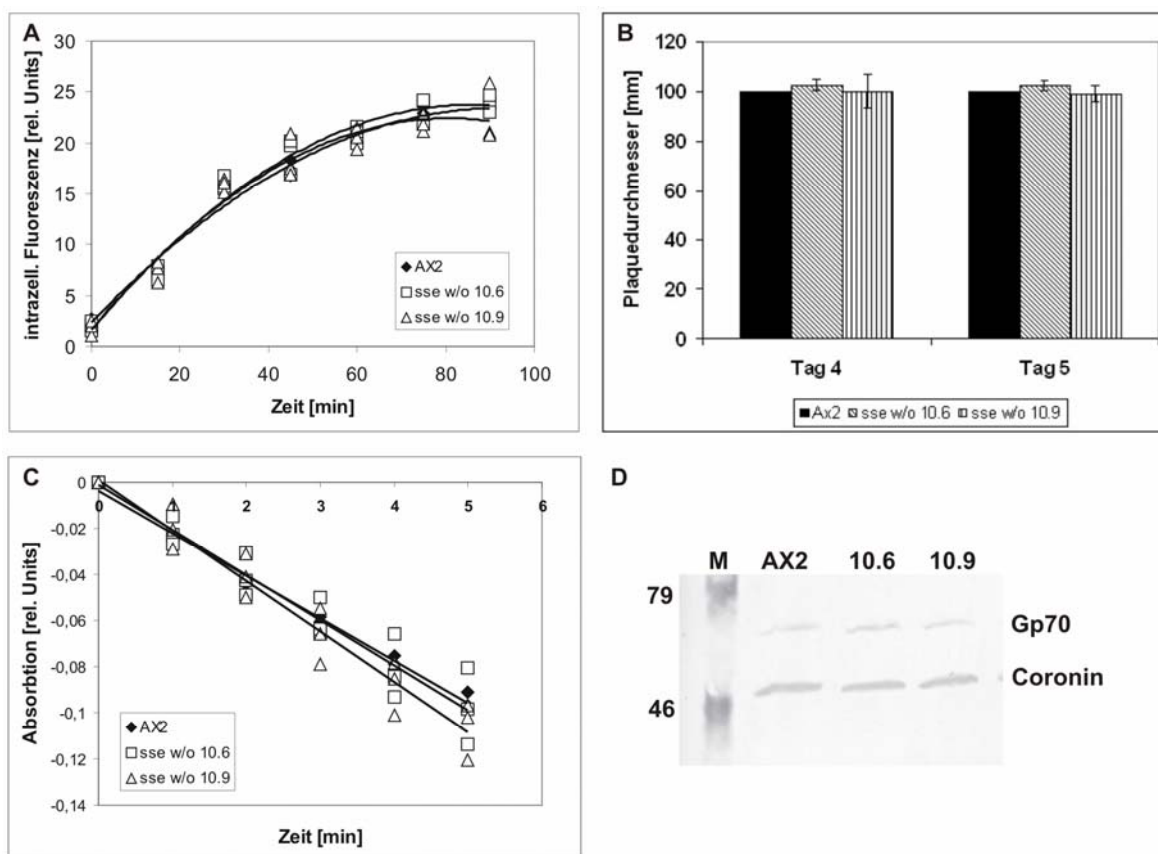


Abb. 25: Die unmodifizierten Sse346 Überexprimierer zeigen keine Veränderung gegenüber dem Wildtyp. A) Die Sse346 Überexprimierer (offenes Drei- und Viereck) zeigen keine Veränderung in der Phagozytoserate im Vergleich zum Wildtyp (geschlossene Raute) ($n=2$). B) Das Wachstumsverhalten der Überexprimierer (gemusterte Balken) auf Bakterienrasen ist ebenfalls nicht beeinträchtigt. Der Wildtyp (schwarzer Balken) wurde für drei unabhängige Experimente jeweils auf hundert Prozent gesetzt und die Plaquedurchmesser der Mutanten jeweils prozentual berechnet und gemittelt. C) Die Lysozymaktivität der Mutanten (offenes Drei- und Viereck) entspricht der des Wildtyps (geschlossene Raute) ($n=3$). D) Western Blot Analyse der Gp70-Expression in den Überexprimierern und dem Wildtyp. Alle drei Stämme zeigen gleiche Gp70-Expression (obere Bande). Als Auftragskontrolle dient Coronin (untere Bande). Markergrößen in kDa.

2.9 Ssj758

Bei *ssj758* handelt es sich um das zweite der acht Gene, welches in den Microarrays in beiden untersuchten Ausgangsmutanten vermindert exprimiert erschien, und von mir untersucht wurde. Über das Protein an sich war nichts bekannt. Das Gen (DDB0167628) liegt mit einer Länge von 2091 bp auf Chromosom 2 im Genom von *Dictyostelium discoideum* und beinhaltet keine Introns. Das dazugehörige Protein sollte somit eine Länge von 696 Aminosäuren und ein molekulares Gewicht von 75,7 kDa haben. Laut Dicty Base sollte dieses Protein drei SH3-Domänen aufweisen und weitere Datenbankrecherchen unterstützten diese Annahme. Bei Recherchen in SMART EMBL wurde weiterhin eine Coiled-coil-Domäne zwischen Aminosäure 660 bis 696, also am C-Terminus des Proteins vorausgesagt (Abb. 26). Die SH3-Domänen sollten zwischen den Aminosäuren 6-61, 322-379 und 461-515 liegen. SH3 (src homology 3) Domänen stellen wichtige Module für Proteininteraktionen dar.



Abb. 26: Schematische Darstellung von Ssj 758 (übernommen von SMART EMBL). In orange die drei SH3-Domänen, in grün die Coiled-coil-Domäne, rosa sind Bereiche geringer Komplexität.

2.9.1 Ssj758 kolokalisiert mit Aktin

Auch von diesem Protein sollte zuerst die Lokalisation ermittelt werden. Hierzu wurden ebenfalls zwei GFP-Fusionskonstrukte hergestellt, in dem GFP in einem Fall an den N-Terminus (GFP-Ssj758) und im anderen Fall GFP an den C-Terminus des Gens fusioniert wurde (Ssj758-GFP). Diese Fusionskonstrukte wurden über Elektroporation in Wildtyp Zellen eingebracht und richtige Klone über Western Blot Analyse mit einem monoklonalen GFP Antikörper ermittelt (Abb. 27).

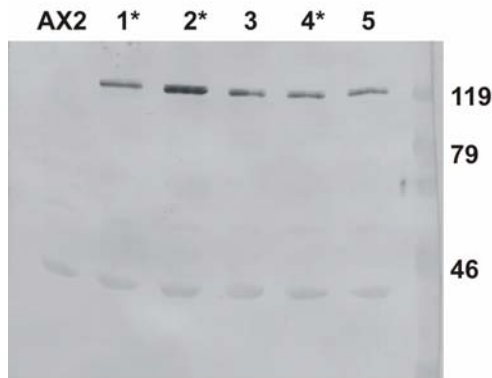


Abb. 27: Western Blot Analyse der Fusionsproteine von Ssj758-GFP. Die Membran wurde mit einem monoklonalem GFP-Antikörper und mAB Act 1-11 inkubiert und entwickelt. Die molekulare Masse der GFP-Fusionsproteine (obere Bande) entsprach der erwarteten Größe von etwa 104 kDa. Aufgetragen wurde wie folgt: 1) GFP-Ssj758, 2)-5) 4 Klone von Ssj758-GFP aus 2 unabhängigen Transformationen. Die mit einem Stern gekennzeichneten Klone werden im Weiteren vorgestellt. Die untere Bande entspricht Aktin und dient als Auftragskontrolle. Markergrößen in kDa.

Beide GFP-Fusionskonstrukte lokalisierten vollkommen gleich. Die hauptsächliche Lokalisation war cytoplasmatisch, wobei immer ein oder mehrere größere „Dots“ und eine verstärkte Lokalisation am Cortex der Zelle zu finden war. Bei den „Dots“ handelte es sich um das MTOC (Microtubuli Organizing Center), wie man anhand der Immunfluoreszenzen mit einem Antikörper gegen ein Protein des MTOC erkennen kann (Abb. 28B). So sieht man im Overlay, dass beide Strukturen eindeutig überlappen. Die zwei „schwarzen Löcher“ neben den gefärbten Strukturen stellen hier wahrscheinlich die beiden Kerne der Zelle dar, so dass es nicht verwunderlich ist, dass zwei MTOC's in dieser Zelle zu finden waren. Zellen die Ssj758 myc exprimieren, wobei das myc-Epitop N-terminal vor das Gen inkloniert wurde, zeigen ebenfalls eine cytoplasmatische Färbung sowie eine Färbung des Cortex, jedoch keine Färbung des MTOCs (Daten nicht gezeigt). Es könnte sich demnach bei den Ssj758-GFP exprimierenden Mutanten um ein Artefakt handeln. Für andere Zellen konnte gezeigt werden, dass so genannte Aggresomen, die nicht vollständig gefaltete Proteine beinhalten, an das MTOC gebracht werden (Johnston et al., 1998), ob diese in *Dictyostelium discoideum* jedoch auch existieren ist nicht bekannt.

Die verstärkte Lokalisation am Cortex der Zelle erinnerte stark an Aktin. Immunfluoreszenzstudien mit einem monoklonalen Antikörper gegen Aktin bestätigten eine Kollokalisierung beider Proteine, wobei diese nicht vollständig ist, sondern anscheinend Ssj758 nur in bestimmten Bereichen mit Aktin kollokalisiert (Abb. 28A). Sollte Ssj758 wie vermutet einen Einfluss auf die Phagozytose haben, könnte es sein, dass eine direkte oder auch eine indirekte Beziehung zu Aktin besteht.

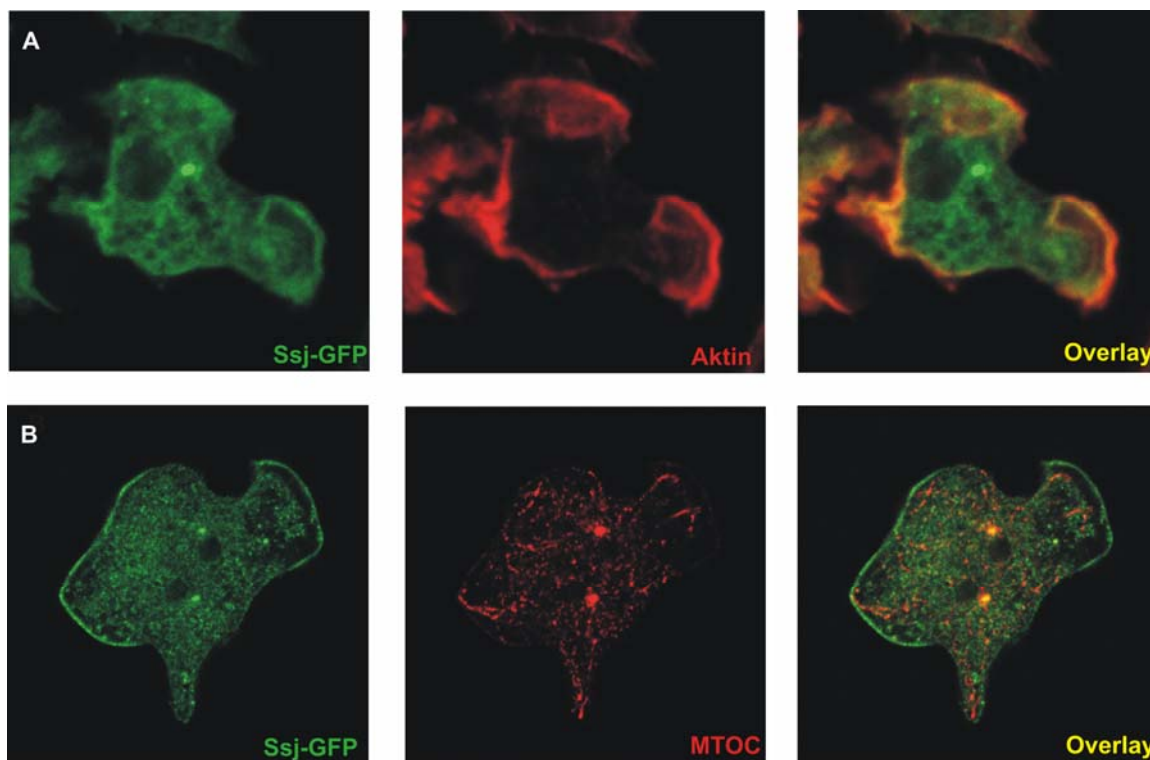


Abb. 28: Lokalisation von GFP markierten Ssj758. Konfokale Schnitte einzelner GFP modifizierter Ssj758 exprimierender Zellen (grün) mit unterschiedlichen Antikörpern angefärbt (rot) und Overlay Images.

A) Eine Zelle mit einem monoklonalem Antikörper gegen Aktin angefärbt. Die Bildbreite entspricht 17 μm .

B) Immunfluoreszenz mit einem Antikörper, welcher gegen ein Protein des MTOC gerichtet ist.

(Bildbreite 40 μm)

2.9.2 Der Fehlen von Ssj758 führt zu vergrößerten Plaquedurchmessern, aber nicht zu einer verbesserten Phagocytoserate

Sollte die verringerte Expression von Ssj758 in der alyA138 Knockout-Mutante und in dem Gp70 Überexprimierer tatsächlich an dem bestehenden Phänotyp einer erhöhten Phagocytoserate und vergrößerten Plaquedurchmessern auf Bakterienrasen beteiligt sein, so würde im bestmöglichen Fall das Fehlen von Ssj758 einen Phänotyp ähnlich der Ausgangsmutanten hervorrufen.

Um dies zu untersuchen, wurden Knockout-Mutanten von *ssj758* hergestellt. Das linearisierte *ssj758* Gen, unterbrochen durch eine gefloxt Blasticidin-Resistenz Kasette, wurde über Elektroporation in Wildtyp Zellen eingebracht. Hierbei wurden zwei unterschiedliche Konstrukte verwendet, wobei bei einem das Leseraster der Bs^r -Kasette die gleiche Orientierung wie das Gen aufwies (Klon 16) und bei dem anderen die Orientierung entgegengesetzt verlief (Klon 11).

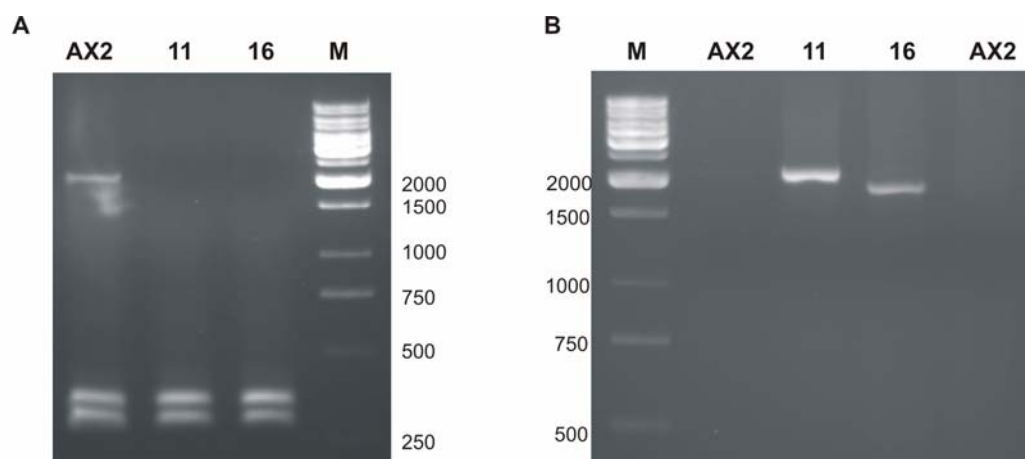


Abb. 29: Nachweis der Ssj758 Knockout-Mutanten. A) PCR des Ssj758 Gens mit Primern #129 und #130, die das gesamte Gen flankieren (obere Bande). Nur im Wildtyp ist ein Produkt mit der erwarteten Größe von 2100 bp amplifizierbar. In den beiden Knockout-Mutanten 11 und 16 konnte nicht über die Bs^I Kasette hinweg amplifiziert werden. Die beiden unteren Banden dienen als Kontrolle (Primer lys I for und lys I rev), dass überall amplifizierbare DNA verwendet wurde. B) Für den Nachweis, dass das endogene Ssj758 Gen durch das Gen, welches die Bs^I Kasette trägt ersetzt wurde, wurde für beide Mutante eine PCR mit dem Primer #167, der 3' downstream des ssj 758 Gens im Genom bindet, und einem Primer, der in der Bs^I Kasette bindet, durchgeführt. Hierzu wurden aufgrund der entgegengesetzten Orientierung der Bs^I Kassetten zwei unterschiedliche Primer benutzt. Im Wildtyp konnte mit beiden Primerkombinationen nichts amplifiziert werden. In der Knockout-Mutante 11 konnte mit dem Primer bsr-G1 (# 57) ein Produkt mit der erwarteten Größe von 2100 bp und für Klon 16 mit dem Primer Bsr-T3'60 (Abteilung Genetik) ein Produkt mit der Größe von 1900 bp amplifiziert werden. Markergrößen in bp.

Mittels PCR konnte gezeigt werden, dass bei den beiden Klonen 11 und 16 das endogene Gen durch das von außen eingebrachte ssj758 Konstrukt, unterbrochen durch die Bs^I -Kasette, ersetzt wurde (Abb. 29). Die Effizienz für richtige Knockout-Mutanten lag hierbei bei ca. 10%.

Die beiden unabhängigen Knockout-Mutanten verhielten sich vollkommen gleich. So zeigten beide nach 4 und 5 Tagen des Wachstums auf Bakterienrasen um etwa 40% vergrößerte Plaquedurchmesser im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 30A). Erstaunlicherweise war die Phagozytoserate nicht beeinflusst, hier verhielten sich beide Mutanten wildtypisch (Abb. 30B). In den meisten Fällen zeigen jedoch Mutanten mit vergrößerten Plaquedurchmessern auch eine Veränderung in der Phagozytoserate bzw. umgedreht, wie das auch für den Gp70 Überexprimierer oder für die alyA 138 Knockout-Mutante der Fall ist (Müller et al., 2005; Yuan and Chia, 2000). Für diese Differenz im Verhalten können jedoch unterschiedliche Faktoren verantwortlich sein, die im Weiteren analysiert werden sollten.

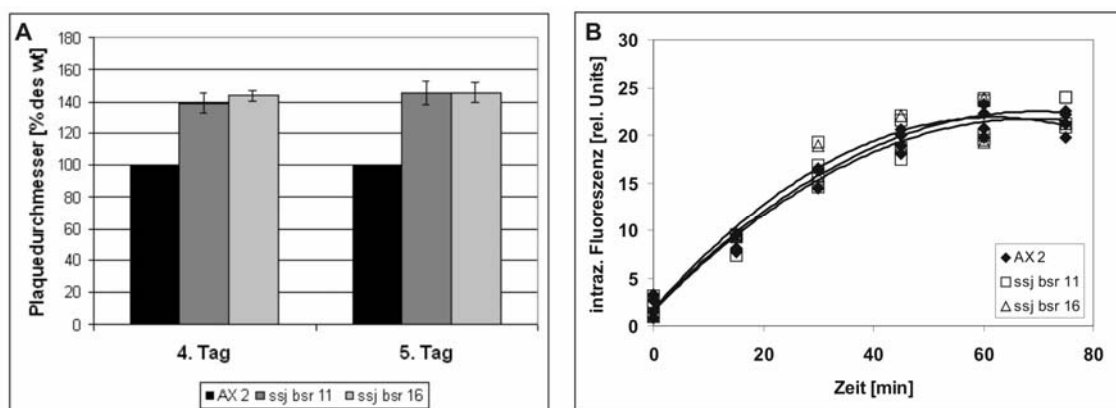


Abb. 30: Die Ssj758 Knockout-Mutanten zeigen zwar einen vergrößerten Plaquesdurchmesser auf Bakterienrasen, jedoch eine wildtypische Phagozytoserate. A) Beide Knockout-Mutanten (graue Balken) bilden im Vergleich zum Wildtyp (schwarzer Balken) größere Plaques aus (n=4). B) Die Mutanten (offenes Dreieck und offenes Viereck) zeigen gegenüber dem Wildtyp (geschlossene Raute) keine Veränderung in der Phagozytoserate (n= 3-4).

2.9.3 Die Diskrepanz zwischen Phagozytoserate und Plaquesdurchmesser kann trotz unterschiedlicher Ansätze nicht geklärt werden

Ein Unterschied zwischen den beiden verwendeten Methoden liegt darin begründet, dass bei dem Phagozytose-Assay die Messung aus Schüttelkultur heraus stattfindet, während beim Wachstum auf Bakterienrasen die Phagozytose substratgebunden vonstatten geht. So sind Mutanten bekannt, die einen Phagozytosedefekt in Suspension aber nicht substratgebunden aufweisen (Cohen et al., 1994). Aus diesem Grund wurde ein Phagozytose-Assay von Costar Platten durchgeführt. Auch hier konnte zwischen den ssj758⁻ Mutanten und dem Wildtyp kein Unterschied detektiert werden (Abb. 31A).

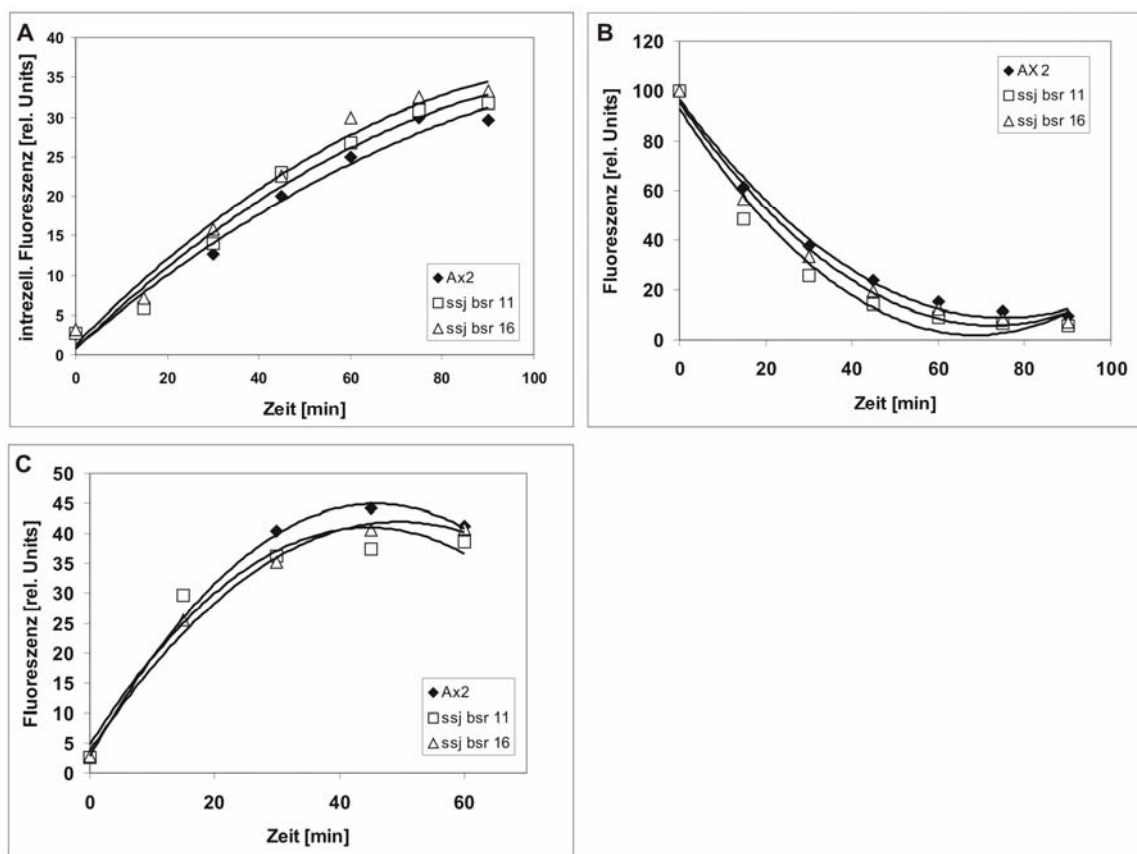


Abb. 31: Die Phagozytoserate ist nicht substratabhängig noch können die Knockout-Zellen Bakterien besser verwerten. Die Ssj758 Knockout-Mutanten (offenes Drei- und Viereck) im Vergleich zum Wildtyp (geschlossene Raute). A) Die Messung der Phagozytoserate substratgebunden von Costar Platte erfolgte ähnlich dem Phagozytose Assay aus Schüttelkultur. 1×10^6 Zellen pro Costar Well wurde eine äquivalente Menge an TRITC Hefen zugesetzt. Die Zellen wurden zum Zeitpunkt $t=0$ und dann im 15 min Abstand abgespült und die Fluoreszenz der internalisierten Hefen bestimmt. Beide Knockout-Mutanten zeigten eine Phagozytoserate vergleichbar mit der des Wildtyps. B) Die Degradation von internalisierten GFP-exprimierenden Bakterien war durch das Fehlen von Ssj758 nicht beeinträchtigt. Die Zellen wurden für 15 min mit den Bakterien gefüttert und dann gewaschen. Anschließend wurde die Degradation als Abnahme der Fluoreszenz über die Zeit gemessen. Der erste Wert wurde für jeden Stamm als 100% angenommen und die folgenden Werte prozentual berechnet. C) Ein Phagozytose Assay mit $1,45 \mu\text{m}$ großen Latexpartikeln zeigte ebenfalls eine wildtypische Phagozytoserate der Ssj758 defizienten Stämme. Dieser Assay wurde wie der Phagozytose Assay aus Schüttelkultur durchgeführt. Für A)-C) wurde jeweils ein Assay als Beispiel dargestellt.

Ein weiterer Unterschied entsteht dadurch, dass bei dem Phagozytose-Assay Hefen verwendet werden, die aufgrund ihrer Zellwand nicht von *Dictyostelium discoideum* degradiert werden können, während beim Wachstum auf Bakterienrasen die Bakterien degradiert werden und so als Nahrungsquelle dienen. Sollten die Knockout-Mutanten also besser die Bakterien verwerten können, stünde ihnen mehr Energie zu Verfügung und sie sollten somit besser als die Wildtyp Zellen auf Bakterienrasen wachsen. In diesem Falle sollten die Mutanten in einer Bakteriensuspension ebenfalls besser wachsen als der Wildtyp.

Die Verdopplungszeit beim Wildtyp in Bakteriensuspension lag bei ca. $5,0 \pm 0,2$ h und die der Mutanten bei $4,8 \pm 0,4$ h bzw. $4,7 \pm 0,5$ h (3 Messungen). Die Knockout-Mutanten zeigten zwar eine geringfügig bessere Verdopplungszeit, doch entsprachen diese weder den Erwartungen noch waren sie statistisch trennbar. Auch ein durchgeführter Degradations Assay zeigte kein unterschiedliches Verhalten zwischen Wildtyp und Mutanten (Abb. 31B). Die Degradation und somit auch die Energiegewinnung scheint also nicht der wesentliche Faktor zu sein, der den Unterschied ausmacht.

Für einige Mutanten z.B. der AP-1 medium chain Knockout-Mutante in *Dictyostelium discoideum* ist bekannt, dass die Größe der internalisierten Partikel ausschlaggebend für die Phagozytoserate ist (vergleiche hierzu (Lefkir et al., 2004)). Da Bakterien im Allgemeinen etwas kleiner als Hefen sind, wurden Phagozytose Assays mit synthetischen Latexpartikeln mit einem Durchmesser von ca. $1,45 \mu\text{m}$ durchgeführt. Auch hier zeigte sich kein unterschiedliches Verhalten in der Phagozytoserate von ssj758 Knockout-Mutanten im Vergleich zu Wildtyp-Zellen (Abb. 31C).

Ein weiterer möglicher Grund für das unterschiedliche Verhalten liegt in der Art der phagozytierten Partikel, also ob es sich um Bakterien, Hefen oder Latexpartikel handelt. Comitín Knockout-Mutanten z.B. zeigen einen Defekt bei der Internalisierung von Hefen und *E. coli* Zellen aber nicht bei der Internalisierung von Latexpartikeln (Schreiner et al., 2002). Ähnliches gilt für Knockout-Mutanten von Phg1. Diese können *Klebsiellen* normal phagozytieren, während selektiv bei der Internalisierung von Latexpartikeln und *E. coli* Zellen ein Defekt auftritt (Cornillon et al., 2000). Auch bei einem Phagozytose-Assay mit FITC markierten *E. coli* Zellen war kein Unterschied zwischen Wildtyp und Mutanten in der Phagozytoserate zu erkennen (Abb. 32A). Im umgekehrten Fall, beim Wachstum auf *E. coli* Rasen zeigten die Ssj758 Knockout-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp wiederum deutlich vergrößerte Plaquedurchmesser (Abb. 32B). Also scheint auch die Art der Partikel nicht für das unterschiedliche Verhalten im Wachstum auf Bakterienrasen und in dem Phagozytose Assay verantwortlich zu sein.

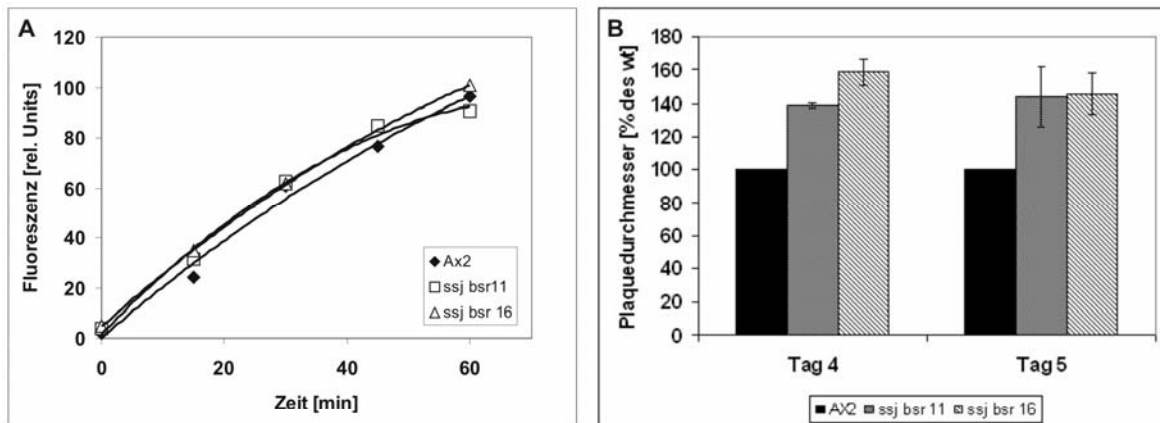


Abb. 32: Die Art der Partikel ist nicht entscheidend für die Differenz zwischen Phagozytoserate und Plaquesdurchmesser. A) Die Phagozytoserate von Bakterien ist in den Ssj758 Knockout-Mutanten (offenes Drei- und Viereck) gleich der des Wildtyps (geschlossene Raute). Die Zellen wurden im Verhältnis 200:1 mit FITC markierten *E. coli*s versetzt. Zum Zeitpunkt $t=0$ und dann im Abstand von 15 min wurde eine Probe entnommen, die *D. dictyostelium* Zellen über PEG8000 von den Bakterien befreit, anschließend lysiert und die Fluoreszenz der so freigesetzten FITC Bakterien bestimmt. Eine Messung dient hier als Beispiel. B) Die Ssj758 Knockout-Mutanten (gemusterte Balken) zeigen auch beim Wachstum auf *E. coli* Rasen vergrößerte Plaquesdurchmesser im Vergleich zum Wildtyp (schwarzer Balken). Auch hier wurde für zwei Messungen die Plaquesdurchmesser des Wildtyps auf hundert Prozent gesetzt und die Plaquesgrößen der Mutanten prozentual berechnet und gemittelt.

2.9.4 Das Fehlen von Ssj758 führt zu einer verringerten Gp70-Expression

Die Knockout-Mutanten von ssj758 wurden weiterhin auch auf die Lysozymaktivität in den Zellen und auf die Expression von Gp70 untersucht. In der Lysozymaktivität zeigten sie im Vergleich zum Wildtyp keinen Unterschied (Abb.33A). Allerdings zeigten sie eine verringerte Gp70-Expression. In Western Blot-Analysen war im Vergleich zum Wildtyp bei mehreren Ansätzen immer eine wesentlich schwächere Bande für die Knockout-Mutanten zu erkennen (Abb. 33B). Auch in Immunfluoreszenzstudien mit dem monoklonalen Antikörper 130-80-2 konnten bereits deutliche Unterschiede in der Menge von Gp70 in den beiden ssj758 Knockout-Mutanten festgestellt werden. In ihren Zellen waren immer deutlich weniger Gp70 markierte Vesikel zu sehen. Als Beispiel sind in Abbildung 33C und 33D einige wahllos aufgenommene Bilder mit Zellen des Wildtyps und der beiden Mutanten gezeigt.

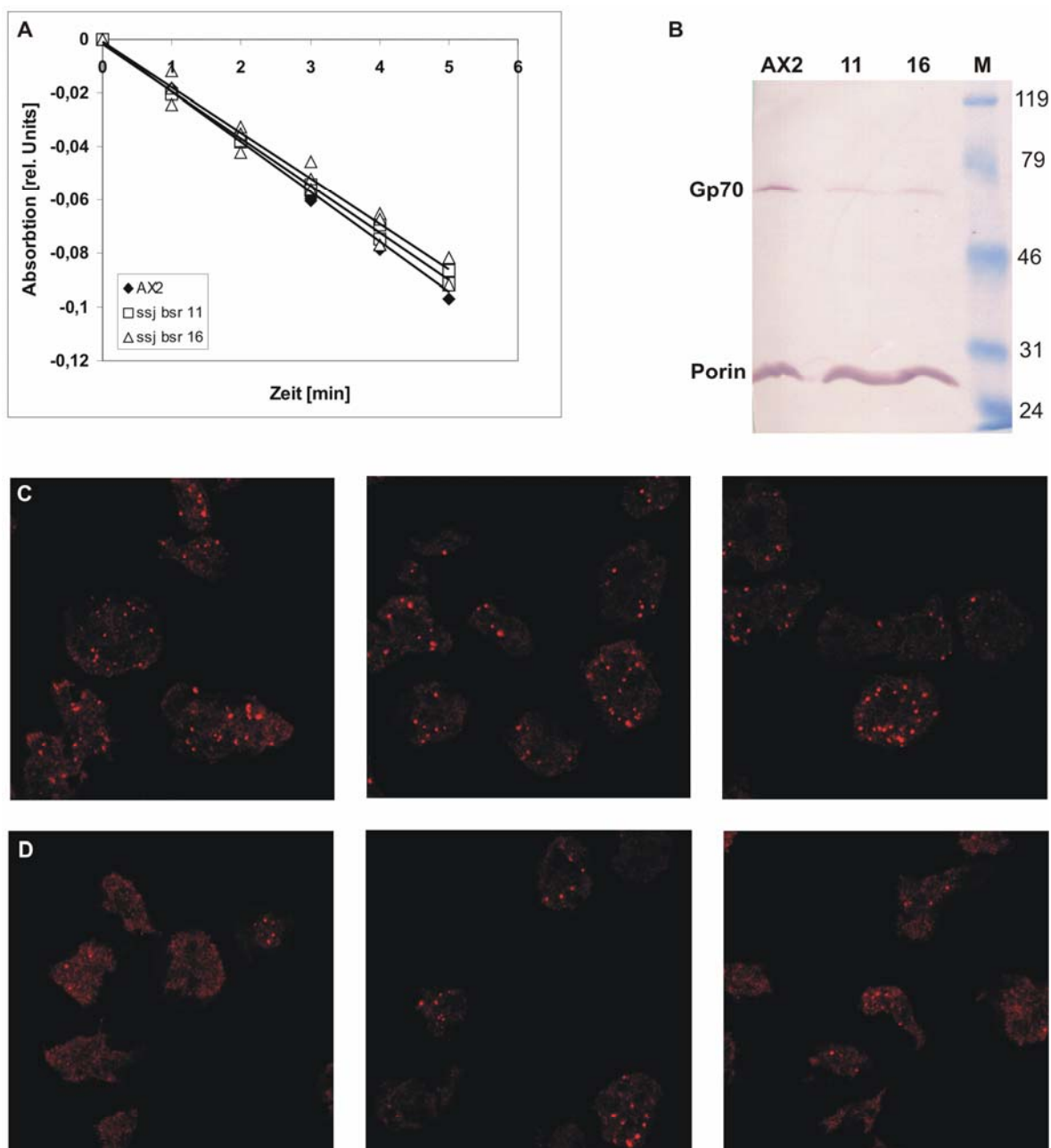


Abb. 33: Die Ssj758 Knockout-Zellen zeigen keine Veränderung in der Lysozymaktivität, aber eine verringerte GP70-Expression. A) Die Lysozymaktivität ist in den beiden Knockout-Mutanten (offenes Drei- und Viereck) im Vergleich zum Wildtyp (geschlossene Raute) unverändert (n=3). B) Laut Western Blot-Analyse mit mAB 130-80-2 ist die Gp70-Expression in den beiden Ssj758 Knockout-Stämmen 11 und 16 im Vergleich zum Wildtyp reduziert. Die untere Bande dient als Auftragskontrolle, es wurde hier ein monoklonaler Antikörper gegen das mitochondriale Porin verwendet. C) und D) Immunfluoreszenz Studien mit einem monoklonalen Gp70-Antikörper zeigen eine geringere Zahl an gefärbten Strukturen in den Ssj758 Knockout-Mutanten (D) als im Wildtyp (C). Die Bildbreite aller Aufnahmen entspricht ungefähr 50 µm.

Die verringerte Gp70-Expression könnte eine gute Erklärung für das unterschiedliche Verhalten der *ssj758* defizienten Mutanten im Vergleich zu den Ausgangsmutanten sein. Sollte dies tatsächlich der Fall sein, so sollten die *ssj758*

Stämme, wenn man von außen die Gp70-Expression erhöht, ebenfalls eine erhöhte Phagocytoserate zeigen und damit den beiden Ausgangsmutanten entsprechen.

2.9.5 Die Überexpression von Gp70 im ssj758 Knockout-Hintergrund führt zu keiner Veränderung des Phänotyps

Für die Herstellung von Gp70 Überexprimieren im ssj758 Knockout-Hintergrund wurde der gleiche Vektor benutzt wie für die Herstellung der Gp70 Überexprimierer allein. Dieser wurde in die ssj758⁻ Mutanten 16 über Elektroporation eingebracht und die erhaltenen Klone über Western Blot analysiert. Drei der so erhaltenen Klone aus zwei unabhängigen Transformationen, hier genannt gp70 1.16, gp70 1.22 und gp70 2.4, wurden analysiert. Alle drei Mutanten zeigen eine deutlich erhöhte Gp70-Expression wie anhand der Western Blot-Analyse (Abb. 34A) zu erkennen ist. Proteinproben der beiden ssj758 Knockout-Stämme, die hier noch einmal mit aufgetragen wurden, zeigten wieder eine deutlich geringeren Gp70-Gehalt im Vergleich zum Wildtyp. Entgegen aller Erwartungen führte eine Überexpression von Gp70 im ssj758 Knockout-Hintergrund zu keiner Veränderung im Phänotyp. Alle drei Mutanten zeigten immer noch eine wildtypische Phagocytoserate, wie auch der ssj758⁻ Stamm alleine (Abb. 34B). Der Plaquedurchmesser war, so wie bei den ssj758 Knockout-Mutanten, im Vergleich zum Wildtyp vergrößert (Abb. 34C). Auch die Lysozymaktivität war durch die Überexpression von Gp70 nicht beeinflusst (Abb. 34D). Aus diesem Ergebnis lässt sich schließen, dass für die erhöhte Phagocytoserate in der Gp70 überexprimierenden-Mutante Ssj758 gebraucht wird. Fehlt Ssj758 in den Zellen, so ist anscheinend die Signalkaskade von einer erhöhten Gp70-Expression zur der Internalisierung von Hefen unterbrochen und die Zellen zeigen eine wildtypische Phagocytoserate.

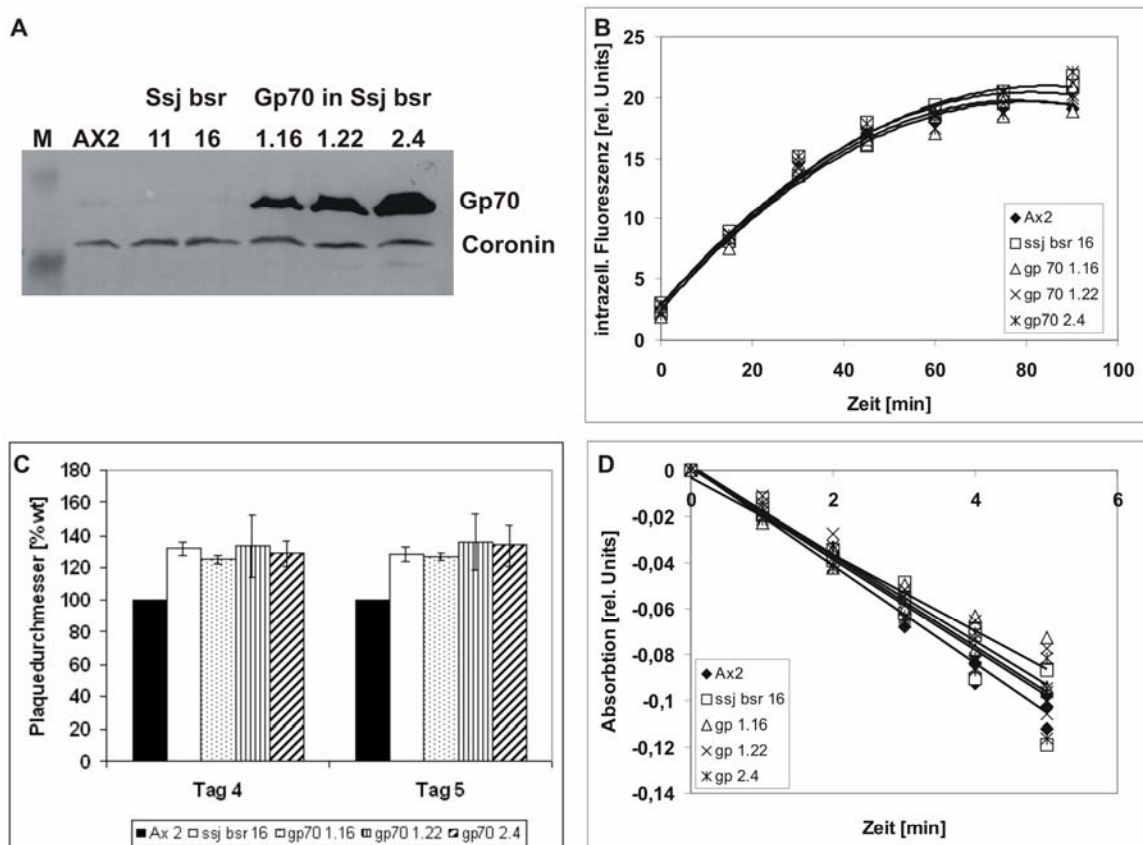


Abb. 34: Die Überexpression von Gp70 im ssj758 Knockout-Hintergrund hat keinen Einfluss auf dessen Phänotyp. A) Western Blot-Analyse der Gp70 Überexprimierer im ssj bsr 16 Hintergrund. Die Stämme 1.16, 1.22 und 2.4 zeigen eine deutlich erhöhte Gp70-Expression (obere Bande) im Vergleich zum Wildtyp. Im Wildtyp ist nur eine sehr schwache Bande zu erkennen, während in den beiden Knockout-Stämmen keine Bande für Gp70 zu erkennen ist. Zur Kontrolle wurde der Blot mit einem Antikörper gegen Coronin gegengefärbt. Man sieht, dass in allen Spuren ungefähr gleich viel Protein aufgetragen wurde. B) Die Phagozytoserate ist in den Gp70-überexprimierenden ssj758 Knockout-Mutanten (offenes Dreieck, Kreuz und Stern) unverändert gegenüber dem Knockout (offenes Viereck). Alle zeigen eine wildtypische (geschlossene Raute) Phagozytoserate (n= 2). C) Eine erhöhte Gp70-Expression (gemusterte Balken) im ssj758 Knockout (weißer Balken) hat keine Auswirkungen auf die Plauegröße. Alle Mutanten zeigen im Vergleich zum Wildtyp (schwarzer Balken) um ca. 35% vergrößerte Plaques (n=2). D) Sowohl die ssj758 Knockout-Mutante (offenes Viereck) als auch die Gp70 überexprimierenden-Zellen (offenes Dreieck, Kreuz und Stern) zeigen in ihrer Lysozymaktivität keinen Unterschied zum Wildtyp (geschlossene Raute) (n=3).

2.9.6 Ssj758 Überexprimierer zeigen eine erhöhte Phagocytoserate dafür aber kleinere Plaques auf Bakterienrasen

Da auch für dieses Protein bereits für Lokalisationsstudien hergestellte GFP-modifizierte Überexprimierer existierten, sollten diese der Vollständigkeit halber ebenfalls untersucht werden. Diese Überexprimierer verhielten sich alle vollkommen gleich, deshalb sollen im Weiteren die Ergebnisse von dreien der Mutanten, hierbei einer von GFP-Ssj758 (2.6) und zwei aus unabhängige Transformationen von Ssj758-GFP (1.5 und 2.10), vorgestellt werden (Vergleiche hierzu Abb. 27).

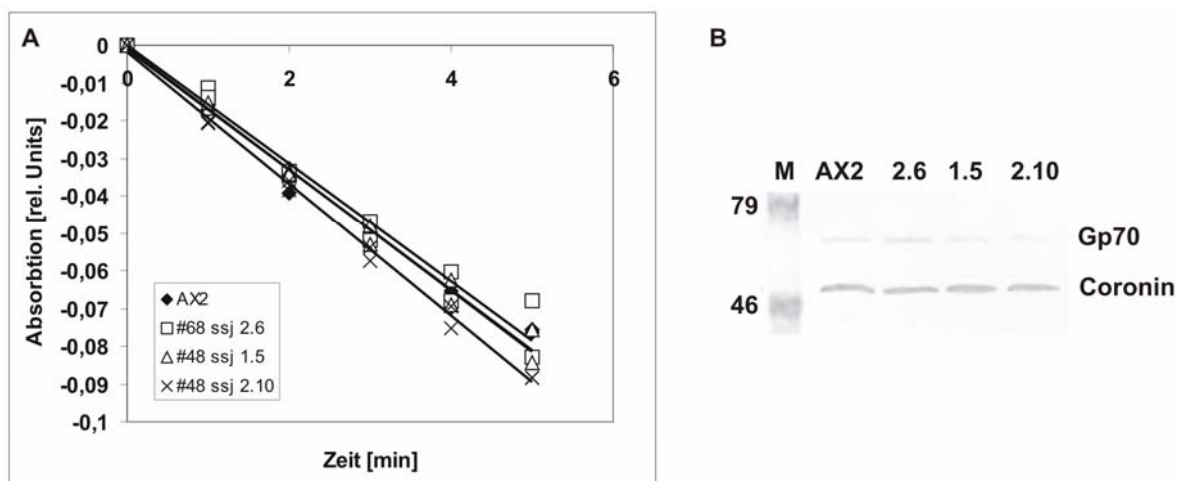


Abb. 35: Die Ssj758 Überexprimierer zeigen keine Veränderung in der Lysozymaktivität oder der Gp70-Expression. A) Die Lysozymaktivität der überexprimierenden-Mutanten (Kreuz, offenes Drei- und Viereck) ist gleich der Lysozymaktivität des Wildtyps (geschlossene Raute) ($n=2$). B) Die Gp70 Expression (obere Bande) ist unverändert in den Mutanten. Als Auftragskontrolle dient Coronin. Markergrößen in kDa.

Zeigten die ssj758 Knockout-Mutanten eine erniedrigte Gp70-Expression, so war diese in den Überexprimierern im Vergleich zum Wildtyp unverändert (Abb. 35B). Auch die Lysozymaktivität war in den Überexprimierern wildtypisch (Abb. 35A). Allerdings führte die Überexpression von Ssj758 zu einer ca. 26% erhöhte Phagocytoserate gegenüber dem Wildtyp (Abb. 36A). Im Vergleich dazu jedoch war der Plaquesdurchmesser auf ca. 80% des Wildtyps reduziert (Abb. 36B). Somit existiert auch bei den Ssj758 Überexprimierern, wie auch bei den dazugehörigen Knockout-Mutanten, eine Diskrepanz zwischen Wachstum auf Bakterienrasen und Partikelinternalisierung. Hierbei verhalten sich die Überexprimierer, was Plaquesdurchmesser betrifft, komplementär zu den Knockout Stämmen. Während

die Knockouts vergrößerte Plaques aufwiesen, zeigten die Überexprimierer einen kleineren Plaquesdurchmesser. Es ist erstaunlich, dass die Überexprimierer eine verbesserte Phagozytoserate aufweisen, während die Knockouts keinen Defekt zeigen.

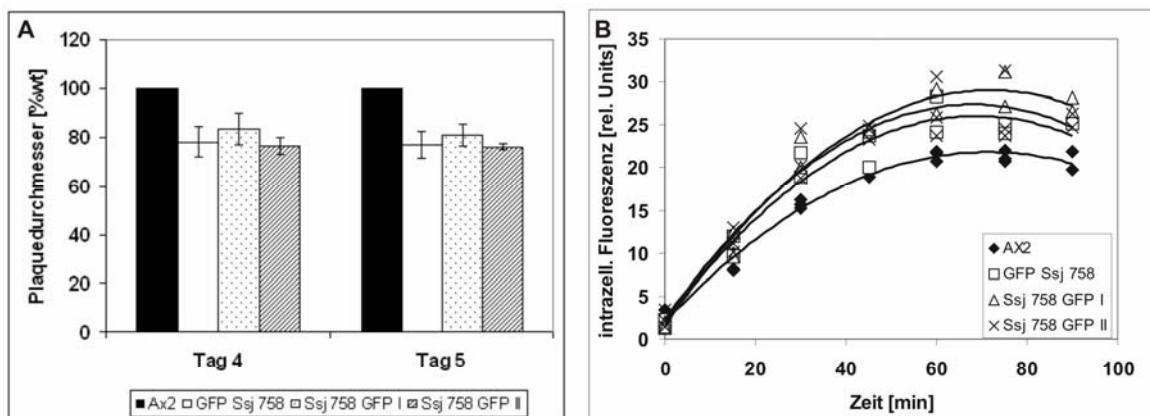


Abb. 36: Auch die Ssj758 Überexprimierer zeigen eine Diskrepanz zwischen Plaquegröße und Partikelinternalisierung. A) Die Überexprimierer (weißer und gemusterte Balken) zeigen im Vergleich zum Wildtyp (schwarzer Balken) verkleinerte Plaquesdurchmesser. Es wurden die Messungen für den Wildtyp von vier Experimenten jeweils 100% gesetzt, die mittlere Größe der Plaques für die Mutanten der jeweiligen Messung ebenfalls in Prozent berechnet und die Ergebnisse gemittelt. B) Die Mutanten (offenes Drei- bzw. Viereck und Kreuz) zeigen im Vergleich zum Wildtyp (geschlossene Raute) eine erhöhte Phagozytoserate (n=2/3).

2.10 cDNA Microarray-Analyse der Sse346 Knockout-Mutante

Zur Ermittlung weiterer Kandidaten in der Signalkaskade, wurde der Stamm sse346⁻ A6 mittels Microarray-Analysen untersucht. Diese wurde wie unter 2.5 beschrieben durchgeführt. Tabelle 3 zeigt die ESTs, die nach der Auswertung mit dem Programm SAM als reguliert gefunden wurden. Der Faktor gibt hierbei an, um wie vielfach das Gen reguliert vorliegt. Setzt man die Grenze für signifikante Expressionsänderungen bei 1,5, wie im ersten Fall, so lässt sich sagen, dass in den Sse346 defizienten Mutanten die Expression aller untersuchten Gene gleich dem Wildtyp ist. Sse346 scheint in der vermuteten Signalkaskade als letztes Protein durch Expressionsänderungen reguliert zu werden.

Das Ausschalten von Sse346 erfolgte über homologe Rekombination eines Konstruktes, welches eine Bs^r Kasette trägt. Hierbei sind die ersten 500 Basen

des Proteins nicht involviert. Dies kann dazu führen, dass der Anfang des Gens transkribiert wird. Sollte dies der Fall gewesen sein, könnte dies erklären, warum sse346 nicht als vermindert transkribiert gefunden wurde, obwohl es sich ja um einen sse346 Knockout Stamm handelt. Hinzu kommt, dass nicht der vollständige EST SSE346 auf den Microarrays zu finden ist, sondern ein Fragment mit einer Länge von ca. 600bp. Um welches Stück des ESTs es sich handelt, ist dabei nicht bekannt (persönliche Mitteilung Ludwig Eichinger). Es wäre somit möglich, dass der Anfang der mRNA von sse346 auf dieses Stück passt und so kein Expressionsunterschied gemessen werden kann.

	EST Nummer	Faktor	Dicty Base Number	
Positiv	SSI 173	1,45	DDB0186987	Coiled coil region
Negativ	SSD764	0,7	DDB0229922	<i>sf3a3</i> sf3a3 = Splicing Factor 3A subunit 3
	VSA784	0,8	DDB0187726	Ribosomales Protein 60s Untereinheit
	SLG565	0,8	DDB0217351	Ähnlich dem Lysozym aus <i>Entamoeba histolytica</i> , ähnlich Chf50 (Counting factor)
	VSJ349	0,8	DDB0217906	Hypothetisches Protein Coiled coil domäne
	SSE469	0,8	DDB0190307	5 Transmembran-domänen
	VSB701	0,8	DDB0218607	LysM Domäne involviert in Zellwand Abbau Scavenger Rezeptor Aktivität
	SSE 822	0,8	DDB0168295	2 Transmembran-domänen

Tab. 3: Ergebnisse der cDNA Microarrays der Sse346 Knockout-Mutanten im Überblick. Die Tabelle zeigt alle als regulierten gefundenen ESTs und um welchen Faktor sie reguliert vorliegen. Allen ESTs konnte mittels Dicty Base ein Gen zugeordnet werden. Die letzte Spalte gibt wenn möglich die Funktion des Proteins bzw. homologe Gene oder für das Protein vorhergesagte Domänen an.

3 Diskussion

Für einen besseren Überblick sind die Ergebnisse der einzelnen untersuchten Mutanten, die im Folgenden diskutiert werden sollen, in Tabelle 4 zusammengefasst.

Mutante	Gp70 Expression	Phagocytose-rate	Plaque-durchmesser	Lysozym-aktivität
alyA138 Knockout- Mutante	erhöht	160%	200%	40%
Gp70 Überexprimierer	erhöht	140%	115%	wt
H5 Überexprimierer	wt	wt	wt	wt
sse346 Knockout- Mutanten	wt	120%	117%	135%
unmodifizierte Sse346 Überexprimierer	wt	wt	wt	wt
ssj758 Knockout- Mutanten	verringert	wt	140%	wt
Gp70 Überex. im ssj758 Knockout Hintergrund	erhöht	wt	135%	wt
GFP-Ssj758 Überexprimierer	wt	126%	80%	wt

Tab. 4: Überblick über die Ergebnisse der untersuchten Mutanten. Die Tabelle zeigt die Ergebnisse der untersuchten Mutanten bezüglich Gp70 Expression, Phagocytoserate, Plaquedurchmesser auf Bakterienrasen und Lysozymaktivität. Wenn möglich wurden diese in Prozent des Wildtyps angegeben, 100% entspricht wildtypisch (wt).

3.1 *AlyA* lokalisiert auf Phagosomen

Bereits 1972 konnte gezeigt werden, dass bei der Aufspaltung von Zellwänden internalisierter Bakterien in *Dictyostelium discoideum* Enzyme mit lysozymartiger Aktivität beteiligt sind (Braun et al., 1972). Die Expression von Lysozym scheint dabei regulierbar zu sein. So konnte bei einer Infektion von *D. discoideum* Zellen mit Legionellen mittels Microarray-Analysen eine erhöhte Lysozymaktivität festgestellt werden (Farbrother et al., 2006). Im Genom von *D. discoideum* konnten 11 Lysozyme aus 4 unterschiedlichen Klassen identifiziert werden. Hierunter sind auch 4 Lysozyme einer neuen *D. discoideum* spezifischen Klasse (Müller et al., 2005). Diese Lysozyme weisen N-terminal ein ER-Signalpeptid auf, gefolgt von einer katalytischen Domäne und einer Prodomäne. Dieser Aufbau ist typisch für lysosomale Enzyme (siehe Kapitel 1.4). GFP markiertes AlyA zeigt eine Lokalisation in Phagosomen (siehe Abb. 8E). Hiermit konnte erstmalig in *D. discoideum* der Transport eines Lysozyms aus primären Lysosomen in das Phagosom sichtbar gemacht werden. Weiterhin lokalisiert AlyA-GFP auf kleinen vesikulären Strukturen in der Zelle. Ein zweites Fusionsprotein mit einem myc-Epitop lokalisiert in den gleichen Vesikeln (siehe Abb. 8A). Rescue-Mutanten beider Fusionsproteine zeigen, dass es sich hierbei um funktionelle Proteine handelt. So konnte der Phänotyp der alyA138 Knockout-Mutante durch das Einbringen beider modifizierten Proteine gerettet werden (siehe Abb. 9). In Immunfluoreszenzuntersuchungen mit Antikörpern gegen alle bekannten Sets lysosomaler Enzyme konnten die AlyA-GFP markierten Vesikel nicht angefärbt werden (siehe Abb. 9B-D). Es handelt sich also um ein neues, viertes Set von Vesikeln mit lysosomalen Enzymen.

3.2 *Die fehlerhafte Expression zweier lysosomaler Enzyme führt zu einer erhöhten Partikelinternalisierung*

AlyA Knockout-Mutanten wurde von mir bereits während meiner Diplomarbeit hergestellt und deren Phänotyp analysiert (Müller, 2002). Die Effizienz richtiger Knockout-Mutanten lag während meiner Diplomarbeit bei etwa 1:700. Während meiner Dissertation konnten keine weiteren AlyA defizienten Stämme erzeugt

werden, weder mit dem Konstrukt aus meiner Diplomarbeit (Müller, 2002), noch mit einem Konstrukt, welches die Sequenz für eine Glu11(UAA)tRNA beinhaltet. Diese tRNA kann komplementär an die häufigste Stopp Sequenz (UAA) in *D. discoideum* binden und anstelle eines Stopps ein Glutamin in das Protein einbauen. Mutanten, die diese tRNA exprimieren, sind letal. Bei homologer Rekombination wird das Gen dieser tRNA nicht mit in das Genom inseriert. Es kann daher als negativer, selektiver Marker für richtige Knockout-Mutanten dienen (Morrison et al., 1997). Die Gene von *alyA-C* liegen innerhalb von 4,5 kb auf Chromosom 2, so dass mit einem Konstrukt, welches diesen gesamten Bereich überspannt, unterbrochen durch eine *Bs*^I-Kassette, in einem Schritt ein Knockout erzeugt werden könnte, der alle drei Gene betrifft (vergleiche (Hata et al., 2001). Auch dies war nicht erfolgreich. Die Selektivität konnte auch in diesem Ansatz nicht mittels der beschriebenen Supressor-tRNA erhöht werden.

Die beiden unabhängigen *AlyA* Null Mutanten zeigten zuerst eine verringerte Lysozymaktivität einhergehend mit verkleinerten Plaquedurchmessern auf Bakterienrasen. Dieser Phänotyp war jedoch nicht stabil. Über einen Zeitraum von wenigen Wochen zeigte die *alyA138* Knockout-Mutante in aufeinanderfolgenden Messungen einen Anstieg in der Größe der Plaquedurchmesser, bis schließlich konstante Plaquegrößen erreicht wurden, die ungefähr doppelt so groß wie die des Wildtyps waren. Parallel zu den vergrößerten Plaquedurchmessern der *alyA138* Knockout Zellen konnte ebenfalls eine erhöhte Phagocytoserate festgestellt werden (Müller et al., 2005). Eine zweite Knockout-Mutante, *alyA74*, verhielt sich ähnlich und zeigte ebenfalls eine Reversion des verringerten Wachstums auf Bakterienrasen, jedoch nur bis auf Wildtyp Niveau. Diese Mutanten zeigten keine Veränderung bei der Partikelinternalisierung gegenüber dem Wildtyp (Müller, 2002). Rescue-Mutanten der *alyA138* Knockout-Mutante beweisen, dass der Phänotyp der vergrößerten Plaques und die erhöhte Phagocytoserate, tatsächlich durch das Fehlen von *AlyA* bedingt ist. Bereits bei einer geringfügig erhöhten Lysozymaktivität im Vergleich zum Knockout zeigen Rescue Mutanten, aller eingebrachten Konstrukte, wieder ein wildtypisches Verhalten (siehe Abb. 9).

In den *alyA138* Knockout-Mutanten wurde eine erhöhte Gp70-Expression gefunden. Die alleinige Überexpression von Gp70, einer lysosomalen Esterase, führt ebenfalls zu einer erhöhten Phagocytoserate und vergrößerten

Plaquedurchmessern auf Bakterienrasen. Beide Stämme verhalten sich tendenziell gleich, wobei die alyA138 Knockout-Mutante einen deutlich stärkeren Defekt aufzeigt. Die Phagocytoserate ist in diesem Stamm auf 160% des Wildtyps erhöht, während der Gp70 Überexprimierer eine um 40% erhöhte Phagocytoserate aufweist (siehe Abb. 6B). Auch das Wachstumsverhalten auf Bakterienrasen ist unterschiedlich. So zeigen Gp70 überexprimierende-Stämme in unseren Experimenten keinen Defekt (siehe Abb. 6C), während bei Yuan et al. (2000) vergrößerte Plaques allerdings erst nach 8 Tagen des Wachstums festgestellt werden konnten. Die Ergebnisse der beiden Mutanten lassen darauf schließen, dass eine Signalkaskade ausgehend von der Degradation von Bakterien hin zu einer verstärkten Partikelinternalisierung besteht. Diese scheint über Expressionslevel von AlyA und Gp70 gesteuert zu werden. Hierbei liegt Gp70 hinter AlyA in dieser gemeinsame Signalkaskade, da das Protein in der alyA138 Knockout-Mutanten verstärkt exprimiert wird (siehe Abb.10). Gp70 dagegen hat keine regulatorische Funktion gegenüber AlyA. Die Lysozymaktivität in den Gp70 Überexprimierern ist unverändert (siehe Abb. 6D).

Die oben beschriebenen Unterschiede im Phänotyp der beiden Mutanten weisen darauf hin, dass ausgehend von AlyA parallele Regulationsmechanismen existieren, die nicht über Gp70 gesteuert werden.

3.3 Microarray-Analysen zur Identifikation weiterer Proteine der Signalkaskade

Microarray-Analysen können zur Beantwortung vieler Fragestellungen durchgeführt werden. Hierbei wird ein Expressionsprofil vieler tausenden bis hin zu allen Genen eines Organismus bestimmt. So werden sie z.B. in der Diagnostik verwendet. Verschiedene Tumore können beispielsweise anhand ihres Transkriptionsprofils diagnostiziert werden (Dyrskjot et al., 2003).

Mit Hilfe von Microarray-Analysen konnten bei *D. discoideum* verschiedene Gene detektiert werden, die Zellzyklus spezifisch exprimiert werden (Iranfar et al., 2003; Xu et al., 2004). Andere Analysen untersuchten Gene, die bei Infektionen mit Legionellen unterschiedlich reguliert vorliegen (Farbrother et al., 2006) oder aber auch Gene, die in bestimmten Signalkaskaden involviert sind (Escalante et al., 2004).

Mit Hilfe von cDNA Microarray-Analysen konnten in der alyA138 Knockout-Mutante und im Gp70 Überexprimierer Gene identifiziert werden, welche im Vergleich zum Wildtyp unterschiedlich stark transkribiert werden (siehe Anhang). Hierbei erschienen am interessantesten die 8 in beiden Mutanten vermindert exprimierten Gene/ESTs tipD, SLB350, SSB389, SSE346, SJ758, alp, SSL845 und VSI401 (siehe Tab.1). Das Auffinden eines überlappenden Satzes von Genen in beiden Mutanten lässt vermuten, dass diese Gene tatsächlich eine Funktion in der Signalkaskade haben. Hierbei sollte die Funktion dieser Proteine in der Signalkaskade downstream von Gp70 liegen. Gene die ausschließlich in der alyA138 Knockout-Mutante reguliert vorliegen, wie z.B. das Gen für H5, müssten demnach in der Signalkaskade upstream von Gp70 liegen (siehe Abb. 37).

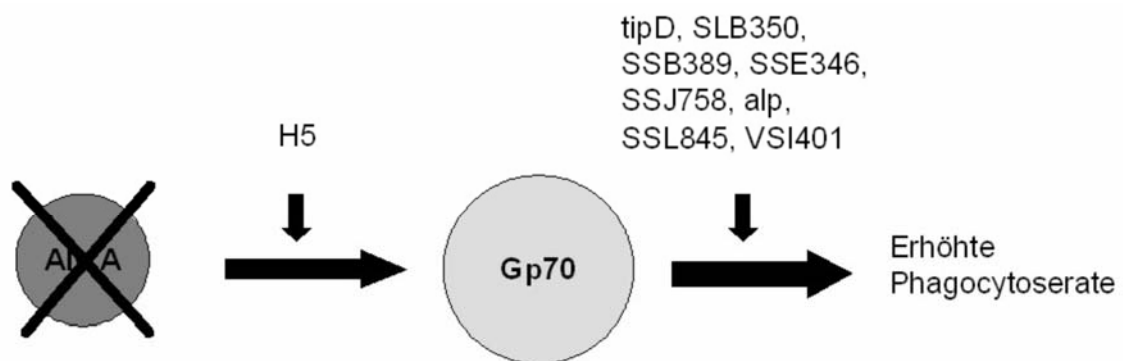


Abb. 37: Schematische Darstellung des Wirkungsortes ausgewählter Proteine der Microarray-Analysen in einer Signalkaskade zwischen AlyA und einer erhöhten Partikelinternalisierung. Proteine, von denen eine verändert Expression laut Microarray Analysen nur in den alyA138 Knockout-Mutanten gefunden wurde, liegen in der vermuteten Signalkaskade vor einer erhöhten Gp70-Expression. Proteine hingegen die in beiden Mutanten als reguliert gefunden wurden, sollten eine Funktion nach der erhöhten Gp70Expression in dem Pathway haben.

3.3.1 Validierung der Ergebnisse der cDNA Microarrays

Vor weiteren aufwendigen Analysen einzelner Gene ist es sinnvoll, dass Ergebnisse von Microarray-Analysen verifiziert werden (Rajeevan et al., 2001). Dies kann über Real-time PCR, eine semiquantitative RT-PCR oder über Northern Blot-Analysen erfolgen. Falsch-positive Ergebnisse können über eine Vielzahl von Problemen zustande kommen (Allison et al., 2006). Durch verschiedene Vorsichtsmaßnahmen wie z.B. der Verwendung unabhängiger RNA Präparationen

aus vegetativen Zellkulturen gleicher Dichte oder mehrfacher Durchführung der Hybridisierungen wurde versucht, diese Fehler möglichst gering zu halten. Laut Microarray-Analysen lag eine verringerte Menge an mRNA von Lysozym in der in der alyA138 Knockout-Mutante vor und eine erhöhte mRNA Konzentration von gp70 in den Gp70 Überexprimierern (siehe Tab.1). Ebenfalls konnte das Expressionsverhalten einiger gefundener Gene mittels Northern Blot verifiziert werden. So konnte für H5 gezeigt werden, dass eine erhöhte Menge mRNA dieses Gen auch nach erneuter RNA Präparation, in den alyA138 Knockout-Mutante vorliegt (siehe Abb. 11). Weiterhin konnte Christian Stolle in seiner Diplomarbeit nachweisen, dass eine verringerte Menge slb350 mRNA in den alyA138 Knockout-Mutanten zu finden ist (Stolle, 2005). Für sse346 und ssj758 konnte bereits im Wildtyp die mRNA dieser Gene weder mittels Northern Blot-Analyse noch über eine RT-Reaktion detektiert werden, so dass eine verringerte Expression in den beiden Ausgangsmutanten nicht nachgewiesen werden konnte. Eine erhöhte Expression von Sse346 in Sse346 Überexprimierern konnte jedoch detektiert werden (siehe Abb. 24). Das Problem lag demnach in der Sensitivität der verwendeten Methoden. Auch wenn die Ergebnisse der Microarray-Analysen für sse346 und ssj758 nicht verifiziert werden konnten, spricht das Verhalten der Knockout-Mutanten beider Proteine für eine Beteiligung in einer Signalkaskade zwischen Endosom und Partikelinternalisierung (s.u.).

3.4 Die Signalkaskade von der Degradation zur Partikelinternalisierung

Entsprechend des in Abbildung 37 gezeigten Modells sollten Mutanten von Proteinen, welche eine Funktion in der Signalkaskade ausgehend von AlyA zu einer erhöhten Partikelinternalisierung haben, ebenfalls einen Defekt in Phagozytose und Plaquedurchmesser zeigen. Hierbei sollte die Rekonstruktion des Expressionslevels, entsprechend dem Expressionsverhalten auf den Microarrays, also ein H5 Überexprimierer und sse346 ebenso wie ssj758 Knockout-Mutanten, einen Phänotyp ähnlich der alyA138 Knockout-Mutanten und dem Gp70 Überexprimierer zeigen (siehe Tab. 5).

Mutante	Gp70 Expression	Phagocytoserate	Plaqua- durchmesser
H5 Überexprimierer	↑	↑	↑
sse346 Knockout- Mutante	↔	↑	↑
Ssj758 Knockout- Mutante	↔	↑	↑

Tab. 5: Erwarteter Phänotyp der einzelnen Mutanten. Ausgehend von den Ergebnissen der Microarray-Analysen sollten die entsprechenden Expressionsmutanten von H5, Sse346 und Ssj758 sich gleich den Ausgangsmutanten verhalten. Die Erwartungen sind in dieser Tabelle durch Pfeile dargestellt. Ein nach oben gerichteter Pfeil bedeutet erhöhte Werte gegenüber Wildtypzellen und ein Doppelpfeil bedeutet einen unveränderten Phänotyp. Die Farbgebung der Pfeile gibt an, ob die Erwartungen erfüllt (grün) oder nicht erfüllt (rot) wurden.

3.4.1 Zwei der drei untersuchten Proteine sind an der Regulation von Partikelinternalisierung und/oder Plaquedurchmesser beteiligt

H5 Überexprimierer verhielten sich wildtypisch (siehe Abb. 16). Es konnten weder eine erhöhte Phagocytoserate, noch größere Plaquedurchmesser oder eine gesteigerte Gp70-Expression in diesen Mutanten gefunden werden. Trotz der veränderten Expression auf den Microarrays scheint H5 keine Funktion in einer Signalkaskade zwischen AlyA und einer erhöhten Gp70-Expression zu erfüllen. Vielmehr scheint es sich hier um eine parallele Regulation, ausgehend von AlyA zu handeln (siehe Abb. 38). Welche Konsequenzen diese hat, kann zum momentanen Zeitpunkt nicht geklärt werden. Es ist bekannt, dass H5 rein vegetativ exprimiert wird (Singleton et al., 1988). Weiterhin wurde für dieses Protein eine Lipase/Esterase/Thioesterase-Domäne vorhergesagt, welche Funktion dieses Protein in den Zellen jedoch übernimmt, ist unklar. Eine Lokalisation des H5 Proteins auf frühen Endosomen, wie es laut Gotthardt et al. (2006) gefunden wurde, konnte mit den entsprechenden GFP-Fusionsproteinen nicht verifiziert werden (siehe Abb. 13).

Sse346 Knockout-Mutanten verhielten sich wie alyA138 Knockout-Mutanten und Gp70 Überexprimierer und zeigten sowohl eine erhöhte Phagocytoserate als auch vergrößerte Plaquedurchmesser auf Bakterienrasen (siehe Abb. 22). Sse346 ist demnach ein Regulator der Phagocytose in *D. discoideum* und scheint an einer Signalübertragung zwischen Gp70 und einer erhöhten Phagocytoserate beteiligt zu sein. Welche genaue Funktion dieses Protein in den Zellen hat, konnte nicht geklärt werden. Das Protein wird über das ER zu kleinen Vesikeln in der Zelle gebracht (siehe Abb.18). Eine Kolokalisation mit Gp70 (siehe Abb. 18C) und lysosomalen Enzymen, die mit den Antikörpern AD7.5 und Common Antigen 1 angefärbt werden können (Daten nicht gezeigt), ist dabei ausgeschlossen. Ob Sse346 mit AlyA lokalisiert konnte nicht geklärt werden. Diese Vesikel könnten möglicherweise zum Phagosom transportiert werden, da Proteine als Interaktionspartner für Sse346 gefunden wurden (siehe Tab. 2), die laut Gotthardt et al. (2006) auf Phagoosomn lokalisieren sollen.

Ssj758 Knockout-Mutanten zeigten vergrößerte Plaquedurchmesser, während die Phagocytoserate wildtypisch ist (siehe Abb. 30). Weiterhin konnte eine verminderte Gp70-Expression detektiert werden (siehe Abb. 33B und C). Gp70 defiziente Mutanten zeigten laut Yuan and Chia (2000) eine verringerte Phagocytoserate und kleinere Plaquedurchmesser. Diese Ergebnisse konnte von mir nicht bestätigt werden. Ebenso wie Gp70 Überexprimierer wurden Gp70 Knockout-Mutanten in dem laboreigenen Wildtypstamm rekonstruiert. Mittels Western Blot Analyse mit einem Gp70 spezifischen monoklonalen Antikörper konnte gezeigt werden, dass dieses Protein in den Zellen nicht mehr exprimiert wurde. Diese Knockout-Mutanten zeigten jedoch weder eine Veränderungen in der Phagocytoserate noch in ihrem Wachstum auf Bakterienrasen. Auch sonst waren diese Mutanten phänotypisch unauffällig (Daten nicht gezeigt). Das die ssj758 Knockout-Mutanten keine Veränderung in der Phagocytose zeigten ist demnach nicht überraschend.

Die Überexpression von Gp70 im ssj758 Knockout-Hintergrund hatte keinen Einfluss auf ihren Phänotyp (siehe Abb. 34). Ssj758 ist folglich essentiell für eine Signalübertragung von einer erhöhten Gp70-Expression zu einer erhöhten Partikelinternalisierung. Es macht demnach für dieses Protein einen Unterschied, ob man zur Rekonstruktion des Phänotyps einen Knockout oder einen Knockdown verwendet. In Knockdown Zellen ist das Protein noch vorhanden und erfüllt seine

Funktion, wenn auch mit geringerer Aktivität. Für weitere Analysen wäre es sinnvoll Knockdowns von Ssj758 z.B. über RNAi (Martens et al., 2002) oder ein „Antisense“ Konstrukt (Nellen et al., 1992) herzustellen. Diese könnten Aufschluss darüber geben, ob bei einer verringerten Expression von Ssj758 die Mutanten einen Phänotyp ähnlich der beiden Ausgangsmuten haben oder ob Ssj758 nur eine Funktion beim Wachstum auf Bakterierasen zuzuschreiben ist. Ebenfalls wäre dann zu überprüfen, ob eine verringerten Ssj758 Expression immer noch einen Einfluss auf die Expression von Gp70 ausübt, oder ob diese Reaktion allein durch das Fehlen von Ssj758 hervorgerufen wird.

Zwei der drei untersuchten Proteine verhielten sich demnach wie erwartet. Allerdings sprechen die Ergebnisse für eine geteilte Signalkaskade ausgehend von der Überexpression von Gp70. Der eine Zweig, über Sse346, führt zu einer erhöhten Phagocytoserate und damit einhergehend zu vergrößerten Plaquedurchmessern, während der andere über Ssj758 ausschließlich vergrößerte Plaquedurchmesser erzeugt (siehe Abb. 38). Dies deutete sich bereits bei der Untersuchung von Gp70 Überexprimierern an. Hier ist der Phänotyp einer erhöhten Phagocytoserate deutlicher ausgeprägt, als der Phänotyp der vergrößerten Plaquedurchmesser. Eine Verbindung zwischen beiden Zweigen muss dennoch bestehen, da Ssj758 für eine erhöhte Phagocytoserate in Gp70 überexprimierenden Mutanten essentiell ist.

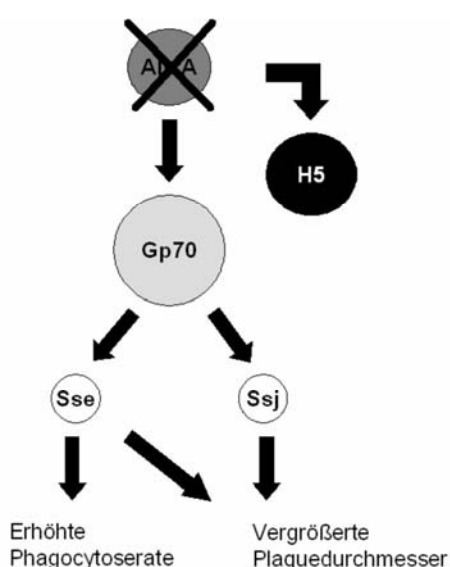


Abb. 38: Modell der Signalkaskade.

Das Ausschalten von AlyA führt auf unabhängigen Wegen zu einer erhöhten H5- und Gp70-Expression. Die Funktion einer erhöhten H5-Expression ist dabei ungeklärt. Nach Gp70 spaltet sich die Signalkaskade auf. Über eine erniedrigte Expression von Sse346 wird eine erhöhte Phagocytose und über eine reduzierte Menge von Ssj758 vergrößerte Plaquedurchmesser reguliert.

3.4.2 Die Diskrepanz zwischen Phagocytoserate und Plaquedurchmesser in den Ssj758 Mutanten

Viele Mutanten, die eine erhöhte Phagocytoserate aufweisen zeigen ebenfalls größere Plaquedurchmesser beim Wachstum auf Bakterienrasen. Ein unterschiedliches Verhalten in Phagocytoserate und Plaquedurchmesser konnte erst für eine einzige Mutante festgestellt werden. RasS defiziente Mutanten zeigen eine verringerte Phagocytoserate jedoch einen vergrößerten Plaquedurchmesser (Chubb et al., 2000). Dieser Defekt kann durch eine erhöhte Zellmigration erklärt werden. Die Morphologie der Plaques ist bei diesen Mutanten verändert. Die Fresshöfe erscheinen milchig, da nicht alle Bakterien phagocytiert werden, sondern die Zellen einfach über sie hinweg laufen. Weiterhin zeigen RasS Mutanten eine verringerte Pinocytoserate verbunden mit einem Wachstumsdefekt in axenischem Medium. Das Aktin-Cytoskelett in diesen Zellen liegt ebenfalls morphologisch verändert vor. Es wird vermutet, dass eine schnelle Zellmigration und Endocytose nicht kompatibel sind und RasS dabei die Balance zwischen beiden hält. (Chubb et al., 2000). Für Ssj758 trifft diese Erklärung nicht zu, da zum einen die Fresshöfe der Ssj758 Knockout-Mutanten nicht milchig sind und auch kein Wachstumsdefekt in axenischen Medium festgestellt werden kann.

Eine andere mögliche Erklärung für eine Diskrepanz zwischen Phagocytoserate und Plaquedurchmesser in den ssj758 Knockout-Mutanten (siehe Abb. 30) könnte darin liegen, dass die Zellen früher in den Entwicklungszyklus eintreten. Dies sollte frühzeitig zu Fruchtkörpern in der Mitte der Plaques führen. Diese Zellen würden dann im Fraßrand fehlen und die Plaquedurchmesser wären deshalb kleiner. Bei der Sporenbildung zeigten beide Mutanten keinen Defekt. Die Entwicklung wurde jedoch nicht explizit untersucht. Ein Defekt könnte relativ gering sein, so dass er während der Sporenbildung nicht aufgefallen ist, dieser könnte sich jedoch beim Wachstum auf Bakterienrasen bemerkbar machen.

Andererseits könnte Ssj758 jedoch auch direkt eine Funktion bei der Internalisierung haben. So besitzt Ssj758 drei SH3-Domänen und lokalisiert mit Aktin an der Plasmamembran (siehe Abb.28). SH3-Domänen und deren spezifische Bindung an prolinreiche-Regionen anderer Proteine haben eine wichtige Funktion bei vielen Prozessen (Mayer, 2001), so auch bei der Signaltransduktion zur Internalisierung von Partikeln bei *Dictyostelium discoideum*.

Mögliche Ziele wären beispielsweise Scar/Wasp Proteine, an deren prolinreicher-Region, Profilin oder andere Proteine mit einer SH3-Domäne binden könnten (Rivero and Somesh, 2002). In der Zukunft könnte die Identifikation möglicher Interaktionspartner von Ssj758 weiteren Aufschluss über die Funktion des Proteins geben.

3.4.3 Ungeklärte Phänotypen

Für zwei Mutanten sind Ergebnisse aufgetreten, für die es zum momentanen Zeitpunkt keine Erklärung gibt. Diese sind einerseits eine erhöhte Lysozymaktivität in den Sse346 Überexprimierern (siehe Abb. 21B) und zweitens eine erhöhte Phagozytoserate in den Ssj758 Überexprimierern (siehe Abb. 36B).

Die Expression von Sse346 liegt verringert in Gp70 Überexprimierern und alyA138 Knockout-Mutanten vor. Hierbei sollte Sse346 erst während des Kompensationsprozesses in den alyA138 Knockout-Zellen verringert exprimiert werden. Sse346 Knockout-Mutanten zeigen jedoch eine erhöhte Lysozymaktivität (siehe Abb. 21B). Mit dem Vorgang der Kompensation wird die Lysozymaktivität in dem alyA138 Knockout-Stamm jedoch nicht erhöht (Müller et al., 2005). Sollte Sse346 einen direkten Einfluss auf AlyA (als negativer Regulator) haben, könnte dies in den alyA138 Stämmen nicht detektiert werden. Allerdings sollten Gp70 Überexprimierer ebenfalls eine verstärkte Lysozymaktivität aufweisen. Dies trifft jedoch nicht zu (siehe Abb. 6D). Andererseits wäre es jedoch auch möglich, dass Sse346 indirekt auf Lysozym wirkt. Aufgrund seiner Lokalisation in der ER-Membran bzw. in der Membran von kleinen Vesikeln wäre es denkbar, dass dieses Protein eine Funktion im Transport von Lysozym/lysosomalen Enzymen oder bei der Bildung von Vesikeln mit lysosomalen Enzymen innehaben könnte. Hierbei wäre denkbar, dass sich Sse346 Null-Stämme anders verhalten als solche, die nur eine verringerte Aktivität aufweisen, wie es im Fall der alyA138 Knockout-Mutante oder den Gp70 Überexprimierern der Fall ist.

Für ssj758 wurde eine geringere mRNA-Konzentration in den beiden Ausgangsstämmen mittels Microarray-Analysen gefunden. Knockout-Mutanten zeigen vergrößerte Plaquedurchmesser aber keine erhöhte Phagozytoserate (siehe Abb. 30). Für eine erhöhte Phagozytoserate in Gp70 überexprimierenden-Mutanten ist Ssj758 jedoch essentiell. Die Überexpression von Ssj758 hingegen

führt direkt zu einer erhöhten Phagocytoserate (siehe Abb. 36B). Somit hätte sowohl die Überexpression einen positiven Einfluss auf die Phagocytoserate als auch eine verminderte Expression. Dieses Paradoxon zeigt die Limitation des einfachen Modells (siehe Abb. 38). Um eine Erklärung für dieses Phänomen zu finden sind Analysen anderer an diesem Signalweg beteiligte Gene notwendig. Diese unerwarteten Phänotypen könnten jedoch auch einfach durch die Verwendung zweier Phänotypisch leicht unterschiedlicher AX2 Stämme zu erklären sein (siehe Anmerkung in 1.6), was diesem Unterschied zu Grunde liegt, kann hierzu zum momentanen Zeitpunkt keine nähere Aussage getroffen werden.

3.5 Erfolgt die Expression einiger der in der Signalkaskade involvierten Proteine über Methylierung?

Die Expression von Genen kann über epigenetische Modifikationen, wie z.B. der DNA Methylierung, reguliert werden. DnmA ist eine dnmt2-homologe Methyltransferase in *Dicytostelium discoideum* (Kuhlmann et al., 2005). Für DnmA defiziente Mutanten wurden ebenfalls Microarray-Analysen in Ludwig Eichingers Labor in Köln durchgeführt (Borisova-Todorova, 2006). Hierbei konnte zum Teil eine veränderte Transkription gleicher Gene wie in den alyA138 Knockout-Mutanten und den Gp70 Überexprimierer gefunden werden. Hierzu gehören sieben der acht in beiden Mutanten als verringert transkribiert gefundenen. Diese sind tipD, SSB389, SSE346, SJ758, alp, SSL845 und VSI401 (persönliche Mitteilung von Branimira Borisova). Die Ergebnisse der Microarray-Analysen für sse346 Knockout-Mutanten zeigen (siehe Tab2.), dass es sich hierbei nicht um Gene handelt, die in vielen genetischen Hintergründen misreguliert vorliegen und somit Artefakte darstellen. Ob eine Regulation dieser Gene in den alyA138 Knockout-Mutante und den Gp70 Überexprimierern ebenfalls über diesen epigenetischen Effekt erfolgt, ist nicht geklärt.

Erstaunlicherweise zeigen dnmA Knockout-Mutanten eine um ca. 50% verringerte Phagocytoserate, kleinere Plaques auf Bakterienrasen und eine verringerte Gp70-Expression (Daten nicht gezeigt). Gleiches gilt für Knockdown Mutanten von agnA (Daten nicht gezeigt), einem Protein des siRNA Weges, das ebenfalls an der DNA Methylierung in *D. discoideum* beteiligt ist (Zhang, 2006). Eine verringerte Gp70-

Expression kann nicht als Erklärung für den erhaltenen Phänotyp der *dnmA* und *agnA* Mutanten dienen. Die Überexpression von Gp70 im *dnmA* Knockout Hintergrund führte zu keiner erhöhten Phagocytoserate (Daten nicht gezeigt). Es scheinen demnach andere Proteine in dieser Mutante betroffen zu sein, die eine starke negative Wirkung auf die Phagocytoserate ausüben und somit den positiven Effekt der Gp70 Überexpression in diesen Zellen überdecken. Diese sind nicht bekannt. Gleiches könnte ebenso für anderen Proteine aus den Microarray-Analysen der *dnmA* Knockout-Mutanten zutreffen. So führt das Fehlen von *Sse346* zu einer verbesserten Phagocytoserate (siehe Abb. 22), es konnte aber dennoch in den *dnmA* Knockout-Mutanten als verringert transkribiert gefunden werden.

3.6 Ausblick

In *Dictyostelium discoideum* existieren viele Mutanten, welche einen Phagocytosedefekt aufweisen (Lim et al., 2005; Rupper and Cardelli, 2001; Schreiner et al., 2002). Hierbei ist es nicht ungewöhnlich, dass Mutanten eine verbesserte Phagocytoserate zeigen, wie z.B. im Fall von *RacC* oder *Rap1* Überexprimierern (Seastone et al., 1998; Seastone et al., 1999). Des Weiteren ist in *Dictyostelium discoideum* viel über die Phagocytose und deren Regulation bereits bekannt (siehe Einleitung). Einzelne Proteine, die an diesem Prozess beteiligt sind, wurden über genetische Screens identifiziert, wie z.B. über Mutagenese mittels chemischer Reagenzien (Vogel et al. 1980) oder über REMI (Blanc et al., 2005; Cornillon et al., 2000; Gebbie et al., 2004). Gotthardt et al. (2006) entdeckten über einen proteomischen Screen 179 neue Proteine, die auf Phagosomen von *D. discoideum* lokalisieren. Diese Proteine müssen jedoch nicht notwendigerweise funktionell an dem Prozess der Phagocytose beteiligt sein, wie anhand der Ergebnisse für H5 zu sehen ist. Insbesondere sind die Zusammenhänge zwischen diesen Proteinen unklar. Unser Ansatz hingegen zielt auf eine Kette von Interaktionen.

Mit Gp70 (Müller et al., 2005) und AlyA (Journet et al., 1999) konnten zwei lysosomale Enzyme identifiziert werden, deren fehlerhafte Expression eine erhöhte Phagocytoserate zur Folge hat. Das Fehlen von Cathepsin D, einem

anderen lysosomalen Enzym, führt in *D. discoideum* hingegen zu keinem Defekt. Mittels Microarray-Analysen konnte ich Proteine identifizieren, die an der Regulation der erhöhten Phagozytoserate beteiligt sind. Zwei von drei untersuchten Proteinen zeigten hierbei einen Phänotyp, der dem der beiden Ausgangsmutanten ähnlich war. In den Diplomarbeiten von Christian Stolle und Gleb Konotop (in Vorbereitung) wurden weitere Gene aus der Microarray-Analyse untersucht und ein Teil dieser Gene scheint ebenfalls in der Signalkaskade involviert zu sein. Die Ergebnisse der Microarray-Analysen können jedoch nur als Hinweis auf Proteine dienen, die in dieser Signalkaskade beteiligt sind. Zudem stellen sie einen limitierenden Faktor dar, da nicht alle Proteine, die an einer Signalkaskade beteiligt sind, über ihre Expressionslevel reguliert werden.

Eine gute Ergänzung zu unserem Ansatz, wäre die proteomische Analyse von Phosphorylierungsmustern. Das Auffinden und weitere Charakterisierung solcher Proteine durch Massenspektrometrie, könnten das Verständnis der Signalkaskade vervollständigen.

4 Material

4.1 Geräte

Autoklav	Zirbus, Bad Grund
Binokular	Zeiss, Göttingen
Blot-Kammern	MPI Martinsried
Cell Cracker	EMBL, Heidelberg
Coulter Counter	Beckmann Coulter, Krefeld
Elektrophorese-Kammern	MPI Martinsried
Fluorimeter SFM 25	Katron-Instruments, Eichingen
Gefrierschränke (-20°C)	Liebherr, Ochsenhausen
Gefrierschrank (-70°C)	Heraeus, Osterode
GelDoc II	Biometra, Göttingen
Gelkammern	Metallwerkstatt, Universität Kassel
GenePulser [®]	Bio-Rad, Kanada
Glaswaren	Schott, Mainz
Glaspipetten	Hirschmann, Deutschland
Hamiltonspritze	Hamilton, Schweiz
Heizblock	Werkstatt, MPI Martinsried
Hybridisierungsöfen	Bachofer, Reutlingen
Kühlschränke (4°C)	Liebherr, Ochsenhausen
Küvetten (Quarz)	Hellma, Müllheim
Magnetrührer mit Heizplatte	IKA, Staufen im Breisgau
Mikroskope	
-Lichtmikroskop	Zeiss, Göttingen
-Fluoreszenzmikroskop (invers), DM IRB	Leica, Bensheim
-CLSM, TCS SP2	Leica, Bensheim
Mikrowelle	Daewoo, Korea
Multipette [®]	Eppendorf, Hamburg
Neubauer-Zählkammer	Brand, Wertheim/Main

PCR-Thermocycler PCR-Express	Hybaid, Heidelberg
TGradient	Biometra, Göttingen
pH-Meter 523	WTW
Pipettierhilfen	
-Pipetboy	Integra Bioscience, Fernwald
-Accu Jet	Brand, Wertheim/Main
Pipetten (2 µl; 20 µl; 200 µl; 1000 µl)	Gilson, Frankreich
Phosphoimager	Raytest, Straubenhardt
BAS Kasette	Fuji, Japan
Photometer Ultrospec 3000pro	Amersham Pharmacia, Freiburg
Powersupplies	Amersham Pharmacia, Freiburg
Schüttelinkubatoren Lab Shaker	Werkstatt, MPI Martinsried
Schwenkplatte	Adolf Kühner AG, Schweiz
Speed Vac Concentrator	B. Braun, Melsungen
Sterilbänke	Eppendorf, Hamburg
Thermo-Mixer	Holten, Dänemark
Vortex Genie	Eppendorf, Hamburg
Waagen	Bender & Hohbein AG, Schweiz
Wasserbad	Sartorius, Göttingen
	B. Braun, Melsungen
Zentrifugen	
Airfuge	Beckmann, Krefeld
-Biofuge 15	Heraeus, Osterode
-Biofuge stratos	Heraeus, Osterode
-Centrifuge 5415 C	Eppendorf, Hamburg
-MiniSpin	Eppendorf, Hamburg
-Rotanta/R	Hettich, Tuttlingen
-Rotina 48R	Hettich, Tuttlingen
-Optima LX 100	B. Braun, Melsungen

4.2 Verbrauchsmaterialien

Costar-Platten (24-Loch)	Sarstedt, Nümbrecht
Deckgläschen (50 mm x 50 mm)	Assistent
1,5 ml und 2 ml Plastikkuvetten	Greiner Labortechnik
Einmalhandschuhe	
-Nitril	Ansell, Belgien
-Latex	Servoprax GmbH, Wesel
Einwegtücher	Kimberly-Clark, England
Einwegspritzen	B. Braun, Melsungen
Elektroporationskuvetten	PeqLab, Erlangen
Falconröhrchen (15 ml; 50 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Filterpapier 3MM	Whatman, Göttingen
Injektionsnadeln	B.Braun AG, Melsungen
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
Sterilfilter (0,45µm)	Sarstedt, Nümbrecht
Skalpelle	C. Bruno Bayha GmbH, Tuttlingen
Transfermembranen	
-Nylon ROTI-Nylon® plus	Roth, Karlsruhe
QIABRANE Nylon uncharged	Qiagen, Hamburg

4.3 Reagenzien

Die aufgeführten Chemikalien haben, soweit nicht anders angegeben, den Reinheitsgrad p.a.

Agarose Standard	Eurobio
APS	Roth, Karlsruhe
Bacto–Agar	Difco
Bacto-Trypton	Difco
BCIP	Roth, Karlsruhe
Benzamidin	Fluka, Buchs
Blasticidin S	ICN, Eschwege
Borsäure	Roth, Karlsruhe
Brillant-Blau R 250	Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
Dinatriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4)	Roth, Karlsruhe
Dithiotreit (DTT)	Roth, Karlsruhe
EDTA	Roth, Karlsruhe
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
Fischgelantine	Amersham Life Science, Freiburg
Ficoll 400	Serva, Heidelberg
Gelvatol Typ II	Sigma, Dreisenhofen
Geneticin (G418) [100 mg/ml]	ICN, Eschwege
Glucose	Roth, Karlsruhe
Glycerin	Roth, Karlsruhe
Glycin	Roth, Karlsruhe
Guanidiumthiocyanat	Roth, Karlsruhe
Hefeextrakt	Oxoid, England
HEPES	Roth, Karlsruhe
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
Kaliumacetat (KAc)	Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid (KCl)	Roth, Karlsruhe

Kaliumhydrogenphosphat (KH_2PO_4)	Roth, Karlsruhe
Lithiumchlorid (LiCl)	Roth, Karlsruhe
Magnesiumchlorid (MgCl_2)	Roth, Karlsruhe
Magnesiumsulfat (MgSO_4)	Roth, Karlsruhe
β -Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe
Methanol	Roth, Karlsruhe
Micrococcus lysodeiticus	Sigma, Steinheim
Milchpulver (blotting grade)	Roth, Karlsruhe
MOPS	Roth, Karlsruhe
Natriumacetat (NaAc)	Roth, Karlsruhe
Natriumcarbonat (NaCO_3)	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid (NaCl)	Roth, Karlsruhe
Natriumcitrat	Roth, Karlsruhe
N-Laurylsarcosin	USB, USA
Natriumdihydrogenphosphat (NaH_2PO_4)	Roth, Karlsruhe
Dinatriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4)	Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxidplättchen (NaOH)	Roth, Karlsruhe
NBT	Roth, Karlsruhe
NP-40	Roth, Karlsruhe
Phenol/Chloroform	Roth, Karlsruhe
Polyethylenglycol (PEG) 8000	Fluka, Deisenhofen
Penicillin/Streptomycin [10.000 U/ml]	Gibco BRL, Eggenstein
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt
PCIA	Roth, Karlsruhe
Pepton aus Casein	Merck, Darmstadt
PIPIES	Roth, Karlsruhe
Pikrinsäure	Merck, Darmstadt
Proteose-Pepton	Oxoid, England
Rotiphorese [®] Gel 30 (30 %ige Acrylamid-Stammlösung)	Roth, Karlsruhe
Saccharose	Roth, Karlsruhe
Salzsäure (HCl)	Merck, Darmstadt
SDS	Roth, Karlsruhe
Sephadex G50	Amersham Pharmacia, Freiburg

Stickstoff (flüssig)	Messer Griesheim, Krefeld
TEMED	Roth, Karlsruhe
Tri-Natrium-Citrat-Dihydrat	Roth, Karlsruhe
Tris	Roth, Karlsruhe
Trypanblau	Merck, Darmstadt
Tween [®] 20	Roth, Karlsruhe

Radioaktives Material

α - ³² P dATP (110 TBq/mmol)	Hartmann Analytic, Braunschweig
--	---------------------------------

4.4 Puffer und Lösungen

Alle hier genannten Puffer und Lösungen wurden mit sterilem bidest. H₂O angesetzt.

Blockierlösung	2 % [w/v] in 1 x PBS lösen, Spatelspitze NaN ₃ zugeben	Milchpulver lösen, optional eine eine
Carbonatpuffer (pH 10,5) (BCIP Substratpuffer)	100 mM	Na ₂ CO ₃
Coomassie-Färbelösung	45 % [v/v] 10 % [w/v] 0,5 % [w/v]	Ethanol Essigsäure Brillant Blau R-250
DNA-Auftragspuffer Fermentas	6x DNA BlueRun™ der Firma MBI	
Denhardt-Lösung (100 x)	2% [w/v] 2% [w/v] 2% [w/v] sterilfiltrieren, bei -20°C lagern	Ficoll 400 Polyvinylpyrrolidon BSA
DTT-HEPES-Puffer	10 mM 1 mM	HEPES, pH 8,0 DTT
EP-Puffer	10 mM 50 mM H ₂ O ad 1 l	Na ₂ HPO ₄ Saccharose
Ethidiumbromid-Lösung	10 mg/10 ml	

Homogenisationspuffer (1,5x)	30 mM 2 mM 4 mM 2 mM 5 mM 30 % 1/100 Volumen	Tris-HCl DTT EGTA EDTA Benzamidin Saccharose 50 mM PMSF
	1/3 Soerensen Phosphat Puffer	
HBS (2x)	4,0 g 0,18 g 0,05 g 2,5 g 0,5 g ad 250 ml, pH 7,05, sterilfiltrieren	NaCl KCl NaH ₂ PO ₄ HEPES Glucose
Hybridisierungslösung	50% 5 x 1% [w/v] 5 x 120 mM	Formamid SSC SDS 100 x Denhardt-Lösung KPi
KPi (pH 6,5)	56,6 ml 43,5 ml	1M KH ₂ PO ₄ 1M K ₂ HPO ₄
Kernlysepuffer	50 mM 40 mM 20 mM 5%[w/v] 14 mM	HEPES MgCl ₂ KCl Saccharose β-Mercaptoethanol
Lämmli-Puffer (10 x)	0,25gM 0,76 g 3,3 ml 1,67 ml 0,83 mg	Tris SDS Glycerin β-Mercaptoethanol Bromphenolblau
Lösung I (für Plasmidpräparation)	50 mM 10 mM 100 µg/ml	Tris-HCl, pH 7,4 EDTA RNase A
Lösung II (für Plasmidpräparation)	200 mM 1 mM	NaOH SDS

Lösung III (für Plasmidpräparation) (pH 4,6)	3 M	NaAc
LyB-Puffer	10mM 50mM 2,5mM 0,45 % 0,45 %	Tris-HCl; pH 8,3 KCl MgCL ₂ NP40 Tween
Natriumacetat-Puffer (pH 4,5)	10 mM	Natriumacetat
Natriumphosphat-Puffer (pH 4,5)	100 mM	NaH ₂ PO ₄
PBG	0,5 % 0,045 %	BSA Fischgelatine
10 x PBS-Puffer (pH 7,4)	160,1 g 15,3 g 4,02 g 3,82 g H ₂ O ad 1 l	NaCl Na ₂ HPO ₄ (2 H ₂ O) KCl KH ₂ PO ₄
PBS/Glycin	100mM In 1x PBS-Puffer lösen	Glycin
Protein-Laufpuffer (10 x)	0,25 M 1,9 M 1 % [w/v] H ₂ O ad 1 l	Tris Glycin SDS
Puffer 6.6.2	6 mM 6 mM 0,2 mM	NaCl Tris-HCl pH 7,4 EDTA pH 7,2
SDS-Lysis-Puffer	0,7% [w/w] In TE-Puffer aufgenommen	SDS
SDS-Sammelgelpuffer (pH 6,8) (4xTris-HCl/SDS-Puffer)	0,5 M 14 mM	Tris SDS
SDS-Trenngel-Puffer (pH 8,8) (4xTris-HCl/SDS)	1,5 M 14 mM	Tris SDS
Semidry-Transferpuffer (pH 8,2 - 8,4)	48 mM 39 mM 0,04 % [w/v] 20 % [v/v] H ₂ O ad 1 l	Tris Glycin SDS Methanol

Soerensen-Phosphatpuffer (pH 6,0) (Malchow et al., 1972)	2 mM 15 mM	Na ₂ HPO ₄ KH ₂ PO ₄
Solution D (incomplete)	4 M 25 mM 0,5 %	GTC Na- Citrat Sarcosyl
	Für die Solution D complete werden zu 50 ml dieser Lösung 360 µl β-Mercaptoethanol zugefügt.	
SSC (20 x)	3 M 0,3 M	NaCl Na-Citrat
TBE-Puffer (10x)	1 M 0,83 M 10 mM	Tris-HCl, pH 8,3 Borsäure EDTA
TE-Puffer (pH 8,0)	10 mM 1 mM	Tris-HCl, pH 8,0 EDTA
TfB I-Puffer	100 mM 50 mM 10 mM 30 mM 15% [v/v]	KCl RbCl ₂ CaCl ₂ Kaliumacetat Glycerin
	mit 0,2 M Essigsäure auf pH 5,8 einstellen, sterilfiltrieren	
TfB II-Puffer	10 mM 10 mM 75 mM 15 % [v/v]	MOPS RbCl CaCl ₂ Glycerin
	pH mit NaOH auf 7,0 einstellen, sterilfiltrieren	
Trypanblau	0,087 g 0,058 g 0,02 g	NaCl Citrat Trypanblau
	ad 10 ml H ₂ O, 20 min rühren, einstellen auf pH 4,4 mit einer Lsg. aus gesättigter Zitronensäure, filtrieren durch Papierfilter danach sterilfiltrieren	
Waschpuffer I (Northern Blot)	2 x 0,1% [w/v]	SSC SDS
Waschpuffer II (Northern Blot)	0,2 x 0,1% [w/v]	SSC SDS

4.5 Medien

Sofern nicht anders angegeben, werden alle Medien mit deionisiertem H₂O angesetzt und bei 120°C autoklaviert; nach dem Abkühlen auf ca. 50°C werden gegebenenfalls Antibiotika hinzugefügt. Die Lagerung erfolgte bei 4°C.

4.5.1 *Escherichia coli*-Medien

LB-Medium (pH 7,0)	10 g 5 g 5 g H ₂ O ad 1 l	Bacto-Trypton Hefeextrakt NaCl
LB_{Amp}-Medium	wie LB-Medium + 50 µg/ml Ampicillin	
LB-Agar	wie LB-Medium +13 g Agar-Agar	
LB_{Amp}-Agar	wie LB-Agar + 50 µg/ml Ampicillin	
M9-Medium (Minimalmedium)	850 ml 100 ml 2 ml 10 ml 0,1 ml 1 ml H ₂ O ad 1 l. Alle Lösungen mit Ausnahmen von Glucose und Thiamin (stattdessen sterilfiltriert) zuvor autoklaviert.	H ₂ O 10 x M9-Salze (s.u.) 1 M MgSO ₄ 20 % [w/v] Glucose 1 M CaCl ₂ 1 % [w/v] Thiamin
10 x M9-Salze (pH 7,4)	60 g 30 g 5 g 10 g H ₂ O ad 1 l, autoklavieren	Na ₂ HPO ₄ KH ₂ PO ₄ NaCl NH ₄ Cl

4.5.2 *Dictyostelium discoideum*-Medien

AX-Medium (pH 6,7) (Watts and Ashworth, 1970)	2,5 g	Bacto-Trypton
	2,5 g	Pepton aus Casein
	5,0 g	Proteose-Pepton
	5,0 g	Hefeextrakt
	10,0 g	Glucose
	1,2 g	KH ₂ PO ₄
	0,35 g	Na ₂ HPO ₄ (x 2H ₂ O)
	H ₂ O ad 1 l	
G₀-Medium	wie AX-Medium + Penicillin/Streptomycin, auf eine Endkonzentration von [100 U/ml].	
G₁₀-Medium	wie G ₀ -Medium + Genitacin (G418), auf eine Endkonzentration von [10 µg/ml].	
B₁₀-Medium	wie G ₀ -Medium + Blasticidin S, auf eine Endkonzentration von [10 µg/ml].	
KA-Platten	mit <i>Klebsiella aerogenes</i> bewachsene SM- Platte Die Platten werden nach ausplattieren von KA-Suspension auf 30°C inkubiert.	
SM-Agarplatten (pH 6,5) (Singleton et al., 1987)	15 g	Bacto-Agar
	10 g	Pepton
	10 g	Glucose
	1 g	Hefeextrakt
	1 g	MgSO ₄ (x 7 H ₂ O)
	2,2 g	KH ₂ PO ₄
	1 g	K ₂ HPO ₄
	H ₂ O ad 1 l	
	pro Platte werden 20 ml benötigt	
Phosphat-Agarplatten (pH 6,0)	15 g	Bacto-Agar
	mit Soerensen-Phosphatpuffer auf 1 l auffüllen.	

4.6 Enzyme und Kits

Restriktionsenzyme (+ jeweilige Reaktionspuffer)	Hybaid, Freiburg MBI Fermentas, St. Leon-Rot
RNase A	Roth, Karlsruhe
Proteinase K	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Taq-DNA-Polymerase (+ Reaktionspuffer und MgCl ₂)	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Pfu-DNA-Polymerase	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Phusion™ High-Fidelity PCR Kit	Finnzymes
QIAGEN Plasmid Midi Kit (100)	Qiagen, Hamburg
Qiaquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hamburg
Rneasy Mini Kit	Qiagen, Hamburg
BCA Protein Assay Kit	Pierce, Rockford USA
andere Enzyme	MBI Fermentas, St. Leon-Rot

4.7 Längen- und Größenstandards

GeneRuler™ 50 bp DNA Ladder	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder Plus	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder Plus	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Prestained Protein Molecular Weight Marker	MBI Fermentas, St. Leon-Rot

4.8 Plasmide

Name (Nummer)	Herstellung/Herkunft	Verwendungszweck
pDEX-RH Lys (#341)	AlyA wurde aus dem Plasmid #316 über EcoRI und HindIII ausgeschnitten und über die gleichen Schnittstellen in den Vektor #1 einkloniert.	Expressionsvektor für unmodifiziertes AlyA
pDEX-RH Lys myc (#342)	Das myc- Epitop wurde aus dem Vektor pIC myc über SmaI und Accl ausgeschnitten und gebluntet und in die HincII Site des Vektors #341 in AlyA einkloniert.	Expressionsvektor für myc-getaggttes AlyA

pDEX-RH sense Kristallprotein (#344)	C. Bomblies	Expressionsvektor für GP70
pUC 19 sense Kristallprotein (#345)	C. Bomblies	Für weitere Klonierungen
Pluescript II Ks (-) mit SSE 346 (#396)	Vektor für den EST Klon SSE346 cDNA Projekt Japan (Urushihara et al., 2004)	Vektor mit dem EST Klon SSE 346, für weitere Klonierungen
Pluescript II Ks (-) mit SSE 346 floxed Bs ^r (#400)	Die gefloخته Bs ^r - Kasette wurde aus dem Vektor # 393 über PstI und SmaI ausgeschnitten und in die sse 346 Sequenz über SpeI (gebluntet) und NsiI einkloniert	Knockout Vektor für sse 346
#48 Sse 346 (#405)	Das Gen wurde über PCR mit den #127 und #128 amplifiziert, BglII und BamHI verdaut und über die gleichen Schnittstellen in den Vektor # 48 einkloniert.	Expressionsvektor für SSE 346 GFP
#68 Sse 346 (#461)	Sse 346 wurde über PCR mittels den Primern #128 und #153 amplifiziert und über BglII und XhoI in den Vektor #68 kloniert	Expressionsvektor für GFP Sse 346
#68 Sse 346 myc (#462)	Das myc- Epitop wurde über Ecl136I aus dem Vektor pICmyc (#296) ausgeschnitten und in die EcoRI Schnittstelle (gebluntet) von Sse 346 im Vektor #461 einkloniert	Zwischenklonierung
#48 Sse 346 myc (#464)	Über PCR mit den Primern #127 und #128 wurde Sse 346 myc aus dem Vektor #462 amplifiziert, und 5' BglII und 3' blunt in den Vektor #48 BglII und BamHI (gebluntet) einkloniert	Expressionsvektor für Sse 346 myc, da sich am Ende des Sse 346 Gens ein Stop Codon befindet wird das GFP nicht mehr exprimiert.
#48 Sse 346 w/o GFP	Das Gen Sse 346 wurde mittels PCR und den Primern #128 neu und #158 vom Vektor #461 amplifiziert und über BglII und XhoI in den Vektor #48 kloniert. Dabei wird das GFP aus dem Vektor #48 ausgeschnitten.	Expressionsvektor für ungetagtes Sse 346
#48 Ssj 758 (#401)	Das Gen Ssj 758 wurde über PCR mit den Primern #129+ #130 amplifiziert, BglII und BamHI verdaut und über die gleichen	Expressionvektor für Ssj 758 GFP

	Schnittstellen in den Vektor #48 inkloniert	
#68 Ssj 758 (#406)	Das Gen Ssj 758 wurde über PCR mit den #130 und #157 amplifiziert, BamHI und XhoI verdaut und über die gleichen Schnittstellen in den Vektor #48 inkloniert	Expressionsvektor für GFP Ssj 758
#68 Ssj 758 floxed Bs ^r (#407)	Die gefloxed Bs ^r –Kassette wurde über SmaI aus dem Vektor #393 ausgeschnitten und über EcoRI (gebluntet) mittig in das Ssj 758 Gen inkloniert	Knockout Vektor für Ssj 758 Es ist dabei darauf zu achten, dass zwei Vektoren unter der gleichen Nummer existieren, da blunt inkloniert wurde und der open reading frame der Bs ^r – in den beiden Vektoren unterschiedlich ist.
pME H5 (#456)	Vektor mit dem EST Klon H5 cDNA Projekt Japan (Urushihara et al., 2004)	Für weitere Klonierungen
pME H5 floxed Bs ^r (#456)	Die gefloxed Bs ^r - Kassette wurde über SmaI aus dem Vektor #393 ausgeschnitten und in die Bst1107I Schnittstelle in der H5 Sequenz des Vektors #456 blunt inkloniert	Knockout Vektor für H5
#48 H5 (#458)	Das Gen H5 wurde mittels PCR mit den Primern #154 und H5 3' BglII amplifiziert und BglII verdaut und in den Vektor #48 über die BglII Schnittstelle inkloniert	Expressionsvektor für H5 GFP
#68 H5 (#459)	H5 wurde über BamHI und XhoI aus dem Vektor #456 ausgeschnitten und über die gleichen Schnittstellen in den Vektor #68 inkloniert.	H5 ist in diesem Vektor nicht in frame mit dem GFP
#68 H5 religiert (#460)	Der Vektor #459 wurde BamHI verdaut und religiert, anschließend wurde partiell mit HincII verdaut und wiederum religiert	Expressionsvektor für GFP H5
pDEX H5 (#475)	H5 mit EcoRI und XbaI aus Plasmid #465 ausgeschnitten und über die gleichen Schnittstellen in Plasmid #362 inkloniert	Expressionsvektor für ungetaggttes H5
pIC myc Ssj	Das ssj Gen wurde mittels den Primern #130 und #157 amplifiziert und blunt/XhoI in den Vektor pIC myc HincII/Xho I kloniert	Für weitere Klonierung

#151 myc Ssj	myc-ssj wurde über BamHI und XhoI aus dem Vektor pIC myc Ssj ausgeschnitten und über die gleichen Schnittstellen in den Vektor #151 inkloniert.	Expressionsvektor für myc-Ssj 758
--------------	---	-----------------------------------

4.9 Oligonukleotide

#57 bsr-G1	CGCTACTTCTACTAATTCTAGA
#62 Lysl for	GTGGTGCTCTCTATTTTCACAGC
#63 Lysl rev	CTTGTTCAACCCACATGGCTGG
#114 sse346 for	ACCATCGCAATTGCAACCCC
#127 sse346 3'	CCCGGATCCTGAACAAATTGAATTATTATTAATT GTAAAATCTAAACA
#128 sse346 5'	GCGAGATCTATGTTATTTAAAAATTTTAATTATTTAT TTCATTTTTTTTAAAT
#129 ssj758 3'	GGCGGATCCATTTATATTATATCTTTGTTTGATTTC TTGTAATTCC
#130 ssj758 5'	CGCAGATCTATGATAGCAAGTTATTTTGAA GTAGTCG
#153 sse 3' mit Stop	CCGCTCGAGGTAATTGAAACTGGA ACTCTCAATGC
#154 H5 5'+BglII	CGGAGATCTAAAAAGAATGGATCCAGAATCA TTTGG
#155 H5 3'+EcoRI	GCGGAATTCGTATTAATAATGAATGGAGAACTGG
#157 3'ssj mit Stop	GCCCTCGAGTTAATTTATATTATATCTTTGTTTGA TTTC TTGTAATTCC
#158 3'cDNA sse	CCGCTCGAGTTAACAAATTGAATTATTATTATTTGT AAAATCTAAAC
#167 3'ssj down	GATTTACAGTTAATGATGGAAGG
#173 H5 3'Pst	GCCCTGCAGATAAAGTAATTTTAATAAAGTTTTATT ATTTTCATTAATAATTG
#174 H5 KO	GTTAAAATTATTAGAAAAAATTGCTTATAATAAAGG
#195 H5 3' BglII	GCCAGATCTATAAAGTAATTTTAATAAAGTTTTATT ATTATTTTCATTAATAATTG
Bsr- T 3' 60 (#383 Genetik)	CAGTACATTTTGAATGGTGAAG

4.10 Antikörper

Monoklonale Primär-Antikörper

Die monoklonalen Antikörper sind in Kulturüberständen der entsprechenden Hybridomazellen enthalten.

α -Aktin (Simpson et al., 1984)

mAB Act-1-11

AD 7.5 (Souza et al., 1997)	mAB AD 7.5
α -Centrosom (Graf et al., 2000)	mAB 2/165
Common Ag1 (Neuhaus et al., 1998)	mAB 221-342-5
α -Coronin (Maniak et al., 1995)	mAB 176-3D-6
α -Gp70 (Bomblies et al., 1990)	mAB 130-80-2
α -Porin (Troll et al., 1992)	mAB 70-100-1
α -PDI (Monnat et al., 1997)	mAB 221-135-1
α -GFP	mAB 264-449-2
	erhältlich bei Chemicon, USA
α -myc	mAB 9E10

Polyklonale Primär-Antikörper

α -myc der Firma Delta Biolabs

Sekundäre Antikörper

Kaninchen-anti-Maus IgG

konjugiert mit Alkalischer Phosphatase Dianova, Hamburg

Ziege-anti-Maus IgG

konjugiert mit CY3 Novagen, USA

Ziege-anti-Maus IgG

konjugiert mit Oregon Green Molecular Probes, Leiden

Ziege-anti-Kaninchen IgG

konjugiert mit CY3 Dianova Hamburg

4.11 Fluoreszenzfarbstoffe

DAPI (4,6-Diamidino-2-phenylindol) Sigma, Dreisenhofen

TRITC (Tetramethylrhodamin Isothiocyanat) Sigma, Dreisenhofen

FITC (Fluorescein Isothiocyanat) Sigma, Dreisenhofen

4.12 Online-Programme

<http://www.csm.biol.tsukuba.ac.jp/cDNAproject.html>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>

<http://www.dictybase.org/>

<http://smart.embl-heidelberg.de/>

<http://psort.hgc.jp>

<http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED>

4.13 Biologische Stämme

Bakterien Stämme: *Escherichia coli* JM105
 Escherichia coli JM109
 Escherichia coli DH5 α
 Klebsiella aerogenes
 Escherichia coli B/r
 GFP-exprimierende *Escherichia coli*

Hefe-Zellen: cat. # Ysc-2, sigma

Dictyostelium Stämme: AX2 (Watts and Ashworth, 1970)

5 Methoden

Ausgeschlossen der Punkte 5.1.3.3, 5.1.4, 5.4.4, 5.4.5, 5.6 und 5.7.2 wurde das Kapitel Methoden aus meiner Diplomarbeit übernommen.

5.1 Molekularbiologische Methoden

5.1.1 Präparation von Nukleinsäuren

5.1.1.1 Minipräparation von Plasmid-DNA aus *E. coli*

(Birnboim and Doly, 1979)

1,5 ml LB_{Amp^r} Medium wird mit entsprechenden Bakterien angeimpft und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Morgen werden die Zellen für 4 min bei 4000 rpm abzentrifugiert. Das Medium wird dann vollständig abgenommen und das Zellpellet in 200 µl Lösung I resuspendiert. Nach Zugabe von 200 µl Lösung II und vorsichtigem Mischen wird für fünf Minuten bei RT inkubiert, um die Zellen möglichst vollständig zu lysieren. Es folgt eine Zugabe von 200 µl Lösung III und nach erneutem vorsichtigem Mischen eine fünfminütige Inkubation auf Eis, wodurch sowohl Proteine als auch genomische DNA ausgefällt werden. Nun wird bei 14.000 rpm 10 min bei Raumtemperatur (RT) zentrifugiert. Der Überstand wird in ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, mit 0,7 Volumen Isopropanol bei RT gefällt und für 30 min bei 14.000 rpm zentrifugiert. Das Isopropanol wird abgenommen und die DNA mit 1 ml 70% Ethanol gewaschen. Anschließend wird das Pellet wenige Minuten in der Speed Vac getrocknet und in 50 µl bidest H₂O oder TE- Puffer aufgenommen.

5.1.1.2 Midipräparation von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Zur Gewinnung größerer Mengen Plasmid- DNA in reiner Form wird das QIAGEN Plasmid- Midi- Kit der Firma Qiagen verwendet. Die Präparation erfolgt dabei nach Herstellervorschriften unter Verwendung der mitgelieferten Lösungen.

Bei dieser Art der Präparation wird die DNA zusätzlich über eine Anionenaustauscher-Säule gereinigt. Aus einer 30 ml Bakterienkultur können so ca. 100 µg Plasmid-DNA gewonnen werden. Die Ausbeute der Präparation wird entweder mittels Agarose- Gelelektrophorese (Kap. 5.1.4) abgeschätzt oder aber photometrisch bestimmt (Kap. 5.1.1.5).

5.1.1.3 Minipräparation chromosomaler DNA aus *D. discoideum*

(Charette and Cosson, 2004)

Diese Methode dient zur schnellen Isolation von genomischer DNA von *D. discoideum* aus einer 24 Well Kostar Platte. Die Zellen werden mit 1 ml Medium abgespült, kurz abzentrifugiert und das Zellpellet wird in 200 µl Soehrensens Phosphat Puffer resuspendiert. 25 µl dieser Zellsuspension werden mit 100 µl LyB-Puffer und 2 µl Proteinase K versetzt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Inaktivierung der Proteinase K wird das Gemisch für 2 min bei 95°C erhitzt. Anschließend können 3-5 µl der DNA-Lösung in eine PCR eingesetzt werden

5.1.1.4 Midipräparation chromosomaler DNA aus *D. discoideum*

Die zu untersuchenden *Dictyostelium* Zellen werden in 10 ml Petrischalen kultiviert (max. 3×10^7 Zellen), das Medium abgenommen, die Zellen mit 10 ml Soerensen-Phosphatpuffer abgespült und durch Zentrifugation bei 1200 rpm für 3 min geerntet. Anschließend werden die Zellen in 1 ml Kernlysepuffer resuspendiert und einige Minuten auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 60 µl 20% NP-40 und guten Durchmischen durch Vortexen erfolgt eine erneute Inkubation für 5 min auf Eis. Der Reaktionsansatz klart dabei auf. Es folgt eine erneute Zentrifugation für 8 min bei 4000 rpm. Das Zellkernpellet wird erneut in 1 ml Kernlysepuffer resuspendiert, abzentrifugiert und schließlich in 200 µl des Puffers 6.6.2 aufgenommen. Nach Zugabe von 7 µl einer 10 %igen SDS Lösung und 20 µl der Proteinase K Lösung erfolgt eine Inkubation für mindestens 2 Stunden oder über Nacht bei 65°C. Hierbei werden die Kerne lysiert und die noch in Lösung befindlichen Proteine zerstört. Die chromosomale DNA wird dann über eine 2-fache PCIA-Fällung aus der Lösung extrahiert. Es folgt eine Isopropanolfällung. Das Pellet wird dann in 30 µl bidest H₂O aufgenommen. Die DNA-Konzentration und -Reinheit wird photometrisch bei 260 bzw. 280 nm bestimmt.

5.1.2 Nukleinsäurefällung und PCIA-Extraktion

5.1.2.1 Ethanolfällung

Die Ethanolfällung ist für RNA und DNA mit einer Kettenlänge von mehr als 8-10 Nukleotiden anwendbar. Nach der Volumenbestimmung wird die wässrige Nukleinsäurelösung mit 1/10 Volumen 8 M LiCl oder 3M NaAcetat und 2 Volumina eiskaltem Ethanol versetzt und für mindestens 10 min bei -70°C inkubiert. Die gefällte Nukleinsäure wird bei 12.000 x g und 4°C 30 min zentrifugiert, mit dem zweifachen Volumen des Gesamtansatzes der Fällung 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in bidest H_2O oder TE- Puffer aufgenommen.

5.1.2.2 Isopropanolfällung

DNA-Moleküle mit einer Größe von über 70 bp werden mit Isopropanol nahezu quantitativ gefällt, während DNA-Fragmente, die kürzer als 30 bp sind, sowie Mononukleotide nicht gefällt werden. Um ein Mitfällen von Salzen zu verhindern, sollte während der Isopropanolfällung nicht gekühlt werden. Nach der Volumenbestimmung werden zur DNA- Lösung 0,1 Volumen 8 M LiCl und 0,6 Volumen Isopropanol (Raumtemperatur) gegeben. Das DNA-Präzipitat wird bei Raumtemperatur abzentrifugiert und, wie bei der Ethanolfällung, gewaschen, getrocknet und in bidest H_2O oder TE- Puffer aufgenommen.

5.1.2.3 PCIA-Extraktion

Um Nukleinsäuren von Proteinen oder organischen Lösungsmitteln zu trennen, wird eine Phenol-Chloroform-Extraktion durchgeführt. Die wässrige Nukleinsäurelösung wird mit dem gleichen Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) versetzt, intensiv gemischt und zur Phasentrennung zentrifugiert (12.000 rpm, Raumtemperatur, 5 min). In der phenolischen Phase befinden sich organische Verunreinigungen, an der Interphase denaturierte Proteine und in der wässrigen Phase die Nukleinsäuren. Diese werden vorsichtig abgenommen und die Extraktion mit PCIA, wenn nötig, wiederholt. Anschließend wird die Nukleinsäure gefällt (s.o.), getrocknet und in bidest H_2O oder TE- Puffer resuspendiert.

5.1.2.4 Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA

Zur Größenauftrennung von DNA Fragmenten werden Agarosegele unterschiedlicher Konzentration (0,7%-1,5% [w/v] Agarose) verwendet. Die Auftrennung kleinerer Fragmente erfolgt dabei in höherprozentigen, die Auftrennung größerer Fragmente in niederprozentigen Gelen. Zur Erstellung der Gele wird die Agarose im entsprechenden Prozentsatz [w/v] in 1x TBE gegeben, mehrmals aufgeköcht und mit 3 µl/100 ml EtBr-Lösung versetzt. Nach dem Abkühlen auf ca. 50°C wird die flüssige Agarose in eine horizontale, zuvor abgedichtete, Gelkammer mit einem Probenkamm gegossen. Nach Erstarren der Agarose wird die Kammer mit 1x TBE-Puffer gefüllt und der Kamm vorsichtig entfernt.

Die aufzutragenden Proben werden mit 1/3 Volumen DNA- Auftragspuffer vermischt und in die Probenaschen pipettiert. Zusätzlich zu den Proben wird ebenfalls ein DNA- Längenstandard aufgetragen. Das Gel wird bei 1-10 V/cm Gel für 1- 5 h laufen gelassen. Das im Gel enthaltene EtBR interkaliert zwischen den Basen der DNA und fluoresziert unter UV-Anregung (366 nm) orange. So können die im Gel aufgetrennten DNA Fragmente im GelDoc II sichtbar gemacht und dokumentiert werden. Zur Aufreinigung von DNA Fragmenten aus Agarosegelen wurde der

5.1.3 Enzymatische Reaktionen

5.1.3.1 Verdau mit Restriktionsendonukleasen

Der Verdau von DNA mit Restriktionsenzymen erfolgt jeweils in dem vom Hersteller empfohlenen Puffersystem und unter den angegebenen Temperaturbedingungen. Pro µg DNA werden 2-5 Enzymeinheiten (U) eingesetzt. Dabei ist zu beachten, dass das eingesetzte Enzymvolumen 10% vom Gesamtvolumen des Reaktionsansatzes nicht überschreitet, da sich ansonsten das Glycerin der Enzymlösung störend auswirkt. Plasmid-DNA wird 1-2 h, chromosomale DNA 3-16 h verdaut und die Vollständigkeit der Reaktion durch Agarose- Gelelektrophorese kontrolliert.

5.1.3.2 Polymerase- Kettenreaktion (PCR)

Mit Hilfe der PCR (Saiki et al., 1985) können DNA-Abschnitte *in vitro* amplifiziert werden. Unter Verwendung einer doppelsträngigen DNA-Matrize und zweier

begrenzender Oligonukleotid- Primer wird in Gegenwart von dNTPs mit Hilfe der hitzeresistenten Taq-DNA-Polymerase (Chien et al., 1976) in Zyklen von Denaturierung der DNA, Hybridisierung der Primer ("Annealing") und Synthese des jeweiligen komplementären Stranges ("Elongation") der zwischen den Primern liegende DNA-Abschnitt amplifiziert. Die erhaltenen DNA-Fragmente können einerseits kloniert werden, wenn in der Sequenz Restriktionsschnittstellen vorhanden sind, oder aber die verwendeten Oligonukleotid-Primer an ihrem 5'-Ende einen Überhang von nicht hybridisierenden Nukleotiden mit einer Restriktionsschnittstelle aufweisen, oder aber für rein analytische Zwecke eingesetzt werden.

Standard Reaktionsansatz:

x µl Matrizen DNA (ca. 100 ng)
 2 µl 5´Primer (10 pM/µL)
 2 µl 3´Primer (10 pM/µL)
 2 µl 10x PCR-Puffer
 2 µl MgCl₂ (25 mM)
 1 µl dNTP Mix (jeweils 2mM)
0,5 µl Taq-Polymerase
 ad 20 µl H₂O

Das nachfolgend beschriebene PCR-Programm stellt lediglich ein Standardprogramm dar, das bezüglich Temperatur und Dauer der einzelnen Schritte nach jeweiligen Anforderungen, wie Primerkombination oder Länge des zu amplifizierenden Fragments, modifiziert wird.

Standard PCR Programm:

1 x	Schritt 1	5 min, 95°C	Initialdenaturierung
25 x	Schritt 2	30 s, 95°C	Denaturierung
		30 s, 50°C	Annealing
		60 s, 72°C	Elongation
1 x	Schritt 3	5 min, 72°C	finale Elongation
			Kühlen auf 4°C

5.1.3.3 Klonierung von DNA-Fragmenten

Mittels eines Restriktionsverdau eines PCR-Produktes oder eines Plasmides wurde ein Insert geschaffen, welcher dann in einen Vektor, einkloniert wurde. Der Vektor wurde zuvor über einen Restriktionsverdau, mit einer oder mehreren Restriktionsendonukleasen, linearisiert. Vor dem Verdau von PCR Produkten müssen diese von Primern, dNTPs u.ä. gereinigt werden, hierzu wurde das Qiaquick PCR Purification Kit der Firma Qiagen verwendet.

Die Klonierung kann über glatte DNA-Enden (blunt) oder über überhängende Enden (sticky) erfolgen. Vor der Klonierung mussten die einzelnen Fragmente aufgereinigt werden. DNA-Fragmente, bei denen nur wenige Nukleotide über einen Restriktionsverdau entfernt wurden, wurden über Ethanol aufgereinigt (siehe 5.1.2.1). DNA-Fragmente, die über einen Restriktionsverdau aus einem Vektor ausgeschnitten wurden, wurden über ein Agarosegel und anschließend über das Qiaquick PCR Purification Kit aufgereinigt. Bei dem Verdau von Plasmid-DNA verbleiben an den 3'-Enden die Phosphatreste. Zur Vermeidung einer Religation von Plasmiden wurde diese über eine Schrimp-Alkaline-Phosphatase (nach Herstellerangaben) entfernt.

Zur Klonierung von DNA-Fragmenten wurde die T4-DNA-Ligase der Firma Fermentas nach Herstellerangaben verwendet.

5.1.4 Northern Blot und cDNA Microarrays

5.1.4.1 RNA-Isolation

RNA wurde auf zwei unterschiedliche Methoden RNA aus *D. discoideum* Zellen präpariert. Für Microarray Analysen wurde die RNA mittels des RNeasy Mini Kits von Qiagen isoliert. Für Northern Blot Analysen wurde, eine für *D. discoideum* stark veränderte, Guanidium-Thiocyanatmethode nach Chomczynski et al. (1987) verwendet (Chomczynski and Sacchi, 1987).

Die Isolation erfolgt aus ca. 10^7 Zellen. Diese werden abzentrifugiert und das Pellet in 500 μ l Solution D aufgenommen, hierbei lysieren die Zellen. Es werden 50 μ l 3M NaAc pH 4,7 dazugegeben, gevortext und 500 μ l Phenol/Chloroform zugesetzt. Das homogene Gemisch (gevortext) wird für ca. 1 Stunde bei -20°C inkubiert. Anschließend wird zur Phasentrennung für 5 min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Die wässrige obere Phase wird in ein frisches Gefäß

überführt und fällt die darin vorhandene RNA mit 1 Vol. Isopropanol für mindestens 10 min bei -20°C . Die RNA wird dann durch Zentrifugation für 10 min bei maximaler Geschwindigkeit pelletiert, mit 70% Ethanol gewaschen und in 500 μl DEPC-Wasser mit 0,5% SDS resuspendiert. Die Lösung wird mit 500 μl Phenol/Chloroform versetzt und 30 min bei Raumtemperatur geschüttelt. Es folgt eine erneute Phasentrennung über Zentrifugation (s.o.). Die RNA aus der oberen wässrigen Phase wird mit 50 μl NaAc und 1 Vol. Isopropanol gefällt, mit 70% Ethanol gewaschen und in einer angemessenen Menge DEPC-Wasser aufgenommen. Konzentration und Reinheit werden photometrisch bestimmt.

5.4.1.2 RNA Gelelektrophorese und Northern Blotting

Die RNA wird elektrophoretisch über Formaldehyd Gele (1,2% Agarose/6% Formaldehyd) aufgetrennt. Die sichtbaren Banden der rRNA (4,1 und 1,9 kb) dienen dabei als Größenstandard und Anhaltspunkt für die Menge und Integrität der RNA. Die RNA wird mit 10 Vol. Probenpuffer versetzt und zur Denaturierung 10 min bei 65°C erhitzt. Nach dem Lauf wird das Formaldehyd durch Schwenken in bidest. Wasser entfernt und das Gel auf eine Whatmann Papierbrücke gelegt, die mit beiden Enden in den Transferpuffer (20xSSC) eintaucht. Auf das Gel wird ein gleichgroßes Stück einer Nylonmembran gelegt und mit 2 Lagen Whatmannpapier überschichtet. Ein Stapel saugfähiges Papier (mehrere cm) wird darüber gelegt und das Ganze mit einem leichten Gewicht beschwert. Der Transfer erfolgt über Nacht. Die RNA auf der Nylonmembran wird am nächsten Tag durch UV Licht fixiert.

5.1.4.3 Hybridisierung

Die Membran wird zusammen mit der Prähybridisierungslösung in ein Hybridisierungsröhrchen überführt und für 1 h bei 48°C unter Drehen inkubiert. Die Hybridisierung mit der radioaktiven Sonde (s.u.) erfolgt über Nacht bei der gleichen Temperatur. Die Membran wird zuerst mit 2xSSC, 0,1% SDS für 30 min und danach 1-2mal mit 0,2xSSC, 0,1% SDS für 15 min gewaschen. Im Anschluss wird die Membran auf einer Imaging Platte exponiert. Die Analyse erfolgt in einem Fuji X Bas 1500 Bio- Imaging Analyzer.

5.1.4.3 Herstellung radioaktiver DNA- Sonden

Zur radioaktiven Markierung von Sonden für das Northern Blotting wurde eine Klenow-Labeling von PCR Fragmenten verwendet.

Ansatz

5 µg	PCR Produkt
2 µl	10 mM dNTPs (ohne dATP)
2 µl	Klenow Puffer
3 µl	<u>OLB-Mix</u>

H₂O ad 20 µl mixen und zentrifugieren

Zur Denaturierung wird das Gemisch für 5 min auf 95°C erhitzt. Es folgt eine Inkubation für 5 min auf Eis. Anschließend wird 1 µl des Klenow Fragments und 3 µl α-32P-ATP dazugegeben. Die Amplifikation erfolgt für 1 h bei 37°C. Nach Aufreinigung über eine Sephadex-G50 Säule wird die Probe erneut bei 95° für 10 min denaturiert.

5.1.5 cDNA Microarray-Analysen

Das Hybridisieren der cDNA Microarray-Analysen erfolgte wie in Farbrother (2006) beschrieben.

Die RNA für die cDNA Microarray-Analyse wurde über das Qiagen RNeasy Mini Kit isoliert. 20 µg RNA wurden mit einem Spike Mix versetzt und gefällt. Es folgt eine RT-PCR mit oligo dT Primern (Stratagene). Im Anschluss wird die cDNA mittels dem Fair Play Kit der Firma Stratagene markiert. Es folgt eine Aufreinigung der cDNA und die Hybridisierung auf UltraGap Arrays. Ein genaues Protokoll ist im Internet unter <http://www.uni-koeln.de/med-fak/biochemie/transcriptomics/> zu finden.

Die Arrays wurden mittels Scan-Array® 4000XI der Firma Perkin Elmer gescannt und mittels des Programms Array Express 2.1 (Perkin Elmer, Wellesley, USA) analysiert. Die Auswertung erfolgte über die Programme R Version 1.6.2 (<http://www.r-project.org>) und Significance Analysis of Microarrays (SAM) Version 1.21 (<http://www-stat.stanford.edu/~tibs/SAM/>)

5.2 Transformationstechniken

5.2.1 Transformationstechniken für *E. coli*

5.2.1.1 Herstellung kompetenter Zellen nach der Mehr-Ionen-Technik (Hanahan, 1983)

5 ml M9-Medium werden mit einem entsprechenden *E. coli* Stamm angeimpft und über Nacht bei 37°C unter Schütteln (280 rpm) inkubiert. Ausgehend von dieser Kultur werden 100 ml LB-Medium beimpft und solange bei 37°C unter Schütteln inkubiert, bis eine OD₅₅₀ von 0,3 bis 0,4 erreicht ist. Die Zellen werden auf Eis gekühlt, geerntet (5.100 x g, 5 min, 4°C, Hettich Rotanta/R) und in 15 ml eiskaltem Tfb I-Puffer resuspendiert. Die Zellsuspension wird 10-15 min auf Eis inkubiert und die Zellen abzentrifugiert. Das Zellpellet wird in 5 ml gekühltem Tfb II-Puffer aufgenommen und erneut 15 min auf Eis stehengelassen. Anschließend können die Zellen direkt für eine Transformation eingesetzt werden, oder sie werden bis zu ihrer Verwendung in Aliquots in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -70°C gelagert.

5.2.1.2 Transformation kompetenter Zellen

Je nach Qualität der kompetenten Zellen werden pro Transformation 100-200 µl Plasmid DNA eingesetzt. Eine adäquate Menge kompetenter Zellen wird langsam auf Eis aufgetaut und mit 10-100 ng des zu transferierenden Plasmids versetzt und sehr vorsichtig gemischt. Die Zellen werden dann 40 min auf Eis gelagert. Es folgt ein 90 s andauernder Hitzeschock im Wasserbad bei 42°C, nach dem die Zellen sofort wieder auf Eis gestellt werden. Nach wenigen Minuten erfolgt die Zugabe von 1 ml vorgewärmten LB-Medium zur Zellsuspension. Es folgt eine einstündige Inkubation auf 37°C unter leichtem Schütteln. Danach werden die Zellen 1 min bei 3.000 rpm abzentrifugiert, und das Medium wird bis auf ca. 200 µl abgenommen. Die Zellen werden im verbleibenden Medium resuspendiert und auf einer Agarplatte mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37°C bebrütet. Nach erfolgreicher Transformation sind am nächsten Tag deutlich angewachsene Kolonien sichtbar.

5.2.2 Transformationstechniken für *Dictyostelium discoideum*

5.2.2.1 Elektroporation

(Howard et al., 1988)

D. discoideum Zellen werden axenisch auf eine Dichte von $1-2 \times 10^6$ Zellen/ml angezogen. Pro Elektroporationsansatz werden 2×10^7 Zellen benötigt. Entsprechende Volumina werden der Flüssigkultur entnommen, in ein Falconröhrchen überführt und 10 min auf Eis gestellt. Die Zellen werden daraufhin durch zehnminütiges Zentrifugieren bei 1.600 rpm und 4°C geerntet und danach, erst in vorgekühlten Soerensen-Phosphatpuffer, dann zweimal mit eiskaltem EP-Puffer, gewaschen (jeweils 1.600 rpm, 10 min, 4°C). Nach erneuter Zentrifugation werden die Zellen in 600 µl (pro 2×10^7 Zellen) EP-Puffer aufgenommen, mit 15-20 µg vorgekühlter DNA versetzt, resuspendiert und in vorgekühlte Elektroporationsküvetten (Elektrodenabstand 4 mm) pipettiert. Diese werden verschlossen und samt Inhalt 10 min auf Eis gestellt.

Danach erfolgt der Elektropuls im Gene Pulser von Bio Rad bei folgenden Einstellungen: 25 µF Kapazität; 1 kV Spannung; ohne externen Widerstand. Die Zeitkonstante sollte dabei möglichst zwischen 2 und 3 ms liegen. Pro Elektroporationsansatz wird nur einmal gepulst. Danach werden die Küvetten erneut für 10 min auf Eis gestellt.

In der Zwischenzeit werden Petrischalen (\varnothing 10 cm) durch Zugabe von jeweils 8 µl 100 mM CaCl₂ und 8 µl 100 mM MgCl₂ (beide Lösungen Steril filtriert) vorbereitet und die Zellen nach der zehnminütigen Inkubation auf Eis in diese überführt, sodass sie sich mit den Salzlösungen vermischen. Nach 15minütiger Inkubation bei 22°C werden 10 ml G₀-Medium zugegeben und die Zellen durch Schwenken verteilt. Einen Tag später erfolgt der Austausch des Medium gegen ein entsprechendes Selektionsmedium. Alle zwei bis drei Tage wird das Medium mit den toten Zellen abgenommen und erneuert.

Nach spätestens 2 Wochen waren bei erfolgreicher Transformation deutlich sichtbare Klone angewachsen.

5.2.2.2 Klassische Transformation

(Nellen et al., 1984)

Das Medium einer mit *Dictyostelium discoideum* Zellen voll bewachsener 10ml Petrischale (1×10^7 Zellen) wird abgenommen und durch 10 ml MES-HL5-Medium

ersetzt. Während die Zellen adhäreren, wird die DNA Präzipitiert. Ca. 12 µg DNA werden hierzu in 600 µl 1xHBS gelöst, mit 38 µl 2M CaCl₂ unter vortexen versetzt und für 25 min gefällt.

Das MES-HL5-Medium wird vorsichtig von der Platte entfernt und das DNA Präzipitat vorsichtig auf die Platte getropft. Diese wird für 25 min stehen gelassen. Anschließend werden erneut 10 ml MES-HL5-Medium mit Ampicillin (Endkonzentration 40 mg/ml) auf die Platte gegeben und für 3 h inkubiert. Anschließend wird das Medium abgenommen und die Zellen mit 2 ml einer 18%igen Glycerinlösung für max. 4 min inkubiert. Die Lösung wird abgenommen und durch 10ml G₀ Medium ersetzt. Am nächsten Tag wird das G₀ Medium durch das gewünschte Selektionsmedium ersetzt.

5.3 Zellbiologische Methoden

5.3.1 Anzucht in Flüssigmedium

Im Gegensatz zum Freilandisolat kann der Laborstamm AX2, bedingt durch Mutationen (Clarke and Kayman, 1987), in axenischem Medium (AX-Medium) kultiviert werden (Watts and Ashworth, 1970). AX2 und Transformanten werden aus Vorkulturen, Sporen oder von SM-Platten (mit *Klebsiella aerogenes*) in AX-Medium angeimpft. Die Zell- bzw. Sporenzahl sollte dabei nicht unter 10⁴/ml liegen. Um Kulturen von *Klebsiella aerogenes* zu befreien, werden die *D. discoideum* Zellen in Penicillin/Streptomycin enthaltendes Medium (100 U/ml) überführt. Für die Kultivierung von Transformanten wird dem Medium die entsprechende Menge des jeweiligen Selektionsantibiotikums zugesetzt. Die Anzucht von adhärierenden Zellen erfolgt in 24 Loch- Costarplatten oder Petrischalen (∅ 5 & 10 cm). Suspendierte Zellen werden in 20-50 ml Medium bei 150 rpm geschüttelt (Lab- Shaker). Bei 22°C beträgt die Generationszeit von AX2 in Schüttelkultur etwa acht Stunden. Für alle zellbiologischen Untersuchungen wurden die Zellen maximal bis zu einer Dichte von 5x10⁶ Zellen/ml angezogen. Ab 1x10⁷ Zellen/ml beginnt die Wachstumskurve in die stationäre Phase überzugehen.

5.3.2 Subklonierung von Transformanten

Um einzelne Transformanten in Reinkultur zu erhalten werden die Zellen über Bakterienrasen subkloniert. Nach 3 Tagen können erste Fresshöfe (Plaques) auf dem Bakterienrasen beobachtet werden. Hierzu wird eine mit *Klebsiella aerogenes* bewachsene SM-Platte mit 5 ml Phosphatpuffer ab gespült und mit *D. discoideum* Zellen der Transformationsplatte versetzt. Dieses Gemisch wird auf SM-Agarplatte ausgebracht und sollte ca. 100 *D. discoideum* Zellen ausgebracht. Nach 3 Tagen werden mittels steriler Zahnstocher vegetative Zellen am Rand der Plaques entnommen und in eine 24-Well Kostarplatte mit einem ml des gewünschten Selektionsmedium überführt.

5.3.3 Sporengewinnung und Konservierung

Axenisch gewachsene Zellen werden zweimal mit einem 1/2- bis 1/3-Volumen kaltem Soerensen- Phosphatpuffer gewaschen und auf eine Dichte von $1-2 \times 10^8$ Zellen/ml eingestellt. Von dieser Suspension werden pro Phosphat-Agarplatte je 500 μ l ausplattiert und die Platten bei 22°C inkubiert. Innerhalb von zwei Tagen entwickeln sich die Zellen und bilden Fruchtkörper. Die Sporen und Stiele werden mit 3 ml Soerensen- Phosphatpuffer pro Platte ab gespült und die so erhaltene Suspension wird in 1 ml Aliquots in Einfrierröhrchen in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgt bei -70°C. Zum Animpfen einer neuen Kultur wird ein Aliquot bei Raumtemperatur angetaut und 100- 200 μ l in eine Petrischale mit AX- Medium gegeben.

5.3.4 Wachstum auf Bakterienrasen

Um das Fressverhalten von *Dictyostelium discoideum* zu testen, wurden sowohl Wildtyp als auch Mutanten mit verschiedenen Bakterienstämmen zusammen auf SM- Agarplatten ausgebracht und bei 22°C bebrütet (siehe 5.3.2). Nach 4 und 5 Tagen wird der Durchmesser der Fresshöfe mittels einer Schieblehre gemessen.

5.4 Proteinbiochemische Methoden

5.4.1 Gesamtproteinextraktion aus *Dictyostelium discoideum*

Von einer axenisch gewachsenen *Dictyostelium* Flüssigkultur mit einer Zelldichte bis 5×10^6 Zellen/ml werden 15 ml abzentrifugiert (1200 rpm, 3 min, 4°C) und zweimal mit Phosphatpuffer gewaschen. Das Zellpellet wird in 1 ml 10 mM Natriumacetat, pH 4,5 resuspendiert, und die Zellen werden durch dreimaliges Einfrieren in flüssigen Stickstoff und Auftauen im Wasserbad bei Raumtemperatur aufgebrochen. Die Zellbestandteile werden dann bei $14000 \times g$ für 60 min bei 4°C abzentrifugiert, und der Überstand wird mit den gelösten Proteinen in ein neues Eppi überführt.

5.4.2 Proteinbestimmung nach Pierce BCA Protein Assay Kit

Das BCA Protein Assay Kit dient der kolorimetrischen Detektion und Quantifizierung von Proteinen.

Ein „Working Reagenz“ wird nach Angaben des Herstellers vorbereitet: 2 ml dieser Lösung werden mit 50-100 µl der zu bestimmenden Proteinprobe in einer Plastikkuvette vermischt und 30 min bei 37°C inkubiert. Die Probe wird auf Raumtemperatur abgekühlt und die Absorption bei 562 nm gegen Wasser gemessen. Die Absorption bei 562 nm ist nahezu linear mit der Proteinkonzentration in einem Bereich von 20-2000 µg Protein /ml.

Die Proteinmenge kann dann unter Zuhilfenahme einer mit BSA erstellten Eichgeraden bestimmt werden.

5.4.3 Photometrische Messung der Lysozym Aktivität

Zur Bestimmung der Lysozymaktivität wird eine Lösung aus 0,3 mg/ml lyophilisierten *M. luteus* in 100 mM Natriumphosphatpuffer, pH 4,5 hergestellt. 500 µl dieser Lösung werden dann mit 500 µl Gesamtprotein (siehe 5.4.1) in einer Plastikkuvette im Photometer gemischt und sofort gemessen. Die Messung erfolgt bei 450 nm in Minutenabständen. Um ein Absetzen der Bakterien zu verhindern werden die Proben mit einem Plastikstäbchen zwischen den einzelnen Messungen gut verrührt. Die Lyserate kann bei der Messung als linear abnehmende Änderung der Absorption gemessen werden. Als Referenz dient ein Gemisch aus 500 µl Bakterienlösung und 500 µl 10 mM Natriumacetat, pH 4,5.

5.4.4 Membranassoziation

(Becker et al., 1999)

5×10^6 Zellen werden geerntet und in 1 ml Homogenisations-Puffer resuspendiert. Die Zellen werden über einen Cell-Cracker aufgeschlossen, wobei die Zellorganellen intakt bleiben. Die Zellkerne werden über eine Zentrifugation für 30 min bei 1000xg pelletiert. Jeweils 125 μ l des Überstandes werden mit Homogenisations-Puffer allein oder versetzt mit 2 M NaCl, 0,2 M CaCO_3 , pH11 bzw. 2 % Triton versetzt und für 2 h auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgt eine Zentrifugation für 30 min bei 100.000xg. Hierbei wird die Membran (Pellet) von löslichen Bestandteilen (Überstand) getrennt. Das Pellet wird in einem zum Überstand äquivalentem Volumen aufgenommen, mit Lämmli-Puffer versetzt und aufgekocht. Zur Überprüfung des Verhaltens des Zielproteins erfolgt eine Western Blot Analyse.

5.4.5 Immunpräzipitation

(Hohmann et al., 1987)

1×10^8 Zellen wurden abzentrifugiert, das Pellet in 500 μ l DTT-HEPES-Puffer, welcher 1% Triton und PMSF enthielt, resuspendiert und für 1 h bei 4°C rollend inkubiert. Hierbei werden die Zellen lysiert. Anschließend wird nicht lösliches Material abzentrifugiert (5 min bei 13.000 rpm). 480 μ l des Überstandes werden mit 755 μ l Hybridomakulturüberstand (enthalten den Antikörper 9E10) und 65 μ l 3 M NaCl (Endkonzentration 150 mM) versetzt und für 2 h bei 4°C gerollt. Es folgte eine weitere Inkubation für 1h rollend bei 4°C, nachdem 690 μ l Protein-A-Sepharose-Beads (vorgequollen) hinzupipettiert wurden. Die Beads mit dem gebundenen Material wurden im Anschluss sedimentiert (600xg, 30 s) und 6-mal mit dem siebenfachen Volumen DTT-HEPES-Puffer, 1% Triton, PMSF und 150 mM NaCl gewaschen. Die Waschflüssigkeit wurde möglichst vollständig entfernt, die Beads mit 70 μ l 10x SDS-Probenpuffer versetzt und aufgekocht.

5.5 Polyacrylamid- Gele und Western- Blot Technik

Zur Größenaufftrennung von Proteinproben wird die diskontinuierliche denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS- PAGE) eingesetzt. Die aufgetrennten Proteine werden über ein Blot Verfahren (Western Blot) auf eine Nitrocellulose- Membran transferiert und einzelne Proteine spezifisch über immunologische Methoden nachgewiesen. Die nach dem Transfer auf die

Membran im Gel verbliebenen Proteine werden zur Abschätzung der Proteinmengen in den einzelnen Proben mit Coomassie gefärbt.

5.5.1 Entnahme und Vorbereitung von Proteinproben

3×10^6 Zellen einer *D. discoideum* Kultur werden bei 4°C abzentrifugiert, und das Zellpellet wird in 60 µl 2x Lämmli Puffer durch auf- und abpipettieren resuspendiert. 15- 20 µl einer solchen Probe werden dann in der SDS-PAGE eingesetzt. Für den Nachweis von GP70 wurde die doppelte Menge an Zellen verwendet, da Gp70 anscheinend relativ schwach exprimiert wird.

5.5.2 Herstellung von SDS- Polyacrylamidgelen

Zunächst werden die benötigten Glasplatten (18 cm x 14 cm) und Spacer mit Spülmittel und Ethanol gereinigt. Die Spacer werden nun an den äußeren Rändern zwischen den beiden Glasplatten platziert und in ihrer Position durch Anbringen von Metallklammern fixiert. Der zwischen den Glasplatten entstehende Hohlraum wird innen mit aufgekochter 0,1%iger Agarose abgedichtet. In den Hohlraum werden nun nacheinander die beiden unterschiedlich konzentrierten Gele gegossen. Zuerst wird das noch unpolymerisierte Trenngel (12% PAA) eingefüllt und mit Isopropanol überschichtet (scharfe Trenngelkante). Nach der Polymerisation wird das Isopropanol abgegossen und das noch unpolymerisierte Sammelgel (3,4% PAA) eingefüllt, in das von oben her ein Probenkamm eingeführt wird. Nach der Polymerisation des Trenngels kann das Gel nach Entnahme des Kamms und des unteren Spacers verwendet werden.

Zur Bereitung der Gele wurden folgende Komponenten in der angegebenen Reihenfolge in ein Becherglas gegeben und vermischt (ausreichend für 3 Gele):

Trenngel (12% PAA)	25,5 ml	H ₂ O
	16,1 ml	SDS- Trenngel- Puffer
	21,9 ml	Gel 30 (30%igeAcrylamid/ Bisacrylamid- Stammlösung)
	16,1 µl	TEMED
	720 µl	20 % APS

Sammelgel (3,4% PAA)	20,7 ml	H ₂ O
	8 ml	SDS- Sammelgel- Puffer
	3,6 ml	Gel 30 (30%ige Acrylamid/ Bisacrylamid- Stammlösung)
	16 µl	TEMED
	480 µl	20 % APS

Die Polymerisation setzt erst nach Zugabe von APS und TEMED allmählich ein. Nach Aufbau der Gelapparatur und dem Auftragen der Proben und des Längenstandards in die Geltaschen werden die Proben zunächst bei 120 V durch das Sammelgel laufen gelassen. Nach Erreichen des Trenngels wird die Spannung auf max. 200 V erhöht und bis zum Ende des Laufs, nach ca. 3-4 h, beibehalten. Das Trenngel wird nun vorsichtig entnommen und für weitere Anwendungen verwendet.

5.5.3 Westernblot

Die effizienteste und schnellste Methode, um Proteine aus einem PAA-Gel auf eine Membran zu transferieren, ist der Elektrobplot.

Die durch SDS negativ geladenen Proteine lassen sich aus einem ungefärbten Polyacrylamid-Gel auf eine Nitrocellulose-Membran nach dem Semidry-Verfahren von Kyhse-Andersen transferieren. Für diesen Zweck wird eine Blotapparatur verwendet, die sich aus zwei Graphitelektroden zusammensetzt. Auf die untere Elektrode (Anode) werden nacheinander in Semidry- Transferpuffer getränkte Whatman-Papiere 3MM, die Membran, das Gel sowie 2 weitere Lagen von Whatman-Papier 3MM blasenfrei aufgelegt. Nach Aufsetzen des Deckels (obere Elektrode = Kathode) wird nun eine Stromstärke von konstant 5 mA pro cm² der Membran angelegt und damit der dreißig minütige Elektrotransfer gestartet. Das im Puffer vorhandene Methanol erleichtert dabei das Herauslösen der Proteine aus dem Gel. Nach Beendigung des Transfers wird Membran und Gel entnommen. Das Gel wird nun mit Coomassie gefärbt und die Membran für den immunologischen Nachweis bestimmter Proteine verwendet.

5.5.4 Immundetektion von Proteinen

Zur Angleichung an neue Pufferbedingungen nach dem Elektrotransfer wäscht man die Nitrocellulose-Membran zunächst einmal in 1xPBS. Hiernach werden

unspezifische Bindungsstellen der Membran durch eine 30minütige Inkubation in Blockierlösung abgesättigt. Eine zu hohe Konzentration des Blockierungsreagenzes oder eine zu lange Blockierungszeit kann dabei zur Ablösung oder zur Überdeckung der transferierten Proteine führen. Es folgt die Zugabe des Primärantikörpers in einer 1:5 Verdünnung in frischer Blockierlösung. Die Inkubation erfolgt unter Schwenken über Nacht. Die AK Lösung wird am nächsten Tag entnommen und die Membran zur Entfernung ungebundener Antikörper zweimal in 1xPBS gewaschen. Es folgt die Zugabe des sekundären Antikörpers (Kaninchen-anti-Maus IgG konjugiert mit alk. Phosphatase). Der Antikörper liegt dabei 1:5000 verdünnt in Blockierlösung vor. Nach 2 h Inkubation unter Schwenken bei Raumtemperatur wird der sekundäre Antikörper entfernt, die Membran zweimal in 1xPBS gewaschen und in Carbonatpuffer, pH 10,5 äquilibriert. Durch Zugabe von 30 ml frischem Carbonatpuffer zusammen mit 112,5 µl BCIP (50 mg/ml in DMF) als Substrat und 60 µl NBT (75 mg/ml in 70% DMF) wird nun die dem indirekten Proteinnachweis dienende Farbreaktion initiiert, wobei das Substrat an Orten der Antikörperbindung unter blaugrauer Farbentwicklung enzymatisch gespalten wird. Die Reaktion wird durch Austausch des Puffers gegen deionisiertes Wasser gestoppt.

5.5.5 Coomassie Färbung von Polyacrylamidgelen

Um nach der SDS-PAGE das Proteinmuster der einzelnen Fraktionen darzustellen, wird das Gel über Nacht in einer Coomassie Färbelösung geschwenkt. In dieser Zeit kommt es zur Bindung des Farbstoffes an die hydrophoben Proteindomänen. Die Entfernung überschüssigen Farbstoffes erfolgt durch sukzessive Schwenken in bidest. Wasser.

5.6 Präparation von Zellen für die Immunfluoreszenz

300 µl einer Zellsuspension werden auf einem HCL-gereinigtes Deckgläschen (ø 18mm) pipettiert und die Zellen für 45 min absitzen gelassen. Das Medium wird abgenommen und die Zellen sofort mit 200 µl des Pikrinsäure/Paraformaldehyd-Fixativs überschichtet. Die Zellen werden so für 30 min in einer feuchten Kammer fixiert. Anschließend werden die Zellen zuerst durch eintauchen in 10 mM PIPES

und PBS/Glycin gewaschen. Nach einem weiteren Waschritt von 5 min in PBS/Glycin werden die Zellen mit 70% Ethanol nachfixiert. Anschließend wird zweimal für 5 min mit PBS/Glycin und dann zweimal mit PBG (5 min) gewaschen. Die Inkubation mit dem einem monoklonalem Primärantikörper (im Hybridomaüberstand enthalten) erfolgt über Nacht. Der polyklonale myc-Antikörper wird 1:500 verdünnt (in PBG) eingesetzt.

Nach dem Entfernen des Antikörpers wird sechsmal für 5 min mit PBG gewaschen. Die Inkubation des Zweitantikörpers (1:1000 verdünnt) erfolgt anschließend für 2 h wahlweise bei Raumtemperatur oder 37°C. Die Lösung mit dem Sekundärantikörper wird abgenommen und die Zellen zweimal für 5 min mit PBG und zweimal für 5 min mit PBS gewaschen. Nachdem das Deckgläschen kurz in bidest. Wasser geschwenkt wurde, wird dieses, mit den Zellen nach unten, in Gelvatol auf einem Objektträger eingebettet. Die Aushärtung erfolgt im Dunkeln bei 4°C.

5.6.1 Herstellung des Pikrinsäure/Paraformaldehyd-Fixativs

0.2 g Paraformaldehyd werden in 3 ml bidest. Wasser und unter Zugabe von 3-4 Tropfen 2 M NaOH bei ca. 45°C gelöst. Anschließend werden 5 ml 20 mM PIPES, pH 6,0 und 1,5 ml gesättigte Pikrinsäure dazugegeben und der pH-Wert des Fixativs mit HCl auf ungefähr 6 eingestellt. Die Überprüfung des pH-Wertes erfolgt mittels Indikatorstäbchen.

5.6.2 DAPI-Färbung

Zur Markierung von DNA in Zellen wird der Farbstoff DAPI verwendet. Dieser wird 1:1000 verdünnt (Stammlösung 1 mg/ml in 79% Ethanol) zusammen mit dem sekundären Antikörper in den Immunfluoreszenzen (siehe oben) verwendet.

5.7 Endocytose Assays

5.7.1 Phagocytose Assay

(Maniak et al., 1995)

Bei diesen Methoden wird die Internalisation von Tetramethylrhodamin Isothiaocyanat (TRITC)-markierten Hefen mit Hilfe eines Fluorimeters gemessen.

10 ml einer bis zu 2×10^6 Zellen/ml in G_0 Medium gewachsenen *D. discoideum* Kultur werden in einen silanisierten Erlenmeyerkolben überführt und bei 120 rpm geschüttelt. Zu jeden Kolben werden 120 μ l TRITC markierter Hefen (1×10^9 Zellen/ml) hinzu pipettiert, die zuvor für 5-7 min im Ultraschall behandelt wurden, dann gevortext und für kurze Zeit im Rüttler standen. Diese Verfahrenstechnik dient dazu sicherzustellen, dass die Hefen nicht aneinander kleben. Zum Zeitpunkt des Hinzufügens der Hefen (Zeitpunkt 0) und danach im Abstand von 15 min wird 1 ml Suspension entnommen und zu 100 μ l Trypanblau, vorgelegt in einem Eppli, pipettiert. Dies dient zum quenchen der extrazellulären Fluoreszenz. Anschließend werden die Proben für 3 min auf einen Rüttler gestellt, hierbei lösen sich die noch an der Oberfläche assoziierten Bakterienzellen ab. Nach Zentrifugieren bei 3000 rpm für 2 min wird der Überstand abgesogen und das Zellpellet in 1 ml Phosphatpuffer aufgenommen. Die Messung der internalisierten Fluoreszenz markierten Hefen erfolgt im Fluorimeter bei einer Excitation von 544 nm und einer Emmission von 574 nm bei 550 bzw. 600V.

Die Hefen in diesem Versuch sind tot und können von den Dictyostelium Zellen nicht verwertet werden, sie werden also im Ganzen wieder exocytiert.

5.7.1.2 Substratgebundener Phagocytose Assay

Für den substratgebundener Phagocytose Assay von 24 Well Kostar-Platten wurden je 1×10^6 Zellen pro Well absitzen gelassen. Pro Well wurden 6 μ l TRITC-markierten Hefen zu den Dictyostelium Zellen dazugegeben. Der restliche Assay wurde genauso durchgeführt, wie der aus Schüttelkultur (siehe 5.5.1, mit dem einzigen Unterschied, dass die Zellen vor der Messung von Kostarplatte abgespült wurden

5.7.1.3 Herstellung von TRITC- markierter Hefen

5 g Hefen werden in 50 ml 1xPBS für 30 min in einem kochenden Wasserbad gerührt und so getötet. Anschließend erfolgt eine fünfmalige Waschung mit 1xPBS, gefolgt von zweimaligem Waschen mit Phosphatpuffer. Die Hefezellen werden auf eine Konzentration von 1×10^9 Zellen/ml in Phosphatpuffer eingestellt und können dann bei -20°C aufbewahrt werden. 2×10^9 Hefezellen (Pellet) werden zum Labeln in 20 ml einer Lösung, bestehend aus 50 mM Dinatriumhydrogenphosphat Puffer (Na_2HPO_4), pH 9,2 und 2 mg TRITC, aufgenommen und für 30 min bei 37°C auf dem Schüttler inkubiert. Anschließend

wird zweimal mit 50 mM Dinatriumhydrogenphosphat Puffer, pH 9,2, und mindesten 4 mal mit Phosphatpuffer gewaschen. Die Aufbewahrung erfolgt bei -20°C , nachdem die Zellen mit Phosphatpuffer auf 1×10^9 Zellen/ml eingestellt und aliquotiert wurden.

5.7.2 Phagocytose Assay FITC markierter Bakterien/ Latexpartikel

(Rivero and Maniak, 2006)

10 ml einer bis zu 2×10^6 Zellen/ml in G_0 Medium gewachsenen *D. discoideum* Kultur werden im Verhältnis 200:1 mit FITC markierter Bakterien bzw. fluoreszierender Latexpartikel versetzt. Zudem Zeitpunkten $t=0$ und dann im Abstand von 15 min bis zum Zeitpunkt $t=60$ wird jeweils 1 ml der Suspension abgenommen, mit 2 ml Soerensen-Phosphatpuffer versetzt und auf Eis aufbewahrt. Alle Proben werden gemeinsam zum Schluss des Assays über eine Säule aus 20%igem PEG 8000 zentrifugiert (800g, 10 min, 4°C). Hierbei werden die nicht internalisierten Bakterien (Überstand) von den *D. discoideum* Zellen (Pellet) getrennt. Die Zellen werden in 1 ml Lysis-Puffer resuspendiert und die so freigesetzte Fluoreszenz im Fluorimeter bei 300 V gemessen.

5.7.2.1 Herstellung FITC-markierter Bakterien

300 ml einer über Nacht gewachsenen *E. coli* B/r Kultur werden für 10 min bei 5000xg abzentrifugiert und die Bakterien zweimal mit Soerensen-Puffer gewaschen. Über die Messung der optischen Dichte ($1\text{OD}_{540\text{nm}} = 1 \times 10^9$ Zellen/ml) werden die Bakterien auf 1×10^{10} Bakterien/ml eingestellt.

5×10^{11} Bakterien werden pelletiert, in 50 ml Labeling-Puffer (enthält 0,1 mg/ml FITC) resuspendiert und für 2 h bei 37°C rotierend inkubiert. Nach viermaligen waschen in Soerensen-Phosphatpuffer werden die Zellen auf 2×10^{10} /ml im gleichen Puffer eingestellt und Aliquots bei -20°C eingefroren.

5.7.4 Degradations Assay

(verändert nach (Maselli et al., 2002)

In diesem Versuch werden den *Dicytostelium*-Zellen lebende GFP-exprimierende Zellen zur Phagocytose gegeben. Diese können im Gegensatz zu den Hefezellen aus 5.5.1, von den Zellen degradiert und verwertet werden. Gemessen wird hierbei die Fluoreszenz von GFP, das mit den Bakterienzellen abgebaut wird.

100 μl einer Glycerin-Kultur von GFP-exprimierenden *E. colis* werden auf einer LB- Platte, die 0,5% L-Arabinose enthält, ausgebracht und über Nacht bei 37°C

inkubiert. Der am nächsten Tag gewachsene Rasen wird vollständig mit 10 ml Phosphatpuffer (RT) abgespült, 1x mit Phosphatpuffer (RT) gewaschen, in 20 ml Phosphatpuffer (RT) aufgenommen und auf vier silanisierte Erlenmeyerkolben verteilt. Diese werden bei RT geschüttelt. Von *Dictyostelium*-Kulturen mit einer Zelldichte von ungefähr 5×10^6 Zellen/ml in G_0 Medium werden 10 ml (oder entsprechend mehr oder weniger) abgenommen, die Zellen bei 1200 rpm für 5 min abzentrifugiert und anschließend in 5 ml Phosphatpuffer (RT) aufgenommen. Diese Zellen werden zu den 5 ml Bakteriensuspension gegeben und 15 min unter Schütteln bei 120 rpm phagozytieren gelassen. Die *Dictyostelium*-Zellen werden danach für 5 min bei 1200 rpm und 4 °C abzentrifugiert und dreimal mit eiskaltem Phosphatpuffer gewaschen. Bei den ersten beiden Waschungen werden dem Phosphatpuffer 5 mM Natriumazid zugesetzt. Dadurch sollen sich die, an der Oberfläche der *Dictyostelium*-Zellen gebundenen Bakterien, besser ablösen lassen (Maselli et al., 2002). Nach dem letzten Waschschrift werden die Zellen in 10 ml Phosphatpuffer (RT) aufgenommen. Davon wird sofort 1 ml der Zellsuspension als Probe genommen und die Fluoreszenz, ohne weitere Zwischenschritte, im Fluorimeter bei einer Excitation von 400 nm und einer Emission von 510 nm gemessen. Die Voltzahl wird dabei so eingestellt, dass der Wildtyp bei der ersten Messung einen Wert bei ungefähr 100 hat (+/- 600V). Ein Waschschrift zwischen Probenentnahme und Messung hat bei dieser Methode keinen Unterschied gezeigt. Zur Auswertung wird die relative Fluoreszenz in Prozent angegeben, wobei der Wert zum Zeitpunkt 0 für jede Kultur als 100% angenommen wird.

6 Abkürzungen

aly	Amöben Lysozym
Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BCIP	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-Phosphat p-Toluidinsalz
Bidest.	Bidestilliertes Wasser
BSA	Rinderserumalbumin
Bsr	Blasticidin-Resistenz
bp	Basenpaare
bzw.	Beziehungsweise
ca.	Circa
cAMP	cyklisches Adenosinmonophosphat
DABCO	1,4-Diaminobenzidin
DAG	1,2-Diacylglycerol
cdNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
DABCO	1,4-Diazabicyclo(2.2.2)octan
DAG	Diacylglycerol
DAip1	<i>Dictyostelium</i> Aktin interacting Protein 1
DAPI	4,6-Diamidino-2-phenylindol
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DMFO	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Desoxinucleotidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>E. histolytica</i>	<i>Entamoeba histolytica</i>
EP	Elektroporation
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
g	Gramm

GFP	grünfluoreszierendes Protein
GlcNAc-1-P	N-Acetylglucosamin-1-Phosphat
IgG	Immunglobulin G
IP ₃	Inositoltriphosphat
KA	<i>Klebsiella aerogenes</i>
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
kV	Kilovolt
LB _(amp)	Luria Bertani-Medium (mit Ampicilin)
M	Molar
mAB	monoklonaler Antibody
<i>M. lutes</i>	<i>Micrococcus luteus</i>
mg	Miligramm
ml	Mililiter
Mb	Megabasen
mM	Milimolar
min	Minute
mmol	Milimol
MOPS	3-Morpholinpropansulfonsäure
Man-6-SO ₄	Mannose-6-Sulfat
MTOC	Microtubuli Organizing Center
NBT	Nitroblautetrazoliumchlorid
PAA	Polyacryamid
PAGE	Polyacryamidgelelektrophorese
PDI	Protein Disulfid Isomerase
PIP ₂	Phosphatidylinositol-(4,5)-Bisphosphat
PIP ₃	Phosphatidylinositol-(3,4,5)-Triphosphat
PCIA	Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol; 25:24:1
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PIPES	Piperazin-N,N'-bis-(2-ethansulfonsäure)
PLC	Phospholipase C
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Reverse Transkription

SDS	Natriumdodecylsulfat
s	Sekunden
s.u.	siehe unten
s.o.	siehe oben
SM	Standardmedium
<i>Taq</i>	<i>Thermophilus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)aminomethan
TRITC	Tetramethylrhodamin Isothiaocyanat
U	Enzymeinheit
u.a.	unter anderem
ü.N.	über Nacht
UV	Ultraviolettes Licht
V	Volt
Vol.	Volumen
[v/v]	Volumenprozent
[w/v]	Gewichtsprozent
μF	Mikrofarad
μg	Microgramm
μl	Microliter
wt	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel

7 Literatur

Aguado-Velasco, C. and Bretscher, M. S. (1999). Circulation of the plasma membrane in Dictyostelium. *Mol Biol Cell* **10**, 4419-27.

Aizawa, H., Fukui, Y. and Yahara, I. (1997). Live dynamics of Dictyostelium cofilin suggests a role in remodeling actin latticework into bundles. *J Cell Sci* **110** (Pt 19), 2333-44.

Allison, D. B., Cui, X., Page, G. P. and Sabripour, M. (2006). Microarray data analysis: from disarray to consolidation and consensus. *Nat Rev Genet* **7**, 55-65.

Aubry, L., Klein, G., Martiel, J. L. and Satre, M. (1993). Kinetics of endosomal pH evolution in Dictyostelium discoideum amoebae. Study by fluorescence spectroscopy. *J Cell Sci* **105** (Pt 3), 861-6.

Baldauf, S. L. and Doolittle, W. F. (1997). Origin and evolution of the slime molds (Mycetozoa). *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 12007-12.

Baptiste, E., Brinkmann, H., Lee, J. A., Moore, D. V., Sensen, C. W., Gordon, P., Durufle, L., Gaasterland, T., Lopez, P., Muller, M. et al. (2002). The analysis of 100 genes supports the grouping of three highly divergent amoebae: Dictyostelium, Entamoeba, and Mastigamoeba. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 1414-9.

Barbosa, M. D., Nguyen, Q. A., Tchernev, V. T., Ashley, J. A., Detter, J. C., Blaydes, S. M., Brandt, S. J., Chotai, D., Hodgman, C., Solari, R. C. et al. (1996). Identification of the homologous beige and Chediak-Higashi syndrome genes. *Nature* **382**, 262-5.

Becker, M., Matzner, M. and Gerisch, G. (1999). Drainin required for membrane fusion of the contractile vacuole in Dictyostelium is the prototype of a protein family also represented in man. *Embo J* **18**, 3305-16.

Birnboim, H. C. and Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* **7**, 1513-23.

Blanc, C., Charette, S., Cherix, N., Lefkir, Y., Cosson, P. and Letourneur, F. (2005). A novel phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate-binding domain targeting the Phg2 kinase to the membrane in Dictyostelium cells. *Eur J Cell Biol* **84**, 951-60.

Bogdanovic, A., Bennett, N., Kieffer, S., Louwagie, M., Morio, T., Garin, J., Satre, M. and Bruckert, F. (2002). Syntaxin 7, syntaxin 8, Vti1 and VAMP7 (vesicle-associated membrane protein 7) form an active SNARE complex for early macropinocytic compartment fusion in Dictyostelium discoideum. *Biochem J* **368**, 29-39.

Bombliès, L., Biegelmann, E., Doring, V., Gerisch, G., Krafft-Czepa, H., Noegel, A. A., Schleicher, M. and Humbel, B. M. (1990). Membrane-enclosed crystals in Dictyostelium discoideum cells, consisting of developmentally regulated proteins with sequence similarities to known esterases. *J Cell Biol* **110**, 669-79.

Borisova-Todorova, B. (2006). DNA Methylierung in *Dictyostelium discoideum*.

Braun, V., Hantke, K., Wolff, H. and Gerisch, G. (1972). Degradation of the murein-lipoprotein complex of Escherichia coli cell walls by Dictyostelium amoebae. *Eur J Biochem* **27**, 116-25.

Brock, D. A. and Gomer, R. H. (1999). A cell-counting factor regulating structure size in Dictyostelium. *Genes Dev* **13**, 1960-9.

- Buczynski, G., Bush, J., Zhang, L., Rodriguez-Paris, J. and Cardelli, J.** (1997a). 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* **8**, 1343-60.
- Buczynski, G., Grove, B., Nomura, A., Kleve, M., Bush, J., Firtel, R. A. and Cardelli, J.** (1997b). Inactivation of two *Dictyostelium discoideum* genes, DdPIK1 and DdPIK2, encoding proteins related to mammalian phosphatidylinositide 3-kinases, results in defects in endocytosis, lysosome to postlysosome transport, and actin cytoskeleton organization. *J Cell Biol* **136**, 1271-86.
- Cardelli, J.** (2001). Phagocytosis and macropinocytosis in *Dictyostelium*: phosphoinositide- based processes, biochemically distinct. *Traffic* **2**, 311-20.
- Cardelli, J. A., Bush, J. M., Ebert, D. and Freeze, H. H.** (1990). 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* **265**, 8847-53.
- Charette, S. J. and Cosson, P.** (2004). Preparation of genomic DNA from *Dictyostelium discoideum* for PCR analysis. *Biotechniques* **36**, 574-5.
- Chien, A., Edgar, D. B. and Trela, J. M.** (1976). Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile *Thermus aquaticus*. *J Bacteriol* **127**, 1550-7.
- Chomczynski, P. and Sacchi, N.** (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* **162**, 156-9.
- Chubb, J. R. and Insall, R. H.** (2001). *Dictyostelium*: an ideal organism for genetic dissection of Ras signalling networks. *Biochim Biophys Acta* **1525**, 262-71.
- Chubb, J. R., Wilkins, A., Thomas, G. M. and Insall, R. H.** (2000). The *Dictyostelium* RasS protein is required for macropinocytosis, phagocytosis and the control of cell movement. *J Cell Sci* **113** (Pt 4), 709-19.
- Chung, C. Y., Funamoto, S. and Firtel, R. A.** (2001). Signaling pathways controlling cell polarity and chemotaxis. *Trends Biochem Sci* **26**, 557-66.
- Clarke, M. and Kayman, S. C.** (1987). The axenic mutations and endocytosis in *Dictyostelium*. *Methods Cell Biol* **28**, 157-76.
- Clarke, M., Kohler, J., Arana, Q., Liu, T., Heuser, J. and Gerisch, G.** (2002). Dynamics of the vacuolar H(+)-ATPase in the contractile vacuole complex and the endosomal pathway of *Dictyostelium* cells. *J Cell Sci* **115**, 2893-905.
- Clarke, M. and Maddera, L.** (2006). Phagocyte meets prey: uptake, internalization, and killing of bacteria by *Dictyostelium amoebae*. *Eur J Cell Biol* **85**, 1001-10.
- Cohen, C. J., Bacon, R., Clarke, M., Joiner, K. and Mellman, I.** (1994). *Dictyostelium discoideum* mutants with conditional defects in phagocytosis. *J Cell Biol* **126**, 955-66.
- Cornillon, S., Dubois, A., Bruckert, F., Lefkir, Y., Marchetti, A., Benghezal, M., De Lozanne, A., Letourneur, F. and Cosson, P.** (2002). Two members of the beige/CHS (BEACH) family are involved at different stages in the organization of the endocytic pathway in *Dictyostelium*. *J Cell Sci* **115**, 737-44.
- Cornillon, S., Pech, E., Benghezal, M., Ravanel, K., Gaynor, E., Letourneur, F., Bruckert, F. and Cosson, P.** (2000). Phg1p is a nine-transmembrane protein superfamily member involved in *dictyostelium* adhesion and phagocytosis. *J Biol Chem* **275**, 34287-92.

- Cox, D., Wessels, D., Soll, D. R., Hartwig, J. and Condeelis, J.** (1996). Re-expression of ABP-120 rescues cytoskeletal, motility, and phagocytosis defects of ABP-120- Dictyostelium mutants. *Mol Biol Cell* **7**, 803-23.
- Cox, E. C., Vocke, C. D., Walter, S., Gregg, K. Y. and Bain, E. S.** (1990). Electrophoretic karyotype for Dictyostelium discoideum. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 8247-51.
- de la Roche, M., Mahasneh, A., Lee, S. F., Rivero, F. and Cote, G. P.** (2005). Cellular distribution and functions of wild-type and constitutively activated Dictyostelium PakB. *Mol Biol Cell* **16**, 238-47.
- Dimond, R. L., Burns, R. A. and Jordan, K. B.** (1981). Secretion of Lysosomal enzymes in the cellular slime mold, Dictyostelium discoideum. *J Biol Chem* **256**, 6565-72.
- Dormann, D., Weijer, G., Dowler, S. and Weijer, C. J.** (2004). In vivo analysis of 3-phosphoinositide dynamics during Dictyostelium phagocytosis and chemotaxis. *J Cell Sci* **117**, 6497-509.
- Drengk, A., Fritsch, J., Schmauch, C., Ruhling, H. and Maniak, M.** (2003). A coat of filamentous actin prevents clustering of late-endosomal vacuoles in vivo. *Curr Biol* **13**, 1814-9.
- Duleh, S. N., Collins, J. T. and Pope, R. K.** (2006). Morphological and functional analysis of Rac1B in Dictyostelium discoideum. *J Electron Microsc (Tokyo)*.
- Durrwang, U., Fujita-Becker, S., Erent, M., Kull, F. J., Tsiavaliaris, G., Geeves, M. A. and Manstein, D. J.** (2006). Dictyostelium myosin-IE is a fast molecular motor involved in phagocytosis. *J Cell Sci* **119**, 550-8.
- Dyrskjot, L., Thykjaer, T., Kruhoffer, M., Jensen, J. L., Marcussen, N., Hamilton-Dutoit, S., Wolf, H. and Orntoft, T. F.** (2003). Identifying distinct classes of bladder carcinoma using microarrays. *Nat Genet* **33**, 90-6.
- Eichinger, L., Lee, S. S. and Schleicher, M.** (1999). Dictyostelium as model system for studies of the actin cytoskeleton by molecular genetics. *Microsc Res Tech* **47**, 124-34.
- Eichinger, L., Pachebat, J. A., Glockner, G., Rajandream, M. A., Sucgang, R., Berriman, M., Song, J., Olsen, R., Szafranski, K., Xu, Q. et al.** (2005). The genome of the social amoeba Dictyostelium discoideum. *Nature* **435**, 43-57.
- Escalante, R., Iranfar, N., Sastre, L. and Loomis, W. F.** (2004). Identification of genes dependent on the MADS box transcription factor SrfA in Dictyostelium discoideum development. *Eukaryot Cell* **3**, 564-6.
- Farbrother, P., Wagner, C., Na, J., Tunggal, B., Morio, T., Urushihara, H., Tanaka, Y., Schleicher, M., Steinert, M. and Eichinger, L.** (2006). Dictyostelium transcriptional host cell response upon infection with Legionella. *Cell Microbiol* **8**, 438-56.
- Gebbie, L., Benghezal, M., Cornillon, S., Froquet, R., Cherix, N., Malbouyres, M., Lefkir, Y., Grangeasse, C., Fache, S., Dalous, J. et al.** (2004). Phg2, a kinase involved in adhesion and focal site modeling in Dictyostelium. *Mol Biol Cell* **15**, 3915-25.
- Gerisch, G., Hulser, D., Malchow, D. and Wick, U.** (1975). Cell communication by periodic cyclic-AMP pulses. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **272**, 181-92.
- Gieselmann, V.** (1995). Lysosomal storage diseases. *Biochim Biophys Acta* **1270**, 103-36.
- Gotthardt, D., Blancheteau, V., Bosserhoff, A., Ruppert, T., Delorenzi, M. and Soldati, T.** (2006). Proteomic fingerprinting of phagosome maturation and evidence for the role of a Galpha during uptake. *Mol Cell Proteomics*.

- Gotthardt, D., Warnatz, H. J., Henschel, O., Bruckert, F., Schleicher, M. and Soldati, T.** (2002). High-resolution dissection of phagosome maturation reveals distinct membrane trafficking phases. *Mol Biol Cell* **13**, 3508-20.
- Graf, R., Dauderer, C. and Schliwa, M.** (2000). Dictyostelium DdCP224 is a microtubule-associated protein and a permanent centrosomal resident involved in centrosome duplication. *J Cell Sci* **113** (Pt 10), 1747-58.
- Gupta, D. K., Theisen, N., von Figura, K. and Hasilik, A.** (1985). Comparison of biosynthesis and subcellular distribution of lysozyme and lysosomal enzymes in U937 monocytes. *Biochim Biophys Acta* **847**, 217-22.
- Hacker, U., Albrecht, R. and Maniak, M.** (1997). Fluid-phase uptake by macropinocytosis in Dictyostelium. *J Cell Sci* **110**, 105-12.
- Hanahan, D.** (1983). Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. *J Mol Biol* **166**, 557-80.
- Harris, E. and Cardelli, J.** (2002). RabD, a Dictyostelium Rab14-related GTPase, regulates phagocytosis and homotypic phagosome and lysosome fusion. *J Cell Sci* **115**, 3703-13.
- Harris, E., Wang, N., Wu Wl, W. L., Weatherford, A., De Lozanne, A. and Cardelli, J.** (2002). Dictyostelium LvsB mutants model the lysosomal defects associated with Chediak-Higashi syndrome. *Mol Biol Cell* **13**, 656-69.
- Hata, T., Takahashi, M., Tanaka, Y. and Urushihara, H.** (2001). Total tetra knockout of GP138 multigene family implicated in cell interactions in Dictyostelium discoideum. *Gene* **271**, 33-42.
- Higgs, H. N. and Pollard, T. D.** (2001). Regulation of actin filament network formation through ARP2/3 complex: activation by a diverse array of proteins. *Annu Rev Biochem* **70**, 649-76.
- Hohmann, H. P., Bozzaro, S., Yoshida, M., Merkl, R. and Gerisch, G.** (1987). Two-step glycosylation of the contact site A protein of Dictyostelium discoideum and transport of an incompletely glycosylated form to the cell surface. *J Biol Chem* **262**, 16618-24.
- Howard, P. K., Ahern, K. G. and Firtel, R. A.** (1988). Establishment of a transient expression system for Dictyostelium discoideum. *Nucleic Acids Res* **16**, 2613-23.
- Insall, R., Muller-Taubenberger, A., Machesky, L., Kohler, J., Simmeth, E., Atkinson, S. J., Weber, I. and Gerisch, G.** (2001). Dynamics of the Dictyostelium Arp2/3 complex in endocytosis, cytokinesis, and chemotaxis. *Cell Motil Cytoskeleton* **50**, 115-28.
- Iranfar, N., Fuller, D. and Loomis, W. F.** (2003). Genome-wide expression analyses of gene regulation during early development of Dictyostelium discoideum. *Eukaryot Cell* **2**, 664-70.
- Jenne, N., Rauchenberger, R., Hacker, U., Kast, T. and Maniak, M.** (1998). Targeted gene disruption reveals a role for vacuolin B in the late endocytic pathway and exocytosis. *J Cell Sci* **111** (Pt 1), 61-70.
- Johnston, J. A., Ward, C. L. and Kopito, R. R.** (1998). Aggresomes: a cellular response to misfolded proteins. *J Cell Biol* **143**, 1883-98.
- Jolles, P. and Jolles, J.** (1984). What's new in lysozyme research? Always a model system, today as yesterday. *Mol Cell Biochem* **63**, 165-89.

- Journet, A., Chapel, A., Jehan, S., Adessi, C., Freeze, H., Klein, G. and Garin, J.** (1999). Characterization of Dictyostelium discoideum cathepsin D. *J Cell Sci* **112**, 3833-43.
- Khurana, T., Brzostowski, J. A. and Kimmel, A. R.** (2005). A Rab21/LIM-only/CH-LIM complex regulates phagocytosis via both activating and inhibitory mechanisms. *Embo J*.
- Konzok, A., Weber, I., Simmeth, E., Hacker, U., Maniak, M. and Muller-Taubenberger, A.** (1999). DAip1, a Dictyostelium homologue of the yeast actin-interacting protein 1, is involved in endocytosis, cytokinesis, and motility. *J Cell Biol* **146**, 453-64.
- Kuhlmann, M., Borisova, B. E., Kaller, M., Larsson, P., Stach, D., Na, J., Eichinger, L., Lyko, F., Ambros, V., Soderbom, F. et al.** (2005). Silencing of retrotransposons in Dictyostelium by DNA methylation and RNAi. *Nucleic Acids Res* **33**, 6405-17.
- Lee, E. and Knecht, D. A.** (2002). Visualization of actin dynamics during macropinocytosis and exocytosis. *Traffic* **3**, 186-92.
- Lee, E., Pang, K. and Knecht, D.** (2001). The regulation of actin polymerization and cross-linking in Dictyostelium. *Biochim Biophys Acta* **1525**, 217-27.
- Lefkir, Y., De Chasse, B., Dubois, A., Bogdanovic, A., Brady, R. J., Destaing, O., Bruckert, F., O'Halloran, T. J., Cosson, P. and Letourneur, F.** (2003). The AP-1 Clathrin-adaptor Is Required for Lysosomal Enzymes Sorting and Biogenesis of the Contractile Vacuole Complex in Dictyostelium Cells. *Mol Biol Cell* **14**, 1835-51.
- Lefkir, Y., Malbouyres, M., Gotthardt, D., Ozinsky, A., Cornillon, S., Bruckert, F., Aderem, A. A., Soldati, T., Cosson, P. and Letourneur, F.** (2004). Involvement of the AP-1 adaptor complex in early steps of phagocytosis and macropinocytosis. *Mol Biol Cell* **15**, 861-9.
- Leippe, M.** (1999). Antimicrobial and cytolytic polypeptides of amoeboid protozoa--effector molecules of primitive phagocytes. *Dev Comp Immunol* **23**, 267-79.
- Lim, C. J., Zawadzki, K. A., Khosla, M., Secko, D. M., Spiegelman, G. B. and Weeks, G.** (2005). Loss of the Dictyostelium RasC protein alters vegetative cell size, motility and endocytosis. *Exp Cell Res* **306**, 47-55.
- Liu, S. H., W. G. Mallet, et al.** (2001). Clathrin-mediated endocytosis.
- Loomis, W. F. and Smith, D. W.** (1995). Consensus phylogeny of Dictyostelium. *Experientia* **51**, 1110-5.
- Malchow, D., Nagele, B., Schwarz, H. and Gerisch, G.** (1972). Membrane-bound cyclic AMP phosphodiesterase in chemotactically responding cells of Dictyostelium discoideum. *Eur J Biochem* **28**, 136-42.
- Maniak, M.** (1999). Endocytic transit in *Dictyostelium discoideum*. *Protoplasma*, 25-30.
- Maniak, M.** (2001). Fluid-phase uptake and transit in axenic Dictyostelium cells. *Biochim Biophys Acta* **1525**, 197-204.
- Maniak, M.** (2003). Fusion and fission events in the endocytic pathway of Dictyostelium. *Traffic* **4**, 1-5.
- Maniak, M., Rauchenberger, R., Albrecht, R., Murphy, J. and Gerisch, G.** (1995). Coronin involved in phagocytosis: dynamics of particle-induced relocalization visualized by a green fluorescent protein Tag. *Cell* **83**, 915-24.

- Markart, P., Faust, N., Graf, T., Na, C. L., Weaver, T. E. and Akinbi, H. T.** (2004). Comparison of the microbicidal and muramidase activities of mouse lysozyme M and P. *Biochem J* **380**, 385-92.
- Martens, H., Novotny, J., Oberstrass, J., Steck, T. L., Postlethwait, P. and Nellen, W.** (2002). RNAi in Dictyostelium: the role of RNA-directed RNA polymerases and double-stranded RNase. *Mol Biol Cell* **13**, 445-53.
- Maselli, A., Laevsky, G. and Knecht, D. A.** (2002). Kinetics of binding, uptake and degradation of live fluorescent (DsRed) bacteria by Dictyostelium discoideum. *Microbiology* **148**, 413-20.
- Mayer, B. J.** (2001). SH3 domains: complexity in moderation. *J Cell Sci* **114**, 1253-63.
- Monnat, J., Hacker, U., Geissler, H., Rauchenberger, R., Neuhaus, E. M., Maniak, M. and Soldati, T.** (1997). Dictyostelium discoideum protein disulfide isomerase, an endoplasmic reticulum resident enzyme lacking a KDEL-type retrieval signal. *FEBS Lett* **418**, 357-62.
- Morio, T., Urushihara, H., Saito, T., Ugawa, Y., Mizuno, H., Yoshida, M., Yoshino, R., Mitra, B. N., Pi, M., Sato, T. et al.** (1998). The Dictyostelium developmental cDNA project: generation and analysis of expressed sequence tags from the first-finger stage of development. *DNA Res* **5**, 335-40.
- Morrison, A., Marschalek, R., Dingermann, T. and Harwood, A. J.** (1997). A novel, negative selectable marker for gene disruption in Dictyostelium. *Gene* **202**, 171-6.
- Müller, I.** (2002). Biologische Charakterisierung von Lysozym in *Dictyostelium discoideum*.
- Müller, I., Subert, N., Otto, H., Herbst, R., Ruhling, H., Maniak, M. and Leippe, M.** (2005). A Dictyostelium mutant with reduced lysozyme levels compensates by increased phagocytic activity. *J Biol Chem* **280**, 10435-43.
- Nellen, W., Hildebrandt, M., Mahal, B., Mohrle, A., Kroger, P., Maniak, M., Oberhauser, R. and Sadiq, M.** (1992). Mechanisms of gene regulation by endogenous and artificially introduced antisense RNA. *Biochem Soc Trans* **20**, 750-4.
- Nellen, W., Silan, C. and Firtel, R. A.** (1984). DNA-mediated transformation in Dictyostelium discoideum: regulated expression of an actin gene fusion. *Mol Cell Biol* **4**, 2890-8.
- Neuhaus, E. M., Almers, W. and Soldati, T.** (2002). Morphology and dynamics of the endocytic pathway in Dictyostelium discoideum. *Mol Biol Cell* **13**, 1390-407.
- Neuhaus, E. M., Horstmann, H., Almers, W., Maniak, M. and Soldati, T.** (1998). Ethane-freezing/methanol-fixation of cell monolayers: a procedure for improved preservation of structure and antigenicity for light and electron microscopies. *J Struct Biol* **121**, 326-42.
- Nickel, R., Jacobs, T. and Leippe, M.** (1998). Molecular characterization of an exceptionally acidic lysozyme-like protein from the protozoon Entamoeba histolytica. *FEBS Lett* **437**, 153-7.
- Noegel, A. A. and Schleicher, M.** (2000). The actin cytoskeleton of Dictyostelium: a story told by mutants. *J Cell Sci* **113**, 759-66.
- Padh, H., Ha, J., Lavasa, M. and Steck, T. L.** (1993). A post-lysosomal compartment in Dictyostelium discoideum. *J Biol Chem* **268**, 6742-7.
- Peracino, B., Borleis, J., Jin, T., Westphal, M., Schwartz, J. M., Wu, L., Bracco, E., Gerisch, G., Devreotes, P. and Bozzaro, S.** (1998). G protein beta subunit-

null mutants are impaired in phagocytosis and chemotaxis due to inappropriate regulation of the actin cytoskeleton. *J Cell Biol* **141**, 1529-37.

Rajeevan, M. S., Ranamukhaarachchi, D. G., Vernon, S. D. and Unger, E. R. (2001). Use of real-time quantitative PCR to validate the results of cDNA array and differential display PCR technologies. *Methods* **25**, 443-51.

Ralph, P., Moore, M. A. and Nilsson, K. (1976). Lysozyme synthesis by established human and murine histiocytic lymphoma cell lines. *J Exp Med* **143**, 1528-33.

Raper, K. B. (1935). *Dictyostelium discoideum*, a new species of slime mold from decaying forest leaves.

Raper, K. B. and Smith, N. R. (1939). The Growth of *Dictyostelium discoideum* upon Pathogenic Bacteria. *J Bacteriol* **38**, 431-45.

Rauchenberger, R., Hacker, U., Murphy, J., Niewohner, J. and Maniak, M. (1997). Coronin and vacuolin identify consecutive stages of a late, actin-coated endocytic compartment in *Dictyostelium*. *Curr Biol* **7**, 215-8.

Rivero, F., Albrecht, R., Dislich, H., Bracco, E., Graciotti, L., Bozzaro, S. and Noegel, A. A. (1999). RacF1, a novel member of the Rho protein family in *Dictyostelium discoideum*, associates transiently with cell contact areas, macropinosomes, and phagosomes. *Mol Biol Cell* **10**, 1205-19.

Rivero, F. and Maniak, M. (2006). Quantitative and microscopic methods for studying the endocytic pathway. *Methods Mol Biol* **346**, 423-38.

Rivero, F. and Somesh, B. P. (2002). Signal transduction pathways regulated by Rho GTPases in *Dictyostelium*. *J Muscle Res Cell Motil* **23**, 737-49.

Rouille, Y., Rohn, W. and Hoflack, B. (2000). Targeting of lysosomal proteins. *Semin Cell Dev Biol* **11**, 165-71.

Rupper, A. and Cardelli, J. (2001). Regulation of phagocytosis and endo-phagosomal trafficking pathways in *Dictyostelium discoideum*. *Biochim Biophys Acta* **1525**, 205-16.

Rupper, A., Grove, B. and Cardelli, J. (2001a). Rab7 regulates phagosome maturation in *Dictyostelium*. *J Cell Sci* **114**, 2449-60.

Rupper, A., Lee, K., Knecht, D. and Cardelli, J. (2001b). Sequential activities of phosphoinositide 3-kinase, PKB/Akt, and Rab7 during macropinosome formation in *Dictyostelium*. *Mol Biol Cell* **12**, 2813-24.

Rybakin, V. and Clemen, C. S. (2005). Coronin proteins as multifunctional regulators of the cytoskeleton and membrane trafficking. *Bioessays* **27**, 625-32.

Rybin, V., Ullrich, O., Rubino, M., Alexandrov, K., Simon, I., Seabra, M. C., Goody, R. and Zerial, M. (1996). GTPase activity of Rab5 acts as a timer for endocytic membrane fusion. *Nature* **383**, 266-9.

Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. A. and Arnheim, N. (1985). Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* **230**, 1350-4.

Schreiner, T., Mohrs, M. R., Blau-Wasser, R., von Krempelhuber, A., Steinert, M., Schleicher, M. and Noegel, A. A. (2002). Loss of the F-actin binding and vesicle-associated protein comitin leads to a phagocytosis defect. *Eukaryot Cell* **1**, 906-14.

Seachrist, J. L. and Ferguson, S. S. (2003). Regulation of G protein-coupled receptor endocytosis and trafficking by Rab GTPases. *Life Sci* **74**, 225-35.

Seastone, D. J., Harris, E., Temesvari, L. A., Bear, J. E., Saxe, C. L. and Cardelli, J. (2001). The WASp-like protein scar regulates macropinocytosis, phagocytosis and endosomal membrane flow in *Dictyostelium*. *J Cell Sci* **114**, 2673-83.

Seastone, D. J., Lee, E., Bush, J., Knecht, D. and Cardelli, J. (1998). Overexpression of a novel rho family GTPase, RacC, induces unusual actin-based structures and positively affects phagocytosis in *Dictyostelium discoideum*. *Mol Biol Cell* **9**, 2891-904.

Seastone, D. J., Zhang, L., Buczynski, G., Rebstein, P., Weeks, G., Spiegelman, G. and Cardelli, J. (1999). The small Mr Ras-like GTPase Rap1 and the phospholipase C pathway act to regulate phagocytosis in *Dictyostelium discoideum*. *Mol Biol Cell* **10**, 393-406.

Secko, D. M., Insall, R. H., Spiegelman, G. B. and Weeks, G. (2004). The identification of *Dictyostelium* phosphoproteins altered in response to the activation of RasG. *Proteomics* **4**, 2629-39.

Simpson, P. A., Spudich, J. A. and Parham, P. (1984). Monoclonal antibodies prepared against *Dictyostelium* actin: characterization and interactions with actin. *J Cell Biol* **99**, 287-95.

Singh, S. S., Chauhan, A., Murakami, N. and Chauhan, V. P. (1996). Profilin and gelsolin stimulate phosphatidylinositol 3-kinase activity. *Biochemistry* **35**, 16544-9.

Singleton, C. K., Delude, R. L. and McPherson, C. E. (1987). Characterization of genes which are deactivated upon the onset of development in *Dictyostelium discoideum*. *Dev Biol* **119**, 433-41.

Singleton, C. K., Manning, S. S. and Feng, Y. (1988). Effect of protein synthesis inhibition on gene expression during early development of *Dictyostelium discoideum*. *Mol Cell Biol* **8**, 10-6.

Somesh, B. P., Neffgen, C., Iijima, M., Devreotes, P. and Rivero, F. (2006). *Dictyostelium* RacH regulates endocytic vesicular trafficking and is required for localization of vacuolin. *Traffic* **7**, 1194-212.

Souza, G. M., Mehta, D. P., Lammertz, M., Rodriguez-Paris, J., Wu, R., Cardelli, J. A. and Freeze, H. H. (1997). *Dictyostelium* lysosomal proteins with different sugar modifications sort to functionally distinct compartments. *J Cell Sci* **110** (Pt 18), 2239-48.

Stolle, C. (2005). Untersuchung möglicher Komponenten des Signalweges zwischen lysosomaler Verdauung und Cytoskelett-Aktivität bei der Phagozytose in *Dictyostelium discoideum*.

Strehle, A., Schleicher, M. and Faix, J. (2006). Trix, a novel Rac guanine-nucleotide exchange factor from *Dictyostelium discoideum* is an actin-binding protein and accumulates at endosomes. *Eur J Cell Biol* **85**, 1035-45.

Takai, Y., Sasaki, T. and Matozaki, T. (2001). Small GTP-binding proteins. *Physiol Rev* **81**, 153-208.

Temesvari, L., Zhang, L., Fodera, B., Janssen, K. P., Schleicher, M. and Cardelli, J. A. (2000). Inactivation of ImpA, encoding a LIMP-II-related endosomal protein, suppresses the internalization and endosomal trafficking defects in profilin-null mutants. *Mol Biol Cell* **11**, 2019-31.

Troll, H., Malchow, D., Muller-Taubenberger, A., Humbel, B., Lottspeich, F., Ecke, M., Gerisch, G., Schmid, A. and Benz, R. (1992). Purification, functional

characterization, and cDNA sequencing of mitochondrial porin from *Dictyostelium discoideum*. *J Biol Chem* **267**, 21072-9.

Tusher, V. G., Tibshirani, R. and Chu, G. (2001). Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 5116-21.

Tyynela, J., Sohar, I., Sleat, D. E., Gin, R. M., Donnelly, R. J., Baumann, M., Haltia, M. and Lobel, P. (2000). A mutation in the ovine cathepsin D gene causes a congenital lysosomal storage disease with profound neurodegeneration. *Embo J* **19**, 2786-92.

Utrecht, A. C. and Bear, J. E. (2006). Coronins: the return of the crown. *Trends Cell Biol* **16**, 421-6.

Unal, C. and Steinert, M. (2006). *Dictyostelium discoideum* as a model to study host-pathogen interactions. *Methods Mol Biol* **346**, 507-15.

Urushihara, H., Morio, T., Saito, T., Kohara, Y., Koriki, E., Ochiai, H., Maeda, M., Williams, J. G., Takeuchi, I. and Tanaka, Y. (2004). Analyses of cDNAs from growth and slug stages of *Dictyostelium discoideum*. *Nucleic Acids Res* **32**, 1647-53.

Vogel, G., Thilo, L., Schwarz, H. and Steinhart, R. (1980). Mechanism of phagocytosis in *Dictyostelium discoideum*: phagocytosis is mediated by different recognition sites as disclosed by mutants with altered phagocytotic properties. *J Cell Biol* **86**, 456-65.

von Figura, K. and Hasilik, A. (1986). Lysosomal enzymes and their receptors. *Annu Rev Biochem* **55**, 167-93.

Watts, D. J. and Ashworth, J. M. (1970). Growth of myxameobae of the cellular slime mould *Dictyostelium discoideum* in axenic culture. *Biochem J* **119**, 171-4.

Winchester, B., Vellodi, A. and Young, E. (2000). The molecular basis of lysosomal storage diseases and their treatment. *Biochem Soc Trans* **28**, 150-4.

Xu, Q., Ibarra, M., Mahadeo, D., Shaw, C., Huang, E., Kuspa, A., Cotter, D. and Shaulsky, G. (2004). Transcriptional transitions during *Dictyostelium* spore germination. *Eukaryot Cell* **3**, 1101-10.

Yuan, A. and Chia, C. P. (2000). Role of esterase gp70 and its influence on growth and development of *Dictyostelium discoideum*. *Exp Cell Res* **261**, 336-47.

Yuan, A., Siu, C. H. and Chia, C. P. (2001). Calcium requirement for efficient phagocytosis by *Dictyostelium discoideum*. *Cell Calcium* **29**, 229-38.

Zhang, X. (2006). On the function of the *Dictyostelium* Argonaute A protein (AgnA) in epigenetic gene regulation.

Zhou, K., Takegawa, K., Emr, S. D. and Firtel, R. A. (1995). A phosphatidylinositol (PI) kinase gene family in *Dictyostelium discoideum*: biological roles of putative mammalian p110 and yeast Vps34p PI 3-kinase homologs during growth and development. *Mol Cell Biol* **15**, 5645-56.

8 Anhang

A1) Ergebnisse der Microarray-Analysen der alyA138 Knockout-Mutante:

Negative significant genes alyA138 knockout mutant	Factor	Dicty Base Number	(predicted) Function
SSB389	3,3	DDB0218503	unknown
SSI845	2,0	NO HIT	
VSF392	1,8		unknown
SSK687	2,8	DDB0215459	unknown
SSF615	2,4	DDB0231278	alyB
SSE346	2,1	DDB0167826	Signalpeptide
SSL878	1,8		NO HIT
VSJ403	2,0	DDB0167417	Hypothetical protein
SSJ693	2,7	DDB0231686	AAA ATPase domain-containing protein involved in O-glycosylation as identified by mRNA differential display
VSI401	1,7	DDB0191230	<i>abcG3</i> ABC transporter G family protein full transporter, consisting of two ABC domains and two transmembrane domains
SSJ758	1,6	DDB0167628	3 SH3 domains
SLA566	2,0	DDB0215341	<i>tipD</i> homolog of mouse apg16L sequence similarity to Beta-transducin family repeats tip = required for TIP formation
SLB350	2,0	DDB0185738	HSP20-like chaperone
positive significant genes alyA138 knockout mutant			
SSC656	2,0	DDB0187546	P14326 Vegetative specific protein H5 Esterase/lipase/thioesterase domain
VSA360	2,3	DDB0167572	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolases family 2 profile
H5	2,0		P14326 Vegetative specific protein H5 Esterase/lipase/thioesterase Domäne
VSI664	1,7	DDB0231683	similar to tunicate proteins; involved in O-glycosylation as identified by mRNA

			differential display
SSL850	1,8	DDB0231688	<i>DD7-1</i> galactose-binding domain-containing protein similar to discoidin I; involved in O-glycosylation as identified by mRNA differential display
SSL826	1,6	NO HIT	
SSB420	1,8	DDB0219925	<i>cbpD1</i> calcium-binding protein contains four EF-hands; expressed in post-aggregation stage of development
SSD485	1,4	DDB0218583	Signalpeptide 4 transmembrane domins GPI anchor
VSD763	1,5	NO HIT	
VSE554	1,6	DDB0168878	Hypothetical protein
SSF680	1,5	DDB0217242	Similar to Dictyostelium discoideum (Slime mold). vacuolar ATP synthase subunit d (EC 3.6.1.34) (V-ATPase d subunit) (Vacuolar proton pump d subunit) (V-ATPase 41 kDa accessory protein) (DVA41).
V4b	2,1	DDB0215343	<i>ImcB</i> vegetative-specific gene repressed at the onset of development
SSL793	1,6	DDB0217455	Similar to Ralstonia solanacearum (Pseudomonas solanacearum). probable alcohol dehydrogenase (ADH-HT) oxidoreductase protein (EC 1.1.1.1).
VSI585	2,0	DDB0202716	Q9P1F3 Protein C6orf115
V4a	1,7	DDB0216253	<i>ImcA</i> vegetative-specific gene repressed at the onset of development
SSI119	1,7	DDB0217453	Similar to Xenopus laevis (African clawed frog). glutathione s-transferase
SSD764	1,6	DDB0229922	sf3a3 = Splicing Factor 3A subunit 3 C2H2-type Zn finger-containing protein splicing factor 3A subunit 3
SSD673	2,1	DDB0205051	Signal peptide predicted

SSH136	1,6	DDB0217402	P02889 Probable 26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 8 (Vegetative cell protein X) (M4 protein)
SSB518	1,6	DDB0232957	<i>psmB1</i> proteasome subunit beta type 1
SLI144	1,5	DDB0217424	Similar to Dictyostelium discoideum (Slime mold). CABP1-related protein P31/P34

A2) Ergebnisse der Microarray-Analysen des Gp70 Überexprimierers:

negative significant genes Gp70 overexpressor	Factor	Dicty Base Number	(predicted) Function
V4a	3,7	DDB0216253	<i>ImcA</i> vegetative-specific gene repressed at the onset of development
VSA166	2,8	NO HIT	
V4b	3,3	DDB0215343	<i>ImcB</i> vegetative-specific gene repressed at the onset of development
SSL850	2,0	DDB0231688	<i>DD7-1</i> galactose-binding domain-containing protein similar to discoidin I; involved in O-glycosylation as identified by mRNA differential display
VSH356	2,3	DDB0215343	<i>ImcB</i> vegetative-specific gene repressed at the onset of development
SSJ758	1,6	DDB0167628	3 SH3 Domänen
SSE346	1,6	DDB0167826	Signal peptid
VSE458	1,6	DDB0167477	Signal peptid Frizzled CRD (cysteine rich domain)
SSL845	1,6	NO HIT	
SSL878	1,5	NO HIT	
SSB389	1,6	DDB0218503	unknown
Disc-Ic	1,7		Discoidein
SSB153	1,7	DDB0233913	conserved hypothetical Dictyostelium protein
SLA566	1,5	DDB0215341	<i>tipD</i>

			homolog of mouse tip = required for TIP formation
SLB350	1,5	DDB0185738	HSP20-like chaperone
VSB882	1,5	DDB0168627	Signal peptid Cytidine and deoxycytidylate deaminase zinc-binding region
SSA288	1,5	NO HIT	
VSI401	1,4	DDB0191230	<i>abcG3</i> ABC transporter G family protein full transporter, consisting of two ABC domains and two transmembrane domains
Positive signifikant genes Gp70 overexpressor			
SSD310	9,1	DDB0186566	Probable esterase D2 precursor Signal peptid Carboxyletsrase Esterase/lipase/thioesterase
CP	18,4	DDB0191254	crystal protein signal peptid carboxyletsrase Esterase/lipase/thioesterase
SSH819	1,5	DDB0204543	Yip1 domain Predicted Transmembran Domänen
SSA437	1,5	DDB0188290	Hypotetisches Protein
SSD259	1,5	NO HIT	
SLA802	1,5	DDB0218006	Cyclin like

Danksagung

Als erstes möchte ich mich bei Markus Maniak dafür bedanken, dass er es mir ermöglicht hat, meine Promotion in der Abteilung Zellbiologie anzufertigen. Für viele gute Tipps und Diskussionen, aber auch für alles andere.

Bei Wolfgang Nellen möchte ich mich für die Übernahme des Zweitgutachtens, aber auch für so manch Hilfestellung bedanken.

Ludwig danke ich für die großartige Unterstützung bei der Durchführung der Microarrays und Diskussionen der Ergebnisse.

Der Abteilung Biochemie insbesondere Oliver Bertinetti danke ich für die Durchführung der Massenspektrometrie.

Harald Rühling danke ich für so manche Rettung bei unlösbar erscheinenden technischen Problemen.

Bei Heike Otto möchte ich mich für die Vorarbeiten zu meinem Projekt bedanken.

Bei Brani möchte ich mich für die gute Einführung in die Northern Blot-Technik und die immer wieder aufkommenden Diskussionen darüber bedanken.

Der Abteilung Genetik und der Abteilung Entwicklungsbiologie möchte ich im Allgemeinen danken. Für viele Unterhaltungen zwischen der Arbeit (wissenschaftlicher Art oder auch nicht) und großer Hilfsbereitschaft, wenn in den Abteilungseigenen Schränken mal wieder gerade genau das nicht da ist, was man ja gerade ach so dringend braucht.

Allen Mitgliedern (und auch ehemaligen) meiner Abteilung möchte ich für eine wunderschöne Zeit danken. Ihr seid alle super und ich werde euch vermissen.

Zum Schluss möchte ich mich bei meiner Familie und meinen Freunden bedanken. Insbesondere dafür, dass ihr alle für mich da ward, als ich euch wirklich ganz dringend brauchte. Danke!