

# Biologische Charakterisierung von LC-FACS-Proteinen in Dictyostelium discoideum

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

im Fachbereich 18 Naturwissenschaften  
der  
Universität Kassel

vorgelegt von  
Nadine Pawolleck, geb. Schroeder  
aus Kassel

Kassel, November 2006



Für Pawo und meine Eltern

## Erklärung

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

Kassel im November 2006

---

Nadine Pawolleck

Inhaltsverzeichnis

0	Zusammenfassung .....	1
1	Einleitung .....	2
1.1	Der endozytotische Transit in Dictyostelium discoideum .....	2
1.1.1	Die Endozytose .....	2
1.1.2	Die frühe, saure Phase .....	3
1.1.3	Die späte, neutrale Phase .....	4
1.1.4	Die Exozytose .....	5
1.2	Der Lipid-Stoffwechsel .....	6
1.2.1	Aktivierung von Fettsäuren durch Acyl-CoA Synthetasen .....	6
1.2.2	LC-FACS-Proteine: ein Reaktionsschema, doch vielfältige Funktionen ....	7
1.2.3	Fettsäureimport in Mitochondrien .....	9
1.2.4	Fettsäureimport in Peroxisomen .....	9
1.2.5	Fettsäure-Speicherung in Lipidtröpfen .....	11
1.3	Proteinimport in Peroxisomen .....	12
1.3.1	Proteinimport luminaler peroxisomaler Proteine .....	13
1.3.2	Proteinimport von peroxisomalen Transmembran-Proteinen .....	14
1.3.3	Biogenese von Peroxisomen .....	15
1.4	Zielsetzung .....	17
2	Ergebnisse .....	19
2.1	Synthetische Effekte in LCFACS1/VacuolinB Doppelmutanten .....	19
2.1.1	Der Phänotyp der Doppelmutante wird im Vergleich zum Phänotyp der Vacuolin „Knock-Out“ Zellen partiell gerettet .....	19
2.1.2	Der Gehalt an Triglyceriden in fcsA <sup>-</sup> und vacB <sup>-</sup> /fcsA <sup>-</sup> ist reduziert .....	23
2.2	Gibt es eine LC-FACS in Dictyostelium, die Einfluss auf die Phagozytoserate hat? .....	24
2.3	Eine peroxisomale LC-FACS wird für den retrograden Trans- port von Fettsäuren in Dictyostelium benötigt und beein- flusst indirekt die Aufnahme von Partikeln .....	28
2.3.1	Die LCFACS2 ist ein Transmembran-Protein und lokalisiert in Peroxisomen .....	30
2.3.2	Herstellung von LC-FACS2-Mutanten .....	33
2.3.3	Die Fähigkeit zur Aufnahme und Reduktion extrazellulär angebotener Fettsäuren bleibt in fcsB <sup>-</sup> -Zellen erhalten .....	36
2.3.4	Der Weg einer Fluoreszenz-markierten Fettsäure in Dictyostelium .....	37
2.3.5	Die LC-FACS2 in Dictyostelium aktiviert Fettsäuren, deren Ziel oder Herkunft Lipidtröpfen sind .....	39
2.3.6	fcsB <sup>-</sup> -Zellen zeigen eine verringerte Phagozytoserate, jedoch keinen Wachstumsdefekt in bakterieller Suspension .....	40
2.3.7	Änderungen in der Menge der Neutral-Lipide haben auch in LC-FACS2 Mutanten Einfluss auf die Vorgänge am späten Endosom .....	44
2.3.8	GFP-LSD1 aus Dictyostelium lokalisiert auf Lipidtröpfen .....	46
2.3.9	Die Expression von GFP-LSD1 erhöht die Neutral-Lipid-Menge in bakteriell kultivierten Zellen .....	48
2.3.10	Die Expression von GFP-LSD1 hat Einfluss auf die Phagozytoserate und den endozytotischen Transit .....	49
3	Diskussion .....	52
3.1	Fehlende LC-FACS-Aktivität ruft Phänotypen im Triglycerid-Gehalt und der Endozytose hervor. ....	52
3.2	Die LC-FACS2 in Dictyostelium lokalisiert in Peroxisomen .....	53
3.3	Das Ziel von LC-FACS2 aktivierten Fettsäuren ist nicht die $\beta$ -Oxidation ....	55
3.4	Ein Pool aus Acyl-CoAs und unaktivierten Fettsäuren als Regulator zellulärer Prozesse .....	55
3.4.1	LC-FACS Proteine in Dictyostelium erzeugen einen Pool aus Fettsäuren 57	57

3.4.2	Nur eine Komponente des zweigeteilten Fettsäure-Pool reguliert die Phagozytoserate .....	59
3.5	Der Anteil an Acyl-CoAs in VacuolinB/LC-FACS1 Doppelmutanten ist reduziert. ....	61
3.6	Schlussfolgerung .....	64
4	Material .....	65
4.1	Geräte .....	65
4.2	Verbrauchsmaterial .....	66
4.3	Reagenzien .....	67
4.4	Puffer und Lösungen .....	69
4.5	Medien .....	73
4.6	Enzyme und Kits .....	75
4.7	Plasmide .....	76
4.8	Oligonukleotide .....	78
4.9	Antikörper .....	79
4.10	Fluoreszierende Reagenzien .....	80
4.11	Biologische Stämme .....	81
4.12	Verwendete Internet-Programme und Seiten .....	81
5	Methoden .....	82
5.1	Molekularbiologische Methoden .....	82
5.1.1	Präparation von Nukleinsäuren .....	82
5.1.2	“Polymerase Chain Reaktion” (PCR) .....	83
5.1.3	DNA-Spaltung durch Restriktionsendonukleasen .....	84
5.1.4	Klonierung eines DNA-Fragmentes .....	85
5.1.5	Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten .....	85
5.1.6	DNA-Isolierung aus Agarosegelen .....	86
5.1.7	Ligation von DNA-Fragmenten .....	86
5.2	Transformationstechniken .....	87
5.2.1	Transformationstechniken für E. coli .....	87
5.2.2	Transformationstechniken für Dictyostelium discoideum .....	87
5.3	Zellbiologische Methoden .....	89
5.3.1	Anzucht in Flüssigmedium .....	89
5.3.2	Subklonierung von Transformanden .....	89
5.3.3	Sporengewinnung und Konservierung .....	90
5.3.4	Endozytose-Assays .....	90
5.4	Mikroskopische Methoden .....	93
5.4.1	Fluoreszenzmikroskopie von lebenden Zellen .....	93
5.5	Präparation von Zellen für die Immunfluoreszenz (37) .....	93
5.5.1	DAPI-Färbung .....	94
5.6	Biochemische Methoden .....	94
5.6.1	Entnahme von Proteinproben .....	94
5.6.2	Membranassoziation nach (2) .....	95
5.6.3	Herstellung von diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamidgelen .....	95
5.6.4	Western-Blot .....	96
5.6.5	Immundetektion von Proteinen .....	96
5.6.6	Coomassie-Färbung von Polyacrylamidgelen .....	97
5.6.7	Aktivitätsbestimmung von LC-FACS-Proteinen .....	97
5.6.8	Aktivitätsmessung der $\alpha$ -Mannosidase und saure Phosphatase .....	98
5.6.9	Isolation von Lipiden aus Dictyostelium discoideum (5) .....	99
5.6.10	Trennung von Lipid-Klassen durch Dünnschicht-Chromatografie .....	99
5.6.11	Quantifizierung der Menge an Neutral-Lipiden, LT-Sys <sup>®</sup> .....	99
6	Abkürzungen .....	101
7	Literatur .....	104
	Danksagung .....	112

## 0 Zusammenfassung

Die Endozytose und die anschließende Verwertung der aufgenommenen Substanzen ist Gegenstand zahlreicher Untersuchungen. Dabei wird ein besonderes Augenmerk auf die Proteine gelegt, die an diesen Vorgängen beteiligt sind. In der hier vorliegenden Arbeit wird der Lipid-Status der Zelle und Enzyme des Lipid-Stoffwechsels berücksichtigt.

Das Ausschalten einer Long Chain-Fatty Acyl CoA Synthetase 1 (LC-FACS), *fcsB*, in *Dictyostelium discoideum* hat eine Veränderung der Menge an neutralen Lipiden zur Folge. In diesen LC-FACS2 „Knock-Out“-Zellen wird ein Zusammenhang zwischen neutralen Lipiden und der Phagozytose von Hefen und Bakterien detektiert. Ein Einfluss auf den endozytotischen Transit kann in diesen Zellen nur induziert werden, wenn man zusätzlich den Triglycerid-Hydrolyse-Inhibitor LSD1 in den Zellen exprimiert.

Mit Hilfe der Daten wird ein Modell erstellt, indem die Reduktion der Menge an neutralen Lipiden nicht direkt für diesen Phänotyp verantwortlich ist. Es ist vielmehr das Energie-Niveau der Zellen, das die Phagozytoserate beeinflusst. Möglich macht dies ein Pool aus Fettsäuren im Zytoplasma. Dieser besteht aus unaktivierten Fettsäuren und Acyl-CoAs. Auf ihn greifen Kompartimente wie Lipidtropfen, Mitochondrien und Peroxisomen zu, wenn Fettsäuren verstoffwechselt werden sollen. In LC-FACS2 „Knock-Out“-Zellen, wird das Gleichgewicht im Pool in Richtung der unaktivierten Fettsäuren verschoben. Anhand der Größe dieses Pools kann die Zelle ihren Energiestatus messen. Ein höherer Energie-Status führt dann zu einer Reduktion der Phagozytoserate.

Vacuolin B Null Zellen (*vacB*<sup>-</sup>) zeigen eine extreme Verzögerung im endozytotischen Transit. Schaltet man in diesen Zellen die LC-FACS1 aus (*vacB*<sup>-</sup>/*fcsA*<sup>-</sup>), so reduziert man ebenfalls die Menge an Triglyceriden. Dies ist darauf zurückzuführen, dass der Acyl-CoA Anteil des Fettsäure-Pools reduziert ist. Diese Reduktion resultiert hier in einer Beschleunigung des endozytotischen Transits. Die Exozytose von *vacB*<sup>-</sup>-Zellen und *vacB*<sup>-</sup>/*fcsA*<sup>-</sup>-Zellen unterscheidet sich nicht. Daher wird die Ursache für diese Beschleunigung in veränderten Fusions- bzw. Fissionseigenschaften der Endosomen vermutet.

Somit führt das Ausschalten von LC-FACS-Proteinen in *Dictyostelium* zu einer veränderten Zusammensetzung des Fettsäure-Pools. Dies hat im Fall der LC-FACS1 Modifikationen der Membran-Dynamik und im Fall der LC-FACS2 Änderungen des Energie-Spiegels zur Folge.

# 1 Einleitung

## 1.1 Der endozytotische Transit in Dictyostelium discoideum

Das natürliche Habitat der einzelligen Bodenamöbe Dictyostelium discoideum ist der Waldboden. Als professioneller Phagozyt ernährt er sich dort von Bodenbakterien (70, 71) und teilt sich mitotisch. Werden die Nahrungsressourcen knapp, treten die haploiden Zellen dieses Organismus in einen Entwicklungszyklus ein. Am Ende dieses Zyklus steht ein multizellulärer Fruchtkörper an dessen Spitze sich ein Sporenkopf befindet. Ist die Mangelperiode überstanden, keimen aus den Sporen neue Zellen. Für diesen Entwicklungszyklus stehen alternative genetische Programme zur Verfügung.

Das Genom von Dictyostelium umfasst 34 Mb und ist seit 2005 sequenziert (23). Die Größe der sechs Chromosomen variiert zwischen 4 und 7 Mb (19). Die Anzahl der Gene wird auf 12.500 geschätzt. Viele dieser Gene weisen hohe Homologien zu Genen in Säugern auf. Dies und die gute Zugänglichkeit für molekularbiologische, aber auch biochemische Anwendungen machen Dictyostelium als Modellorganismus interessant.

Um die Reproduzierbarkeit von Experimenten zu erhöhen generierten Watts und Ashworth einen Stamm, der auch in bakterienfreiem Medium kultiviert werden kann (102). Dieser AX2 genannte Labor-Stamm wird hier als Wildtyp bezeichnet. Die Fähigkeit der Phagozytose bleibt in diesem Stamm erhalten. Es ist zudem möglich makropinozytische Prozesse und den endozytotischen Transit mit Flüssigphasen-Markern, zu verfolgen.

Unter dem endozytotischen Transit versteht man, wie das aufgenommene Material in der Zelle verarbeitet wird, welche Prozesse eingeleitet werden und wie viel Zeit dafür benötigt wird. In Dictyostelium discoideum wird er in 4 zeitlich differenzierte Phasen eingeteilt. Man unterscheidet zwischen der Partikelaufnahme oder Endozytose, einer sauren Phase, einer neutralen Phase und der Exozytose. Gestartet wird der Transit mit der Aufnahme von Nahrung in Vacuolen, ein Prozess, der als Endozytose bezeichnet wird.

### 1.1.1 Die Endozytose

Die Endozytose wird als die Aufnahme von Partikeln, Flüssigkeiten und Makromolekülen in das Zellinnere verstanden. Sie gliedert sich in Phagozytose und Pinozytose. Die Phagozytose beschreibt die Aufnahme von Partikeln, die Pinozytose die Aufnahme von Flüssigkeiten. Die Pinozytose wird noch einmal unterteilt. Je nach Volumen der geformten Vesikel unterscheidet man zwischen der Mikropinozytose (der Vesikeldurchmesser beträgt ca. 0,1  $\mu\text{m}$ ) und Makropinozytose (Vesikel mit einem Durchmesser von ca. 1-2



µm). Während die Makropinozytose überwiegend zur Flüssigkeitsaufnahme dient (30), kommt der Mikropinozytose die Aufgabe des Membrantransportes zu (62).

Phagozytose und Makropinozytose dienen beide der Versorgung der Zellen mit Nährstoffen. Es handelt sich daher um funktionell, aber auch morphologisch vergleichbare Prozesse. Die Art der Pseudopodienbildung und die Größe des gebildeten Endosoms sind ähnlich. Unterschiede findet man hingegen bei der Regulation der Prozesse. Das Membran-Lipid Phosphatidylinositol-(3,4)-Bisphosphat (PIP<sub>2</sub>) bildet den Ausgangspunkt für beide Signalwege. PIP<sub>2</sub> kann entweder zu IP<sub>3</sub> und DAG gespalten werden oder zu PIP<sub>3</sub> phosphoryliert werden. Die Spaltung wird durch die Phospholipase C (PLC) katalysiert und leitet die Phagozytose ein. PIP<sub>3</sub> entsteht durch die Phosphorylierung durch die PI-3-Kinase und induziert die Makropinozytose. Beide Signalwege aktivieren Proteine wie z.B. Aktin, Myosine, Coronin und andere zur Aktinpolymerisation benötigte Proteine. Es werden jedoch auch Proteine rekrutiert, die nur für jeweils einen der beiden Prozesse spezifisch sind; z.B. RacC für die Phagozytose und Profilin für die Makropinozytose (77). Das Prinzip, das im Folgenden vorgestellt wird, gilt jedoch für beide Prozesse.

Berührt ein Partikel die Membran, führt dies zu einer Rekrutierung von Aktin und Aktin-assoziierten Proteinen an die Plasmamembran. Durch die Polymerisation und Depolymerisation von F-Aktin, sowie beteiligten Motorproteinen, wird die Plasmamembran trichterförmig ausgestülpt (25). Man bezeichnet dies in der Phagozytose als „phagocytic cup“ und in der Makropinozytose als „crowns“. Durch Extension dieser trichterförmigen Ausstülpungen wird der Partikel umschlossen und von der Plasmamembran abgeschnürt. Das dabei entstandene Vesikel trägt nun eine Hülle aus F-Aktin und Coronin, die jedoch nach weniger als einer Minute vom Vesikel dissoziiert (53). Dieser Vorgang kennzeichnet das Vesikel zum Eintritt in die nächste Phase des endozytotischen Transits, die frühe, saure Phase (30, 53).

### 1.1.2 Die frühe, saure Phase

Viele Verdauungsenzyme haben ihr pH-Optimum in einem sauren Milieu. Dies gilt auch für eine Vielzahl lysosomaler Enzyme in Dictyostelium. Damit das Endosomen-Lumen auf einen pH-Wert von ca. 5,0 abgesenkt werden kann, fusionieren kleine Vesikel mit der Endosomen-Membran. Sie tragen die vakuoläre H<sup>+</sup>-ATPase, die Protonen in das Innere des Endosoms pumpt (15, 16).

Anschließend fusionieren Vesikel, die lysosomale Enzyme beinhalten mit der Endosomen-Membran. Sie dienen dazu, die aufgenommene Nahrung proteolytisch zu spalten. Diese Enzyme sind durch verschiedene Zucker modifiziert und befinden sich zu genau definierten Zeiten in den sauren Endosomen. Ein Gemisch von Enzymen mit

unterschiedlichen Modifikationen gibt es nicht (88). Man vermutet daher, dass ein Großteil der Proteine, die ihre Funktion ausgeübt haben, vom Endosom abgeschnürt und wiederverwertet werden (52).

Malchow et. al klärten jedoch bereits 1969, dass die Bakterien, die von Dictyostelium-Zellen phagozytiert werden, nicht vollständig verwertet werden. Die Fettsäure-Bestandteile werden in den sauren Endosomen von den Lipopolysacchariden der Bakterienzellwand abgespalten. Die Zuckerbestandteile werden hingegen ausgeschieden. (49).

Auf den sauren Endosomen, in deren Lumen die Fettsäuren von den Lipopolysacchariden abgespalten werden findet man auch einen großen Teil der LC-FACS1 (Long Chain-Fatty Acyl CoA Synthetase 1). Die LC-FACS1 hat hier die Aufgabe, die freien Fettsäuren zu aktivieren, indem sie Coenzym A mit der Carboxygruppe der Fettsäure verestert. Man findet die LC-FACS1 zu Beginn der sauren Phase auf den Endosomen. Mit einsetzender Neutralisation verlässt sie die Endosomen-Membran (99). Die Neutralisation setzt ca. 30 min nach der Internalisierung ein. Vesikel, schnüren die vakuoläre H<sup>+</sup>-ATPase knospen vom Endosom ab (38, 64), wodurch der pH-Wert wieder ansteigt (66) und das Endosom in die dritte, die späte, neutrale, Phase übergeht.

### 1.1.3 Die späte, neutrale Phase

Hat die vakuoläre H<sup>+</sup>-ATPase das Endosom verlassen hat, findet man im Endosom, das nun als postlysosomales Kompartiment bezeichnet wird, einen pH-Wert von ca. 6,5 vor. Dieses Kompartiment besitzt erneut eine Hülle aus F-Aktin und Coronin (73). Die LC-FACS1 befindet sich zum Zeitpunkt der Neutralisierung noch auf den Endosomen. Nach ca. 60 Minuten ist dann allerdings weder Coronin noch die LC-FACS1 auf dem postlysosomalen Kompartiment zu detektieren. Coronin wird dann graduell durch Vacuolin ersetzt. Das Kompartiment ist vorübergehend sowohl mit Coronin, als auch mit Vacuolin dekoriert (73).

Der einzige, zurzeit bekannte Marker, der exklusiv am postlysosomalen Kompartiment lokalisiert, ist Vacuolin. Von diesem Protein gibt es drei Isoformen. Die Funktion von Vacuolin A ist ungeklärt, da weder „Knock-Out“, noch ein überexprimierender Stamm einen Defekt aufweisen. Obwohl die Sequenzen von Vacuolin A und Vacuolin B zu 79 % identisch sind, scheinen sie verschiedene Aufgaben in der Zelle zu übernehmen. Denn Vacuolin B „Knock-Out“-Zellen zeigen eine Verzögerung im endozytotischen Transit und ein vergrößertes spätes Endosom. Außerdem zeigen sie eine verlängerte Ansäuerung der Endosomen (38). Vacuolin C ist noch nicht ausreichend untersucht. Allgemein vermutet man, dass Vacuolin als Fusions-Inhibitor auf späten Endosomen lokalisiert, um die ständige Fusion mit sauren Kompartimenten zu verhindern (21). Neben Vacuolin und F-

Aktin findet man dann Dynamin A auf dem späten Endosom, was auf Recyclingvorgänge hindeutet (104).

#### 1.1.4 Die Exozytose

Nicht verwertbare Substanzen werden etwa 60 Minuten nach der Internalisierung durch die Fusion des späten Endosoms mit der Plasmamembran ausgeschieden.

Die Rolle, die die Aktin-Hülle hierbei einnimmt wird zurzeit noch diskutiert. Lee und Knecht konnten 2002 zeigen, dass kurz vor der Exozytose eine erneute Aktin-Polymerisation stattfinden muss (46). Auch die Behandlung mit der Aktin-depolymerisierenden Droge, Cytochalasin A, führt zu einer Verzögerung im endozytotischen Transit (38). Drengk et al. konnten 2003 hingegen keinen Zusammenhang zwischen der Aktin-Hülle um späte Endosomen und einer effizienten Exozytose messen. In dieser Arbeit wurde ein Konstrukt in Dictyostelium-Zellen exprimiert, das gezielt die Aktin-Hülle an späten Endosomen entfernt. In diesen Zellen kommt es zwar zu einer Verklumpung von späten Endosomen, der endozytotische Transit wird hierdurch jedoch nicht beeinträchtigt (21). So scheint es, dass die Aktin-Hülle um späte Endosomen für die Kontrolle der Fusion von Vesikeln benötigt wird. Für die korrekte Exozytose scheint eine erneute Aktin-Polymerisation erforderlich zu sein. Zurzeit wird hierbei die Rolle des kortikalen Aktins diskutiert, da der Kontakt zwischen einem Endosom und der Plasmamembran einen Schub von Aktin-Polymerisation auslöst (16). Abbildung 1 veranschaulicht diese Vorgänge.

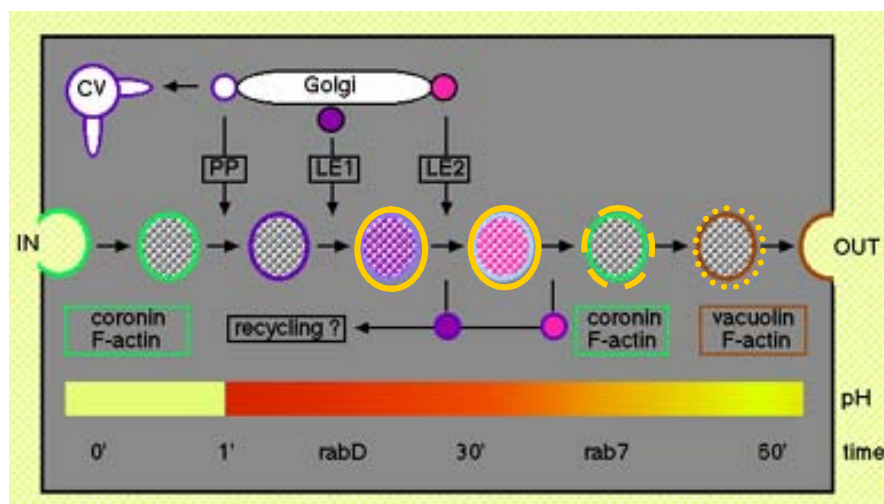


Abbildung 1: Vereinfachte schematische Darstellung des endozytotischen Transits in Dictyostelium discoideum von der Aufnahme an der Plasmamembran (IN), bis zur Exozytose (OUT). Die verschiedenen Farben kennzeichnen die beteiligten Proteine  
 Farberläuterungen: Coronin (hellgrün); LC-FACS1 (gelb); vakuoläre H<sup>+</sup>-ATPase, konzentrationsabhängig (dunkelblau bis hellblau); Vacuolin (braun)  
 Abkürzungen: CV: Kontraktile Vakuole, PP: Protonenpumpe (vakuoläre H<sup>+</sup>-ATPase); LE1: lysosomale Enzyme mit Glc-Nac-1P-Modifikationen; LE2: lysosomale Enzyme mit Man-6-P-Resten (aus Maniak, 1999; modifiziert).

## 1.2 Der Lipid-Stoffwechsel

Dictyostelium Zellen, wie auch Hefe- oder Säugerzellen, können ihren Bedarf an Fettsäuren durch de novo Synthese oder durch die Aufnahme von extrazellulär angebotenen Fettsäuren decken. Es werden zur Zeit zwei Modelle diskutiert, wie Zellen freie Fettsäuren in ihr Inneres transportieren. 1.) Fettsäuren diffundieren in die Plasmamembran ohne die Hilfe von Proteinen. Dabei sollen sich die freien Fettsäuren in die Membran einlagern, eine Translokation auf die innere Seite der Doppelmembran und eine anschließende Desorption stattfinden (32). 2.) Fettsäuren werden von Proteinen gebunden und durch die Membran transportiert. Ehehalt et al. favorisieren hierbei das Zusammenspiel von FAT/CD36, ein membranständiges fettsäure-bindendes Protein und den „Fatty Acid Transport Proteins“ (FATPs) (22).

Für Dictyostelium wurde gezeigt, dass freie Fettsäuren über Endosomen aufgenommen werden können (99). Sind die Fettsäuren in die Zelle gelangt, können sie drei unterschiedliche Schicksale treffen. 1.) Sie können direkt in Lipide eingebaut werden, 2.) sie können in Form von Triglyceriden in Lipidtropfen gespeichert werden oder 3.) sie können zur Energiegewinnung genutzt und in Mitochondrien, aber auch in Peroxisomen abgebaut werden. Denn sowohl Mitochondrien, als auch Peroxisomen enthalten die für die  $\beta$ -Oxidation von Fettsäuren nötigen Enzyme. Den entscheidenden Schritt für alle drei Prozesse katalysieren jedoch Acyl-CoA Synthetasen.

### 1.2.1 Aktivierung von Fettsäuren durch Acyl-CoA Synthetasen

Bevor Fettsäuren Reaktionen in der Zelle eingehen können, müssen sie durch die Veresterung mit einem Molekül Coenzym A aktiviert werden. Diese Reaktion wird von einem Homo-Dimer aus Acyl CoA Synthetasen katalysiert. Hierbei unterscheidet man Short Chain (SC-FACS), Medium Chain (MC-FACS), Long Chain (LC-FACS) und Very Long Chain Fatty Acyl-CoA Synthetasen (VLC-FACS), die für Acyl-Ketten unterschiedlicher Länge spezifisch sind.

Der Reaktionsmechanismus ist dabei immer der gleiche. In einer ersten Reaktion wird unter ATP-Hydrolyse Acyl-AMP erzeugt. Dieser Schritt benötigt Magnesium-Ionen als Co-Faktor. In einem zweiten Reaktionsschritt wird AMP durch CoA ersetzt.

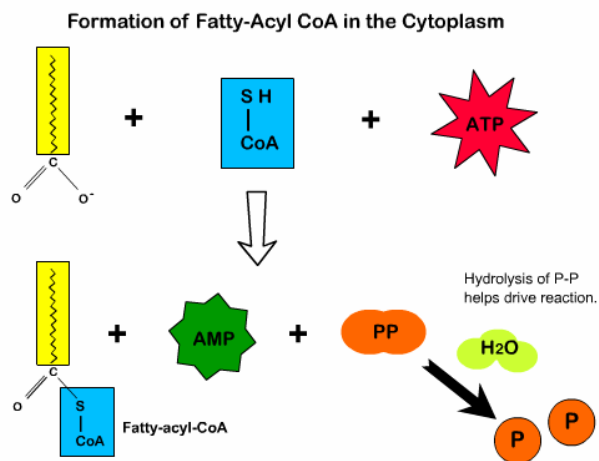


Abbildung 2: Reaktionsschema der Aktivierung von Fettsäuren; unter ATP-Verbrauch wird in einer ersten Reaktion AMP an die Acyl-Kette angehängt. In einer zweiten Reaktion greift CoA die Esterbindung an. Eine Thioester-Bindung wird ausgebildet. Die Reaktion wird durch die Hydrolyse von Pyrophosphat angetrieben

LC-FACS-Proteine katalysieren die Aktivierung langkettiger Fettsäuren (C16-C22). Diese Proteine haben in der Regel ein Molekulargewicht von ca. 75 kDa. In Dictyostelium-Zellen kennt man bisher erst eine LC-FACS (99). Auch sind noch keine Short oder Medium Chain-Fatty Acyl CoA Synthetasen charakterisiert.

### 1.2.2 LC-FACS-Proteine: ein Reaktionsschema, doch vielfältige Funktionen

LC-FACS Proteine weisen zwei hoch konservierte Domänen auf. Zum einen findet man eine AMP-Bindedomäne, die für die Bindung von ATP/AMP als Energielieferant nötig ist, zum anderen eine LC-FACS Signatur, die für die Erkennung der Acyl-Kette benötigt wird.

2004 hat die Gruppe um Masashi Miyano die Kristallstruktur des aktiven Zentrums einer LC-FACS aus dem Bakterium *Thermus thermophilus* (ttLC-FACS) gelöst. Abbildung 3 zeigt die Konformation der ttLC-FACS und die Veränderung, die durch die Bindung von ATP entsteht.

LC-FACS-Proteine haben eine kleine C-terminale, ATP bindende Domäne und eine große N-terminale Domäne, in der sich die LC-FACS-Signatur befindet. Die C-terminale Domäne kann aufgrund der Bindung von ATP oder einem Molekül Acyl-AMP in ihre offene Konformation übergehen (Abb. 3 A).

Durch die Bildung eines Dimers entstehen verschiedene Kanäle, die für den Eintritt der Substrate bzw. Energielieferanten nötig sind (Abb. 3 B). Einem Tryptophan-Rest kommt hierbei die wichtige Rolle zu, Kanäle zu verschließen, wenn kein Ligand gebunden hat (Abb. 3 C).

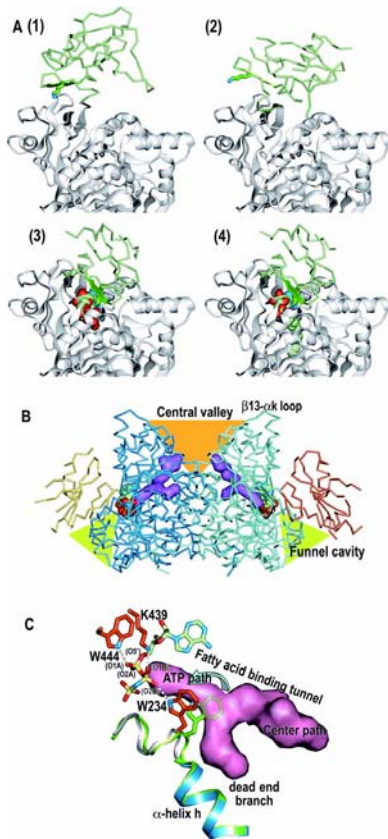


Abbildung 3: Konformationsänderung durch die Bindung von ATP am Beispiel der ttLC-FACS

A) offene (1 und 2) und geschlossene (3 und 4) Konformation der C-terminalen Domäne; In der geschlossenen Konformation ist in (3) ein AMP Ortholog und in (4) Myristoyl-AMP gebunden (die N-terminale Domäne in silber und die C-Terminale Domäne in grün). Die gebundenen Liganden befinden sich im Inneren des Modells.

B) LC-FACS Dimer. N-terminale Domäne, (blau) C-terminale Domäne (gelb). Liganden (lila und rot). Der Fettsäure-Bindetunnel besteht aus 3 Wegen: 1. der ATP-Weg, führt zur ATP-Bindestelle; 2. der zentrale Weg: der Weg für die Fettsäuren; 3. Die Sackgasse.

C) Die 3 Wege stoßen in der Nähe des Trp<sup>234</sup> (W234) zusammen. In Abwesenheit eines Liganden verschließt Trp<sup>234</sup> den Tunnel (grün). Ist ein Ligand anwesend, wird der Fettsäure-Bindetunnel geöffnet (rot). (34)

Auch die Reihenfolge, in der die Moleküle in den Enzymkomplex eintreten ist geklärt. Zuerst bindet das Dimer ATP. Durch die folgende Konformationsänderung wird die zentrale Öffnung so vergrößert, dass Fettsäuren eintreten können. Sie werden durch positive Ladungen im Kanal unidirektional zur ATP-Bindestelle geleitet, wo dann Acyl-AMP unter Abspaltung von Pyrophosphat gebildet wird. Pyrophosphat wird nun aus dem Komplex entlassen und CoA aufgenommen. Das Coenzym A greift mit der Thiol-Gruppe am C<sub>1</sub>-Atom des Acyl-AMP-Moleküls an und bildet eine Thioester-Bindung zur Fettsäure aus. Die aktivierte Fettsäure und AMP werden aus dem Komplex entlassen. (Abb. 4).

Obwohl ihr Aufbau sehr ähnlich ist, haben verschiedene LC-FACS-Proteine unterschiedliche Aufgaben. Ein Grund hierfür ist, dass sie in unterschiedlichen, z.T. spezialisierten Geweben exprimiert werden. Der Hauptgrund liegt jedoch darin, dass LC-FACS-Proteine in unterschiedlichen Regionen einer Zelle lokalisieren.

Bekannt ist, dass LC-FACS Proteine an bestimmten Organellen innerhalb einer Zelle lokalisieren. So findet man auf Endosomen in Dictyostelium eine LC-FACS (99). Aber auch auf fettsäure-degradierenden Organellen, wie Mitochondrien oder Peroxisomen wurden LC-FACS-Proteine beschrieben (65, 81). Dort müssen die Fettsäuren für die  $\beta$ -Oxidation mit einem CoA-Molekül aktiviert werden. (28). Vor der Degradation von Fettsäuren in Mitochondrien oder Peroxisomen steht jedoch deren Import in die entsprechende Organelle.

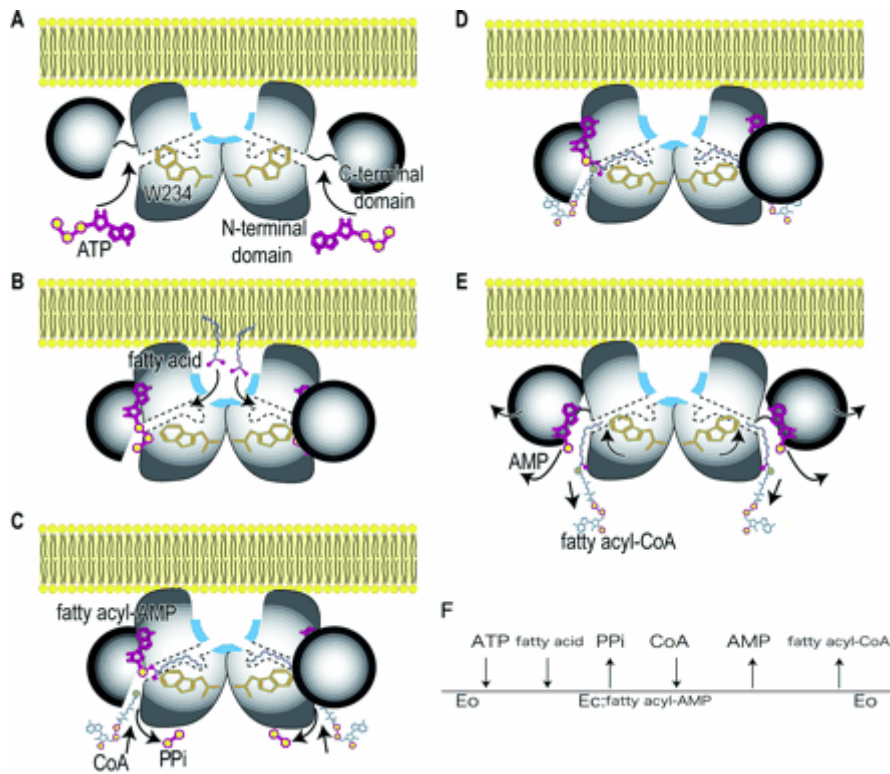


Abbildung 4: Schematische Darstellung der unidirektionalen Reaktion, die die ttLC-FACS katalysiert

(A) Die Bindung von ATP führt zu einer Konformationsänderung. (B) Die Fettsäure im Fettsäure-Bindetunnel (C) Bildung von Acyl-AMP; Pyrophosphat wird aus dem Komplex entlassen. CoA bindet an den Acyl-AMP-Komplex. (D) Angriff der Thiol-Gruppe am ersten Kohlenstoffatom. (E) Die C- und die N-terminale Domäne werden geöffnet und die aktivierte Fettsäure und AMP werden entlassen. (F) zeigt den zeitlichen Verlauf der Reaktion. (aus: (34))

### 1.2.3 Fettsäureimport in Mitochondrien

In Säugern werden nur langkettige Fettsäuren in Mitochondrien transportiert. CoA-aktivierte Fettsäuren werden durch die innere Mitochondrienmembran mit Hilfe von Carnitin transportiert. Die Carnitin-Acyltransferase katalysiert die Transacylierungs-Reaktion von CoA auf Carnitin. Acyl-Carnitin kann dann frei durch die Membran diffundieren. Auf der Matrix-Seite wird Carnitin wieder durch CoA ersetzt [zusammengefasst in (6)]. Ein Acyl-CoA dient nun als Substrat für das multifunktionelle Enzym (MFE) das die ersten zwei Schritte der  $\beta$ -Oxidation katalysiert [zusammengefasst in (43)].

### 1.2.4 Fettsäureimport in Peroxisomen

Der Fettsäureimport in Peroxisomen gestaltet sich vielschichtig. In der Hefe ist es notwendig, auch aktivierte langkettige Fettsäuren (LCFAs, Long Chain Fatty Acids) in Peroxisomen zu transportieren, da in diesem Organismus in Mitochondrien keine  $\beta$ -

Oxidation stattfindet (42). Alle Fettsäuren müssen hier in Peroxisomen abgebaut werden. Der Transport von LCFAs in die Peroxisomen erfolgt mit Hilfe eines heteromeren Komplexes aus den zwei Proteinen pat1p und pat2p. Beide Proteine gehören zur Klasse der ABC-Transporter (80).

In Hefe können Fettsäuren mittlerer Kettenlänge (MLCFAs; Medium Chain Fatty Acids) auch als freie Fettsäuren in Peroxisomen gelangen und werden dort von der Acyl-CoA Synthetase Faa2p aktiviert. Auch Pex 11p, ein peroxisomales Membranprotein, wird vermutlich für den Transport benötigt (96).

Freie, sehr langkettige Fettsäuren (VLCFAs; Very Long Chain Fatty Acids) müssen erst aktiviert werden bevor sie in Peroxisomen transportiert werden können. Hierbei kommt Fat1p (Fatty acid transport protein 1) eine entscheidende Rolle zu. Verschiedene Labore haben gezeigt, dass Fat1p VLC-FACS-Aktivität besitzt (13, 101). Watkins und Mitarbeiter konnten des Weiteren zeigen, dass in Fat1p Null-Zellen die VLC-FACS-Aktivität in Peroxisomen reduziert ist (101). Dies deutet darauf hin, dass Fat1p VLCFAs aktiviert, die den Peroxisomen der  $\beta$ -Oxidation zugeführt werden.

Es wurde auch diskutiert, ob Fat1p eine Transport-Funktion für LCFAs hat (79). Zou et al. konnten jedoch zeigen, dass diese Transportfunktion für LCFAs nur indirekt ist. Die Arbeitsgruppe bewies, dass FAT1 ein LC-FACS-Protein zur Membran rekrutiert, das dann parallel LCFAs aktiviert (105). Diesen Vorgang, bei dem Import und Aktivierung gekoppelt sind, bezeichnet man als „vectorial acylation“ (106). Zou et al. konnten zudem zeigen, dass Faa1p mit Fat1p in Hefe interagiert. Bei Faa1p handelt es sich um eine LC-FACS, die vermutlich in den Peroxisomen und/oder dem ER lokalisiert (13). Kürzlich konnte auch für eine LC-FACS aus Säuger (ACSL1) eine Interaktion mit dem Säuger-Homolog von Fat1p (FATP1) festgestellt werden (75).

In Säuger-, aber auch in Hefe-Zellen werden in Peroxisomen VLCFAs (Very Long Chain Fatty Acids) zu kürzeren Fettsäuren abgebaut. In Hefe erfolgt die Oxidation vollständig; in Säugern und vermutlich auch Dictyostelium findet eine Oxidation bis maximal Butyryl-CoA statt. Die zwei bekannten Acyl-CoA Oxdasen in Säuger-Peroxisomen haben kaum mehr Affinität zu Butyryl-CoA als Substrat (97). Daher wird vermutlich Butyryl-CoA durch die Carnitin-Acyltransferase mit Carnitin versehen und in das Zytoplasma transloziert. Von dort findet der Transport über den Acylcarnitin-Carrier in Mitochondrien statt, die  $\beta$ -Oxidation wird vollendet (100).(Abbildung 5)

Ist der Energiebedarf gedeckt, müssen die verbleibenden Fettsäuren gespeichert werden. Dies geschieht in Form von neutralen Lipiden, wie z.B. Triglyceriden. Sie werden in Lipidtropfen gelagert.



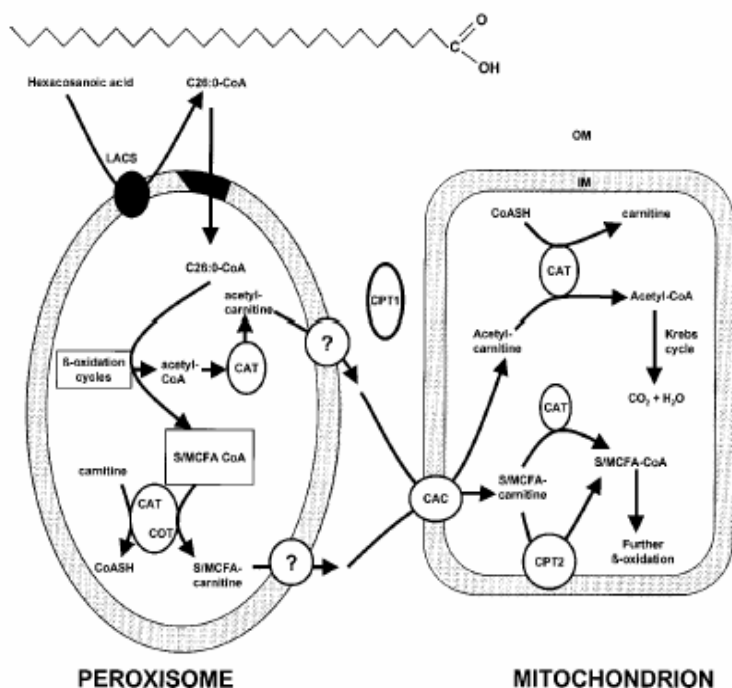


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Interaktionen von Peroxisomen und Mitochondrien in Säugerzellen. Import einer VLCFA in Peroxisomen (links); der Abbau zu Medium bzw. Short Chain Fatty Acids (links unten) und der Abbau zu Acetyl-CoA (links oben); Abbau von Acetyl-CoA in Mitochondrien (rechts oben) und von kurzen Acyl-CoA Molekülen (rechts unten).

Abkürzungen: MCFA: Fettsäuren mittlerer Kettenlänge, SCFA: Kurzkettige Fettsäuren; OM: Äußere Mitochondrienmembran; IM: innere Mitochondrienmembran; LACS: Long Chain Acyl CoA Synthetase; CAC: Acylcarnitin Carrier; CAT: Acylcarnitin Translocase; CPT: Carnitin Palmitoyltransferase aus: Wanders et al. 2000

### 1.2.5 Fettsäure-Speicherung in Lipidtröpfen

Lipide sind die Standard-Energie-Speicherform in tierischen Zellen. Sie werden in den neutralen Lipidtröpfen spezialisierter Zellen, wie z.B. Adipozyten in Säugern oder Fettkörpern von Insekten gespeichert. Obwohl Lipidtröpfen ursprünglich in solchen Geweben gefunden wurden, konnten sie auch in anderen Zelltypen und Organismen, wie z.B. auch *Dictyostelium discoideum* (55) nachgewiesen werden [zusammengefasst in (60)].

Lipidtröpfen sind Kompartimente, die von einer einfachen Phospholipidschicht umgeben sind und einen inneren, hydrophoben Kern aus neutralen Lipiden aufweisen. Die neutralen Lipide bestehen hauptsächlich aus Triacylglycerol (TAG) und Sterol-Estern. Man glaubt, dass Lipidtröpfen vom ER knospen, indem neu synthetisierte, neutrale Lipide zwischen die Lipid-Doppelschicht gebracht werden. Dadurch spaltet sich die zytoplasmatische Seite der Doppelmembran ab (90).

Es sind noch nicht viele Proteine beschrieben, die auf Lipidtropfen lokalisieren. Allerdings sind Proteine, die eine PAT Domäne (48) aufweisen (zusammengefasst in der PAT-Familie) relativ gut untersucht. Zu dieser Familie gehört auch Perilipin. Dieses, ursprünglich in Säuger-Zellen entdeckte Protein hat Homologe in *Drosophila* und in *Dictyostelium*. Die Funktion von Perilipin wurde in „Knock-Out“-Mäusen untersucht. Die Mäuse, die kein Perilipin mehr exprimierten, hatten eine normale Größe und auch normales Gewicht. Sie zeigten aber eine Reduktion in der Menge des Fettgewebes und „Fettleibigkeit“ konnte nicht induziert werden (54, 89). Zusammen mit Daten aus Zellkultur-Experimenten (7) scheint Perilipin eine Schutzfunktion gegen den Abbau von Triglyceriden aus den Lipidtropfen aufzuweisen. Diese Annahme konnte für das *Drosophila*-Homolog LSD2 bestätigt werden (91).

Ein weiteres Protein, das mit Lipidtropfen assoziiert ist, ist Stomatin. Dieses Protein findet man in „Lipid Rafts“. Es wird ihm eine Gerüstfunktion, ähnlich wie Caveolin zugeschrieben (85). Abhängig vom Zelltyp variiert die Lokalisation von Stomatin zwischen Plasmamembran, späten Endosomen/Lysosomen (86) und Lipidtropfen (95). Durch eine GFP-Fusion konnte gezeigt werden, dass die Lokalisation von Stomatin auf Lipidtropfen abhängig von der Zugabe von Fettsäuren in das Medium ist. Des Weiteren wurde eine Assoziation mit vesikulären Strukturen gefunden. Allerdings steht die Identifizierung dieser Vesikel noch aus. Zudem muss noch geklärt werden, welche Rolle Stomatin in Vesikel-Formation, Docking, Fusion oder Mobilität zukommt (95).

### 1.3 Proteinimport in Peroxisomen

Im Laufe dieser Arbeit wird die LC-FACS2 als peroxisomales Protein identifiziert; ein weiteres Protein wird als Marker für Peroxisomen verwendet. Es ist diesbezüglich wichtig zu wissen, wie Proteine in Peroxisomen importiert werden und damit verbunden, wie Peroxisomen entstehen.

Die Internetseite [www.peroxisome.org](http://www.peroxisome.org) fasst den aktuellen Wissensstand über Peroxisomen zusammen. Wenn nicht anders angegeben, dient diese Seite als Referenz.

Der Proteinimport in Peroxisomen unterscheidet sich vom Proteinimport in Mitochondrien. Peroxisomen gelten nicht als Endosymbionten. Sie weisen nur eine Membran auf und haben keine eigene DNA. Sämtliche Proteine müssen also kernkodiert sein und werden im Zytoplasma translatiert.

### 1.3.1 Proteinimport luminaler peroxisomaler Proteine

Luminale, peroxisomale Proteine werden an freien Ribosomen translatiert und bereits fertig gefaltet in die Peroxisomen transportiert. Man kennt zwei „Targeting-Signale“, die Proteine in die Peroxisomen dirigieren. Das „Peroxisomal Targeting Signal 1“ (PTS1) besteht aus nur drei Aminosäuren am C-Terminus und ist ausreichend für ein effizientes „Targeting“. Bei den drei Aminosäuren handelt es sich um Serin, Lysin und Leucin (S, K und L).

Die Sequenz des zweiten PTS ist etwas komplexer und lässt sich nicht auf eine Konsensus-Sequenz reduzieren. Sie muss im N-Terminus vorhanden sein und kann folgende Sequenz aufweisen: Arg oder Lys – Leu oder Val oder Ile – X – X – X –X –X – His oder Glu – Leu oder Ala. Es gibt allerdings nur wenige Proteine, die als Importsignal PTS2 tragen. Die meisten peroxisomalen Proteine tragen PTS1. In manchen Organismen wie z.B. *C. elegans* konnte bisher noch kein peroxisomales Protein identifiziert werden, das ein PTS2 trägt.

Es wurden in den vergangenen Jahren verschiedene Proteine (Peroxine; kurz: Pex genannt) gefunden, die am Proteinimport in Peroxisomen beteiligt sind. Abhängig von der Art des PTS wird ein peroxisomales Protein im Zytoplasma von Pex5 (PTS1) bzw. Pex 7 (PTS2) erkannt und gebunden. Diese „Guide-Proteine“ bringen die peroxisomalen Matrixproteine zu den Peroxisomen. Es wurde beschrieben, dass Pex14 mit Pex5, aber auch mit Pex13 und Pex17 interagiert. Vermutlich stellen Pex14, Pex13 und Pex17 einen „Docking-Komplex“ für Pex5 und Pex7 dar.

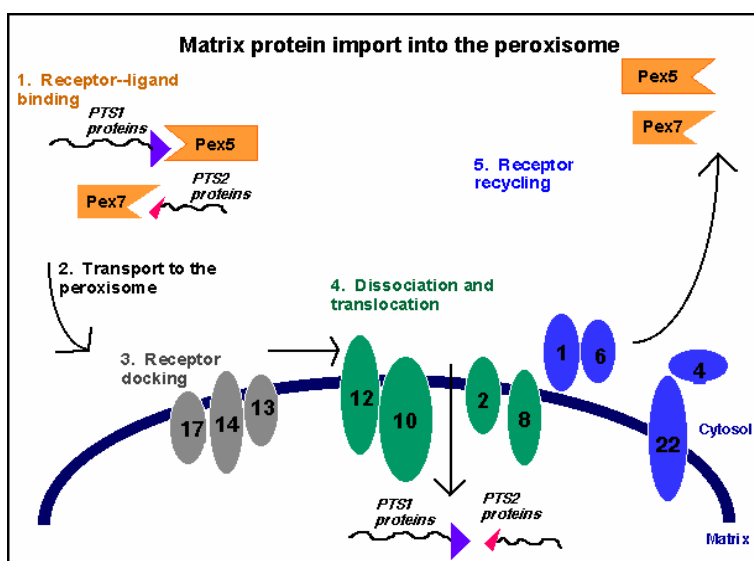


Abbildung 6: Modell des Proteinimports in Peroxisomen. 1. Faltung im Zytoplasma; 2. Pex5 (PTS1) und Pex7 (PTS2) binden die "Targeting-Sequenz" 3. Docking; 4. Translokation; 5. Recycling von Pex5. (aus: <http://www.peroxisome.org/Scientist/scientist.html>)

Die Translokation übernimmt dann ein Komplex aus Pex12, Pex10, Pex2 und Pex8. Für Pex2 und Pex8 wurde eine direkte Interaktion mit Pex5 nachgewiesen. Pex12 und Pex10 sind Transmembran-Proteine, die vermutlich die eigentliche Translokation vornehmen. Der Prozess der Translokation ist ATP-abhängig.

Im Lumen des Peroxisoms dissoziiert das frisch importierte Protein von Pex5. Man weiß, dass Pex5 nun recycelt wird. Dieser Schritt erfordert wieder diverse Proteine. Zum einen wird ein Komplex aus Pex1 und Pex6 benötigt. Aber auch Pex4 und Pex22 scheinen für diesen Schritt unabdingbar. Fehlt eines dieser vier Proteine, so resultiert dies in einer verminderten Stabilität von Pex5

### 1.3.2 Proteinimport von peroxisomalen Transmembran-Proteinen

Der Proteinimport von Transmembran-Proteinen ist bei weitem nicht so gut untersucht wie der von luminalen Proteinen. Man kennt zurzeit drei Proteine, die für diesen Prozess benötigt werden. Dies sind Pex3, Pex19 und Pex16.

Pex3 ist ein Transmembran-Protein und scheint aus dem ER zu stammen (siehe nächsten Abschnitt). Für die korrekte Lokalisation scheint eine Interaktion mit Pex19 dringend notwendig zu sein. Pex19 wiederum scheint eine ähnliche Funktion wie Pex5 zu haben. Anhand der Lokalisation wurde festgestellt, dass nur ein kleiner Teil des Proteins in Peroxisomen lokalisiert. Der größte Teil jedoch liegt zytoplasmatisch vor. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass Pex19 mit diversen peroxisomalen Membranproteinen interagiert. Man vermutet also, dass Pex19 die Transmembran-Proteine im Zytoplasma anhand ihrer Targeting Sequenz (mPTS) erkennt, bindet und zu den Peroxisomen transportiert, wo Pex19 dann eine Interaktion mit Pex13 eingeht. Es ist allerdings noch nicht geklärt, ob die alleinige Interaktion von Pex19 mit den Transmembran-Proteinen, die zu den Peroxisomen transportiert werden sollen, ausreichend ist, oder ob noch weitere Proteine existieren, die an diesem Vorgang beteiligt sind.

Pex16 könnte ein solches Protein darstellen. Man konnte eine Interaktion mit Pex19 demonstrieren. Leider können in diesem Fall Daten aus Hefe und Daten aus Säuger-Zellen nicht verglichen werden, da Pex16 in Hefe ein lösliches Protein ist, das mit der Peroxisomen-Membran assoziiert ist. In Säuger-Zellen ist Pex16 ein Transmembran-Protein, das vermutlich nicht über das ER transportiert wird. Diese Diskrepanz macht eine eindeutige Klärung der Funktion sehr schwierig.

### 1.3.3 Biogenese von Peroxisomen

Wie bereits im vorigen Abschnitt erwähnt, wird eine Beteiligung des ER an der Peroxisomen-Biogenese vermutet. Es gibt allerdings auch Gegner dieser Theorie, die die Idee einer Beteiligung des ERs ablehnen. Sie favorisieren eine Proliferations-Theorie.

Die Befürworter der Theorie, einer ER-Beteiligung, haben Hinweise darauf, dass peroxisomale Transmembran-Proteine in Säugerzellen in das ER-Lumen translatiert werden und dann in einem definierten Bereich des ER „clustern“. Diesen Bereich bezeichnen sie als „specialized ER“. Er unterscheidet sich morphologisch durch das Fehlen von Ribosomen von anderen Bereichen des ER. Außerdem können hier kaum ER-Proteine wie z.B. die Protein-Disulfid-Isomerase (PDI) oder Calreticulin detektiert werden. Stattdessen findet man im „specialized ER“ die peroxisomalen Proteine Pex13p und PMP70. Anschließend knospen Vesikel, die dann, durch die Insertion weiterer peroxisomaler Proteine, zu Peroxisomen heranreifen (27).

Hoepfner et al. haben mit ihren Untersuchungen an lebenden Hefezellen die Theorie über die Beteiligung des ER an der Peroxisomen-Biogenese bestätigt. Mit Hilfe von YFP und CFP gekoppelten Proteinen haben sie gezeigt, dass Pex3p-YFP kurz nach seiner Synthese mit dem ER ko-lokalisiert. Anschließend fokussiert sich die Fluoreszenz von Pex3p-YFP auf ein oder zwei Punkte. Zu diesen Punkten wird nun Pex19p rekrutiert. Kurz danach knospt vermutlich ein Vesikel, da die Punkte verschwinden und der Proteinimport von PTS1-markierten Proteinen beginnt (35).

Auch Untersuchungen in *Yarrowia lipolytica* haben gezeigt, dass Mutanten, die eine defekte Protein-Sekretion zeigen, auch Defekte in der Peroxisomen-Biogenese aufweisen. Außerdem konnte in dieser Hefe eine Assoziation von Pex16 mit dem ER nachgewiesen werden (93). Für *Hansenula polymorpha* konnte ebenfalls gezeigt werden, dass das ER eine wichtige Rolle in der Biogenese von Peroxisomen innehat. Hier konnte mit dem COPI-Inhibitor Brefeldin A gezeigt werden, dass die Biogenese gestört wird (79).

Die Befürworter der Proliferations-Theorie, favorisieren die Idee, dass Peroxisomen reifen und sich teilen. Sie stützen ihre These auch mit Daten aus Säugerzellen. Sie konnten keine Beziehung zwischen ER und Peroxisomen feststellen. Eine Inkubation mit Brefeldin A hat hier keinen Einfluss auf die Peroxisomen-Biogenese. Sie ist daher COPI-unabhängig (87).

Sowohl die Befürworter, der Theorie der ER-Beteiligung an der Peroxisomen-Biogenese, als auch die Befürworter der Proliferations-Theorie stimmen überein, dass Pex3p, Pex16p und Pex19p in bzw. an der Membran eines „Proto-Peroxisoms“ vorhanden sein müssen, damit ein reifes Peroxisom entstehen kann. Die Diskussion betrifft den Ursprung des „Proto-Peroxisoms“. Während die Befürworter dieser Theorie eindeutig das ER als Ursprung identifizieren konnten, steht eine Alternative Lösung des Problems seitens der

Gegner der Theorie noch aus. Sie vermuten, dass es sich bei den „Pre-Peroxisomen“ um Reste ehemals funktioneller Peroxisomen handelt. Diese „alten“ Organellen seien kompetent dafür Membranproteine zu importieren, da sie Pex3p und Pex19p tragen (45).

Neben der Annahme, dass „Proto-Peroxisomen“ nicht de novo gebildet werden, vertreten die Gegner der ER-Beteiligungstheorie auch die Idee, dass Peroxisomen reifen und sich teilen. So konnte ein Protein identifiziert werden (Pex11), das für die Proliferation von Peroxisomen benötigt wird. In Pex11 „Knock-Out“-Hefen konnten weniger, aber vergrößerte Peroxisomen detektiert werden. Man schreibt also Pex11p eine Funktion bei der Teilung von Peroxisomen zu (21). Allerdings ist Pex11p nicht für die eigentliche Teilung verantwortlich. Diese Funktion übernimmt vermutlich DLP1, ein Protein, von dem bereits bekannt ist, dass es an der Teilung von Mitochondrien beteiligt ist. Pex11 fungiert dann als Membran-Tubulator (Michael Schrader, persönliche Mitteilung)

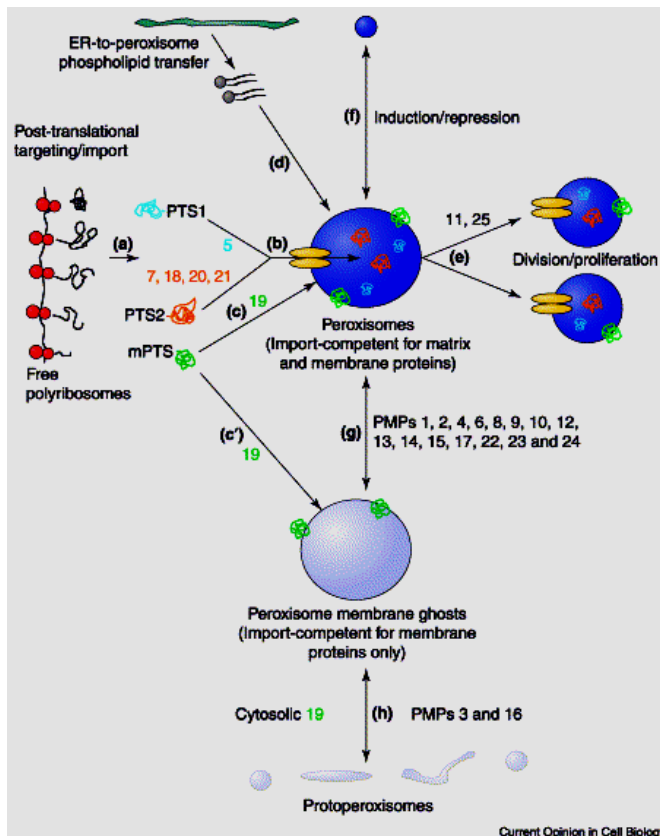


Abbildung 7: Peroxisomen-Biogenese aus Sicht der Befürworter der Proliferations-Theorie; Die Nummern bezeichnen die Pex-Proteine; (a-e) „Steady state“ in einer Zelle: a) Synthese peroxisomaler Proteine an freien Ribosomen; b) Import von Matrix-Proteinen, Beteiligung u.a. von Pex 7,18,20 und 21, Translokations-Maschinerie in gelb; c) Import von peroxisomalen Transmembran-Proteinen, Beteiligung von Pex 19p (grün); d)Insertion von Membran-Lipiden aus dem ER; e) Teilung von Peroxisomen, Beteiligung von Pex 11 und 25; (g und h): Nahezu proteinleere „Ghosts“ werden aus Proto- (oder auch Pre-) Peroxisomen gebildet (h). peroxisomale Membranproteine (c') und andere peroxisomale Matrix-Proteine (g) werden inseriert. (45)

Abbildung 7 illustriert die Theorie der Befürworter der Proliferations-Theorie. Aus einem Proto-Peroxisom entsteht durch Proteinimport ein reifes Peroxisom, das sich teilen kann. Die Befürworter der ER-Beteiligungstheorie würden in dieser Abbildung das Proto-Peroxisom gegen das Endoplasmatische Retikulum ersetzen und den Bereich e), der die Teilung betrifft streichen. Der Proteinimport und die Reifung der Peroxisomen sind unumstritten.

Die Diskussion über die Peroxisomen-Biogenese wird wohl noch einige Zeit anhalten. Vermutlich ist die Wahrheit darüber ein Kompromiss der beiden Theorien. Vielleicht handelt es sich bei den „Proto-Peroxisomen“ tatsächlich um Vesikel, die aus dem ER stammen. Andererseits ist es auch möglich, dass Peroxisomen nicht ausschließlich de novo gebildet werden, sondern sich auch durch Teilung vermehren. Die Lebensdauer dieser Organellen könnte dies erforderlich machen.

## 1.4 Zielsetzung

Bis vor einiger Zeit wurden Fettsäuren und Lipide lediglich als Bestandteile von Membranen verstanden. Nach und nach wurde auch ihre Funktion in Signalwegen immer deutlicher. Es wurden Membran-Lipide wie  $PIP_2$  und  $PIP_3$  als Signalmoleküle identifiziert. Auch Fettsäuren, wie z.B. Arachidonsäure, wurden als Moleküle identifiziert, die eine Signalfunktion haben. Neben ihrer Signalfunktion sind diese Moleküle jedoch auch Teil des Fettsäure- und Lipid-Stoffwechsels.

LC-FACS-Proteine aktivieren freie Fettsäuren mit einem Molekül Coenzym A. Anschließend können diese Fettsäuren verschiedene Wege in der Zelle nehmen. Unter anderem können sie in Lipide, wie z.B.  $PIP_2$  oder  $PIP_3$  eingebaut werden. Wenn nun LC-FACS-Proteine defekt oder ausgeschaltet sind, kann dies fatale Folgen für die Zelle haben. Dies können neben einer reduzierten Nährstoffversorgung auch Defekte sein, die über verschiedene Signalwege gesteuert sind. LC-FACS-Proteine bilden die Voraussetzung dafür, dass Fettsäuren in Lipide ein- und ausgebaut oder degradiert werden können. Auch der Einbau von Doppelbindungen erfordert ein Acyl-CoA. Sie stellen somit eine der wichtigsten Enzymklassen im Fettsäurestoffwechsel dar.

In Dictyostelium wurde bisher das LC-FACS1-Protein beschrieben. Obwohl dieses Protein ausgeschaltet wurde, konnten keine physiologischen Defekte festgestellt werden. Die verminderte Aufnahme von Fettsäuren aus Endosomen, die gemessen wurde, hat, obwohl das Protein auf Endosomen lokalisiert, erstaunlicherweise keinerlei Auswirkungen auf das Wachstum oder endozytotische Prozesse. In dieser Arbeit soll nun untersucht werden, ob LC-FACS-Proteine in Dictyostelium Einfluss auf die Endozytose haben.

In einem ersten Versuch soll die LC-FACS1-Funktion näher beschrieben werden. Durch das Ausschalten eines weiteren Proteins, das nachweislich eine wichtige Rolle im endozytotischen Transit einnimmt, sollen synthetische Effekte produziert werden, aus denen man Aufschluss über bisher unbekannte LC-FACS-Funktionen erhalten kann. Außerdem soll mit neu etablierten Methoden die Lipid-Zusammensetzung von LC-FACS1-Mutanten analysiert werden.

In einem zweiten Ansatz soll geklärt werden, ob in Dictyostelium-Zellen noch weitere LC-FACS-Proteine existieren, die die Endozytose beeinflussen. Katharina von Löhneysen konnte während ihrer Promotion zeigen, dass die Phagozytose in Dictyostelium abhängig von der korrekten Funktion einer oder mehrerer LC-FACS-Proteine ist. Unter Einfluss des LC-FACS-Inhibitors TriacsinC sinkt die Phagozytoserate konzentrationsabhängig. Um das „Target“ von TriacsinC zu identifizieren, soll eine Datenbank-Recherche durchgeführt werden. Sind ein oder zwei passende Kandidaten gefunden, soll deren Einfluss auf endozytotische Prozesse analysiert werden. Mit Hilfe von „Knock-Out“ und Überexpressions-Mutanten soll dann geklärt werden, welche Bereiche des endozytotischen Transits betroffen sind. Auch hier müssen Lipid-Analysen zeigen, ob die Lipid-Zusammensetzung in den Mutanten verändert ist. Möglicherweise kann ein Zusammenhang zwischen der Lipid-Zusammensetzung und dem endozytotischen Transit in Dictyostelium hergestellt werden.



## 2 Ergebnisse

### 2.1 Synthetische Effekte in LCFACS1/VacuolinB Doppelmutanten

Katharina von Löhneysen konnte während ihrer Promotion in der Abteilung Zellbiologie der Universität Kassel zeigen, dass der Knockout der LC-FACS1 in *Dictyostelium* einen sehr milden Phänotyp aufweist. Außer einer reduzierten Aufnahme extrazellulär angebotener Fettsäuren in zelluläre Kompartimente, zeigten sich die Mutanten unauffällig in Bezug auf Wachstum und endozytotische Prozesse (99).

Interessanterweise gibt es Endosomen-Stadien, in denen die LC-FACS1, eine Komponente saurer Endosomen, mit Vacuolin, einem Protein neutraler Endosomen geringfügige Überlappungen zeigen.

Aufgrund dieser partiellen Ko-Lokalisation verwenden wir nun Vacuolin B als Partner für eine Doppelmutation, da das Fehlen von Vacuolin B einen schwerwiegenden Phänotyp aufweist.

#### 2.1.1 Der Phänotyp der Doppelmutante wird im Vergleich zum Phänotyp der Vacuolin „Knock-Out“ Zellen partiell gerettet

Es wurde ein Vektor konstruiert, in dem die cDNA des *fcsA* Gens, das für die LC-FACS1 codiert, durch eine G418 Resistenz-Kassette unterbrochen ist. Dieser Vektor (#339) wurde mit BstEII und EcoRV verdaut und das resultierende modifizierte *fcsA*-Gen durch Elektroporation in VacuolinB Null-Zellen eingebracht. Resistente Klone aus unabhängigen Populationen wurden über Western-Blot Analyse identifiziert. Es konnten ca. 90% der Klone als Doppelmutanten identifiziert werden. Nach ersten Vergleichen der „Knock-Out“ Stämme innerhalb und zwischen Populationen, verhielten sich alle Klone gleich und es wurde zur weiteren Analyse nur noch der Klon b5 verwendet.

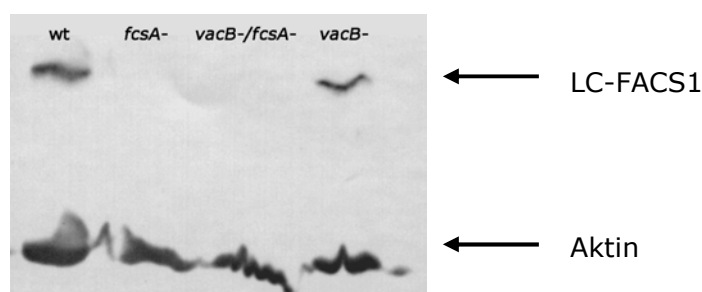


Abbildung 8: Western-Blot-Analyse der Doppelmutanten; es wurden gleiche Proteinmengen aufgetragen. In *fcsA*<sup>-</sup> und *vacB*<sup>-</sup>/*fcsA*<sup>-</sup>-Zellen kann keine Bande mit den LC-FACS1 spezifischen Antikörper 221-457-5 mehr nachgewiesen werden (oben). Die untere Bande zeigt Aktin als Kontrolle.

LC-FACS1 „Knock-Out“-Zellen weisen eine reduzierte Aufnahme des Fettsäure-Analogons C<sub>1</sub>-Bodipy-C<sub>12</sub> auf. Mit Hilfe von Bodipy-Assays wurde geklärt, ob auch die Doppelmutanten eine geringe Menge C<sub>1</sub>-Bodipy-C<sub>12</sub> aufnehmen. Die Assays zeigen, dass das Ausschalten der LC-FACS1 im Vacuolin Null Hintergrund ebenfalls mit einer Reduktion der C<sub>1</sub>-Bodipy-C<sub>12</sub> Aufnahme einhergeht (Abb. 9A).

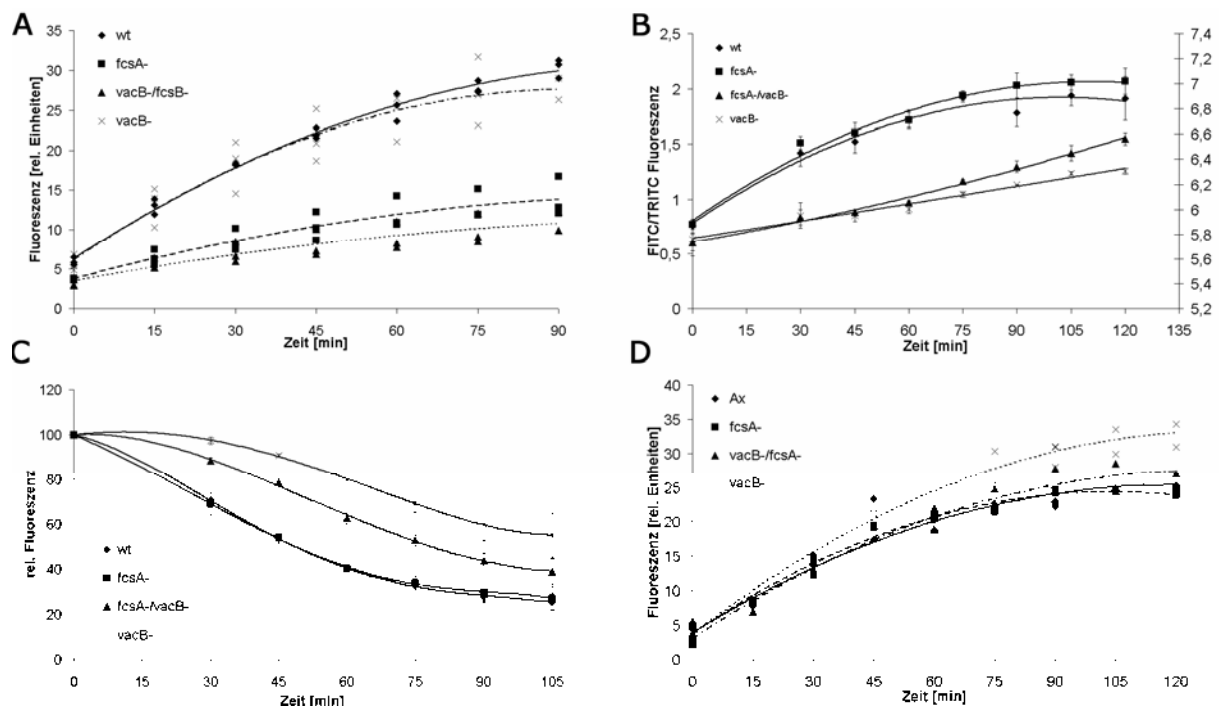


Abbildung 9: Der endozytotische Transit und damit verbundene Prozesse sind in den Doppelmutanten partiell gerettet

A) Die Aufnahme extrazellulär angebotener Fettsäuren bleibt in den Doppelmutanten reduziert. (n=3) B) Die Werte zeigen den Quotienten aus FITC-Dextran/TRITC-Dextran und entsprechen dem pH-Verlauf von Endosomen. Die Doppelmutanten sind hier partiell gerettet. Mittelwert aus drei Experimenten mit Standardabweichung C) Endozytotischer Transit: Die Daten sind dieselben wie in B, hier wurde jedoch nur die Werte für die TRITC-Dextran Messung aufgetragen. Die Doppelmutanten sezernieren den Flüssigphasen-Marker ca. 20 Minuten früher als die vacB<sup>-</sup>-Zelle. In B und C ist ein Assay exemplarisch dargestellt (n=3). D) Aufnahme von Flüssigphasen-Markern: Durch die Transit-Verzögerung, erreichen vacB<sup>-</sup>-Zellen den „steady state“ zwischen Endo- und Exozytose später. Die Doppelmutanten zeigen eine leichte Erhöhung der Pinozytoserate.

Um zu testen, ob die LC-FACS1 Einfluss auf den Endozytoseweg hat, wurden nun die für vacB<sup>-</sup>-Zellen typischen Veränderungen in den Doppelmutanten untersucht. Hierbei zeigte sich, dass die Doppelmutanten keine solche extreme Transitverzögerung mehr aufweisen, obwohl sie, wie vacB<sup>-</sup>-Zellen, ein vergrößertes spätes Endosom besitzen (nicht gezeigt). Sie sind bezüglich der Zeit, die sie für den Transit von Flüssigphasen-Markern benötigen (Abb. 9C), aber auch bezüglich der pH-Wert-Veränderung partiell gerettet (Abb. 9B). D.h. anstatt der 40minütigen Verspätung im Transit des vacB<sup>-</sup>-Stammes, zeigen die Doppelmutanten nur eine Verzögerung von ca. 20 Minuten (Abb. 9C). Vergleicht man den Verlauf der pH-Wert-Änderung (Abb. 9B), so zeigt der Wildtyp eine pH-Wert-Änderung

von ca. 5,8 auf ca. 6,7.  $\text{VacB}^-$ -Zellen weisen eine Änderung des pH-Wertes von ca. 5,8 auf ca. 6,3 und die Doppelmutanten von ca. 5,8 auf ca. 6,6 auf.

In VacuolinB Null Zellen zeigt eine Messung der Makropinozytose-Aktivität, dass das Plateau, das sich einstellt, wenn die Endo- und Exozytose von Flüssigphasen-Marker sich im „steady state“ befinden, später erreicht wird (Abb. 9D). Da der endozytotische Transit der Doppelmutanten in etwa zwischen dem von Wildtyp und  $\text{vacB}$  „Knock-Out“ Zellen liegt, ist zu erwarten, dass auch der „steady state“ zwischen diesen beiden Stämmen liegt. Tatsächlich kann eine leichte Verschiebung des „steady state“ gegenüber dem Wildtyp detektiert werden (Abb. 9D). Sie erreicht jedoch nicht die Ausmaße der Transit-Verschiebung.

Der Grund für eine solche Verschiebung des „steady state“ könnte einerseits eine Verringerung der Exozytoserate sein; andererseits auch eine Veränderung der Fusions- und Fission-Eigenschaften an Endosomen.

Bezüglich der Exozytoserate lagen auch für  $\text{vacB}^-$ -Zellen keine Daten vor. Zunächst wurde die Exozytoserate indirekt durch die Messung der  $\alpha$ -Mannosidase- bzw. saure Phosphatase-Aktivität innerhalb und außerhalb von Zellen bestimmt. Die  $\alpha$ -Mannosidase findet man in eher neutraleren Endosomen, die saure Phosphatase in eher saureren Endosomen. Daher wird die saure Phosphatase zum Großteil in den Zellen zurückgehalten. Die  $\alpha$ -Mannosidase wird zu ca. 60 % sezerniert.

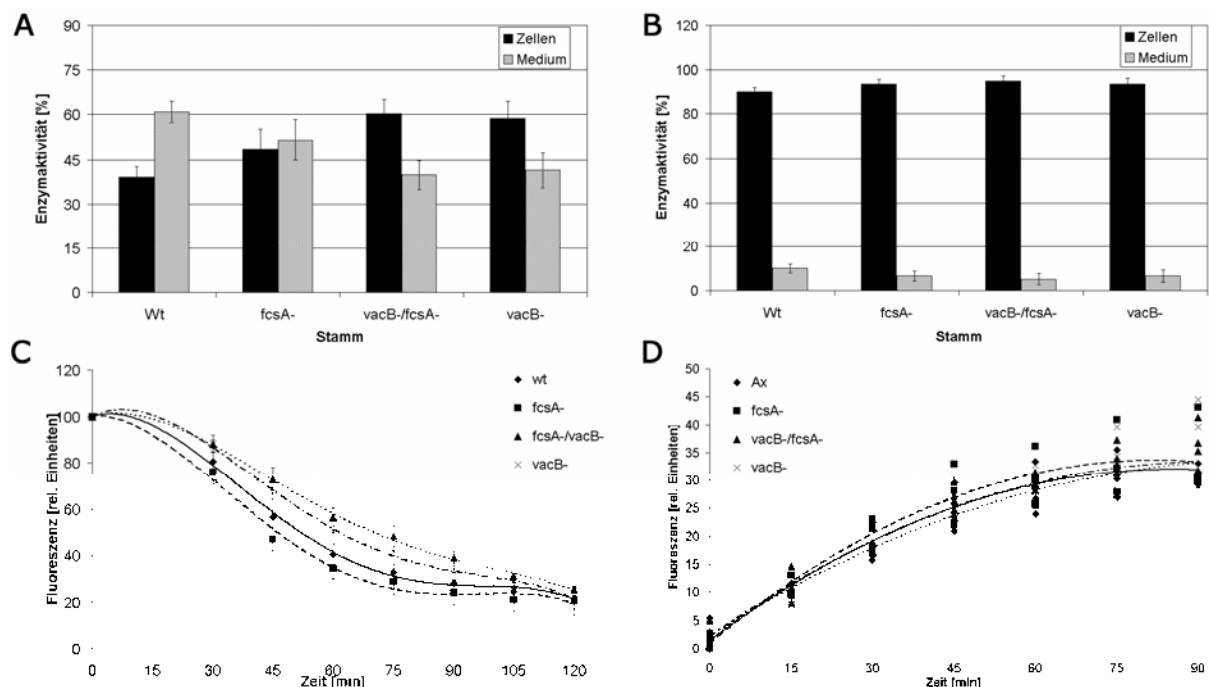


Abbildung 10: Die Exozytoserate und die Phagozytoserate in den Doppelmutanten unterscheiden sich nicht im Vergleich zu Vacuolin Null Zellen. Die Sekretion der lysosomalen Enzyme  $\alpha$ -Mannosidase A) und saure Phosphatase B) ist in  $\text{vacB}^-$ -Zellen und  $\text{vacB}^-/\text{fcsA}^-$ -Zellen reduziert. (n=8) C) Die Exozytoserate hingegen ist in  $\text{vacB}^-$ -Zellen und  $\text{vacB}^-/\text{fcsA}^-$ -Zellen in gleichem Maß verzögert. Mittelwert aus 3 Experimenten. D) Die Phagozytoserate ist in allen Stämmen wildtypisch (n=5)

Für  $vacB^-$ -Zellen kann man eine verminderte Sekretion beider lysosomaler Enzyme feststellen. Dies gilt allerdings auch für die Doppelmutante. In beiden Stämmen wird die  $\alpha$ -Mannosidase zu ca. 60 % zurückgehalten (Abb. 10A) und die saure Phosphatase kaum messbar sezerniert (Abb. 10B).

Da die Aktivitäts-Messung lysosomaler Enzyme die Exozytoserate nur indirekt bestimmen kann, wurde diese zusätzlich mit Hilfe eines fluorimetrischen Assays analysiert. In Abbildung 10 C ist dargestellt, dass hier ebenfalls die Exozytoserate von  $vacB^-$ -Zellen und auch die von  $vacB^-/fcsA^-$ -Zellen im Vergleich zu wildtypischen Zellen reduziert ist. Beide Mutanten beginnen, wie der Wildtyp, sofort zu exozytieren. Allerdings ändert sich im Laufe der Messung die Rate der Exozytose.

Die Doppelmutante, aber auch Vacuolin Null Zellen zeigen die gleiche, verminderte Exozytose-Aktivität. Dies allein könnte nur erklären, warum ein Stamm eine Verzögerung im endozytotischen Transit zeigt. Die Beschleunigung im endozytotischen Transit der Doppelmutanten gegenüber  $vacB^-$ -Zellen kann hiermit nicht erklärt werden.

Der endosomale pH-Wert der Doppelmutanten liegt ebenfalls zwischen wildtypischem Wert und dem Wert der  $vacB^-$ -Zellen. Es wird vermutet, dass der reduzierte pH-Wert von Vacuolin „Knock-Out“-Zellen durch eine anhaltende Fusions-Aktivität von sauren mit bereits neutralisierten Endosomen verursacht wird. Ein höherer pH-Wert könnte in diesem Fall auf eine verminderte Fusions-Aktivität von sauren mit bereits neutralisierten Endosomen hindeuten. Es ist jedoch auch denkbar, dass die pH-Wert-Erhöhung durch vermehrte Fissions-Ereignisse entsteht. Ein erhöhtes Recycling der Protonenpumpe würde auch in einer Erhöhung des pH-Wertes resultieren.

Die Fusions- und Fissions-Ereignisse zu untersuchen ist schwierig. Mit der fluoreszierenden Substanz „Lucifer Yellow“ steht uns jedoch eine Möglichkeit zur Verfügung, Recyclingvorgänge indirekt beobachten zu können. „Lucifer Yellow“ durchläuft nicht gemeinsam mit TRITC-Dextran den endozytotischen Transit, sondern gilt als Marker für Recycling-Vorgänge (51, 62).

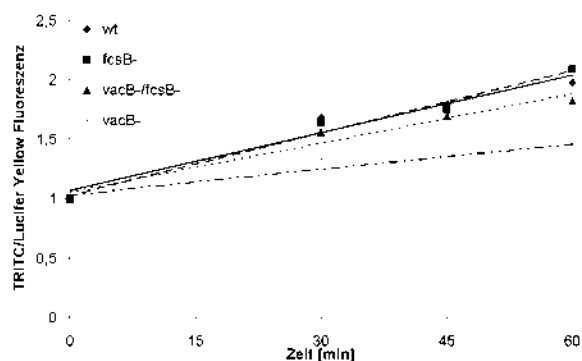


Abbildung 11: Das Recycling in  $vacB^-/fcsB^-$ -Zellen ist partiell gerettet; es wird hier exemplarisch ein Assay dargestellt; der Assay wurde analog einem Transit Assay durchgeführt, es wurden 2 mg/ml „Lucifer Yellow“ eingesetzt.

Mit Hilfe eines Assays, in dem sowohl TRITC-Dextran, als auch „Lucifer Yellow“ endozytiert werden, kann die Abgabe von TRITC-Dextran und die Akkumulation von „Lucifer Yellow“ beobachtet werden. In einem Vergleich zwischen *vacB*<sup>-</sup>-Zellen und den Doppelmutanten kann eine erhöhte Recycling-Aktivität in den Doppelmutanten detektiert werden. Im Vergleich zum Wildtyp zeigen die Doppelmutanten jedoch eine geringere Recycling-Fähigkeit (Abb. 11).

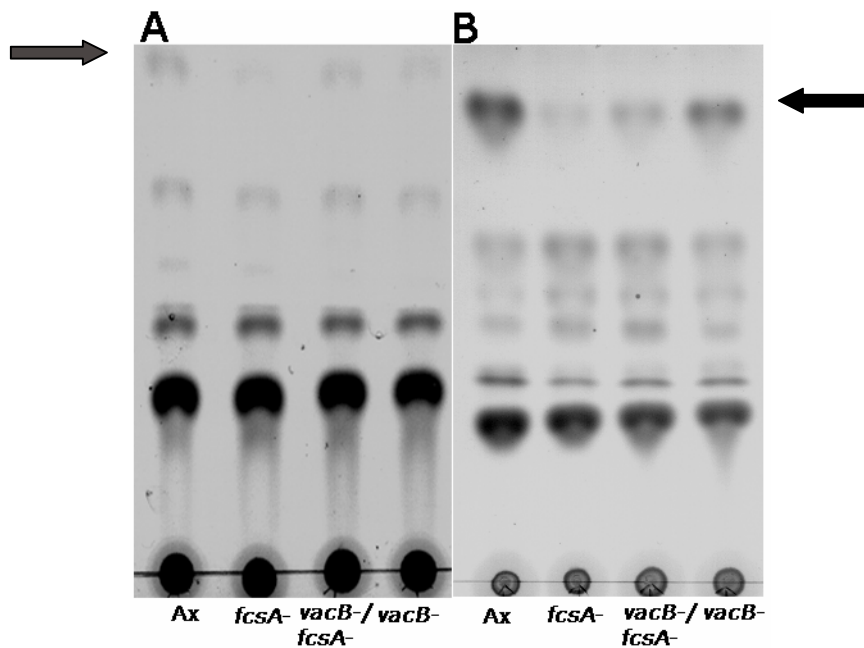
Das Verhältnis der Stämme zueinander erinnert an das Verhältnis, das im endozytotischen Transit gemessen wurde. Auch hier liegen die Werte der Doppelmutanten zwischen *vacB*<sup>-</sup>-Zellen und dem Wildtyp. Somit korreliert die Beschleunigung im endozytotischen Transit der Doppelmutanten mit einer verbesserten Recycling-Fähigkeit. Die Ursache dafür ist das Ausschalten eines Gens, das nachweislich am Fettsäurestoffwechsel beteiligt ist.

Um zu prüfen, ob dies Einfluss auf die Lipid-Zusammensetzung hat, wurde diese unter verschiedenen Kultivierungs-Bedingungen analysiert. Da in allen Zellen eine wildtypische Phagozytoserate vorliegt (Abb. 10D), können die Lipid-Isolationen der Stämme auch in bakteriell kultivierten Zellen gut verglichen werden.

### 2.1.2 Der Gehalt an Triglyceriden in *fcsA*<sup>-</sup> und *vacB*<sup>-</sup>/*fcsA*<sup>-</sup> ist reduziert

*FcsA*<sup>-</sup>-Zellen zeigen eine reduzierte Aufnahme extrazellulär angebotener Fettsäuren. Zwar zeigen diese Zellen keine Defekte in zellulären Funktionen, eine Veränderung in der Zusammensetzung ihrer Membranen ist jedoch nicht auszuschließen. Da durch die vorangegangenen Untersuchungen keine spezifische Organelle innerhalb einer Zelle ausgemacht werden kann, die von Membran-Veränderungen betroffen sein könnte, wurde die Lipid-Zusammensetzung ganzer Zellen analysiert.

Abbildung 12A zeigt, dass in axenisch kultivierten Zellen die obere Bande (Pfeil links) in *fcsA*<sup>-</sup>, *vacB*<sup>-</sup>/*fcsA*<sup>-</sup>-Zellen, aber auch in *vacB*<sup>-</sup>-Zellen weniger intensiv erscheint als im Wildtyp. Diese unterschiedlichen Intensitäten können jedoch auch in der darunter liegenden Bande beobachtet werden. Daher könnte es sich hierbei um Schwankungen in der Extraktion handeln. Die Intensität der Banden macht deutlich, dass axenisch kultivierte Zellen kaum Material beinhalten, um ein reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten. Um mögliche Unterschiede besser sichtbar zu machen, wurden die Zellen in bakterieller Suspension kultiviert.



**Abbildung 12: Dünnschichtchromatographie von Gesamtzell-Lipidisolierungen von Dictyostelium Stämmen** A) Isolation von axenisch gewachsenen Zellen B) Isolation von bakteriell gewachsenen Zellen Laufmittel in beiden Fällen Hexan:Diethylether:Essigsäure 70:30:1; Der Pfeil deutet auf die Bande, bei der es sich um Triglyceride handelt. Die Identitäten der übrigen Banden sind nicht bekannt. Die Banden wurden durch Inkubation mit Kupfersulfat-Lösung bei 160°C sichtbar gemacht.

In Abbildung 12B sind die Banden, die in der TLC detektiert werden können intensiver und zahlreicher. Hier kann in *fcsA*<sup>-</sup>-Zellen und in *vacB*<sup>-</sup>/*fcsA*<sup>-</sup>-Zellen ebenfalls eine Reduktion der Triglycerid-Bande detektiert werden (Pfeil rechts). Die darunter liegende Bande zeigt hier, dass vermutlich sogar mehr Gesamtlipid von *fcsA*<sup>-</sup> und *vacB*<sup>-</sup>/*fcsA*<sup>-</sup> aufgetragen wurde, obwohl die Triglycerid-Bande schwächer ist.

Eine Reduktion der Triglycerid-Menge scheint also mit einer Beschleunigung des endozytotischen Transits zu korrelieren. Dies gilt jedoch nur für Zellen, deren Transit bereits durch das Fehlen von VacuolinB gestört ist.

## 2.2 Gibt es eine LC-FACS in Dictyostelium, die Einfluss auf die Phagozytoserate hat?

Auf einer Konferenz wurden wir auf die Arbeit von Dr. Robin Williams aufmerksam. Er interessiert sich für die Wirkung von Antidepressiva. Hierzu hat er in *Dictyostelium* REMI-Mutanten (REMI=Restriction enzyme mediated integration) hergestellt, die er darauf selektiert hat, in Anwesenheit antidepressiv wirkender Agenzien, wie LiCl oder Valproat, in den Entwicklungszyklus einzutreten. In einer REMI-Mutante (3-18) wurde ein Gen inhibiert, das als Long Chain-Fatty Acyl CoA Synthetase identifiziert wurde. Die Integration des REMI-Plasmides erfolgte vor dem Gen im potentiellen Promotor des Gens (Abb. 13A). Das Gen wird im folgenden *fcsC* und das Protein LC-FACS3 genannt.

In einer Kooperation mit Dr. Williams wurde die Phagozytoserate verschiedener REMI-Mutanten ermittelt. Hierbei wurde auch die Mutante 3-18 untersucht. Diese Mutante zeigt eine um ca. 20 % erhöhte Phagozytoserate (Abb. 13B).

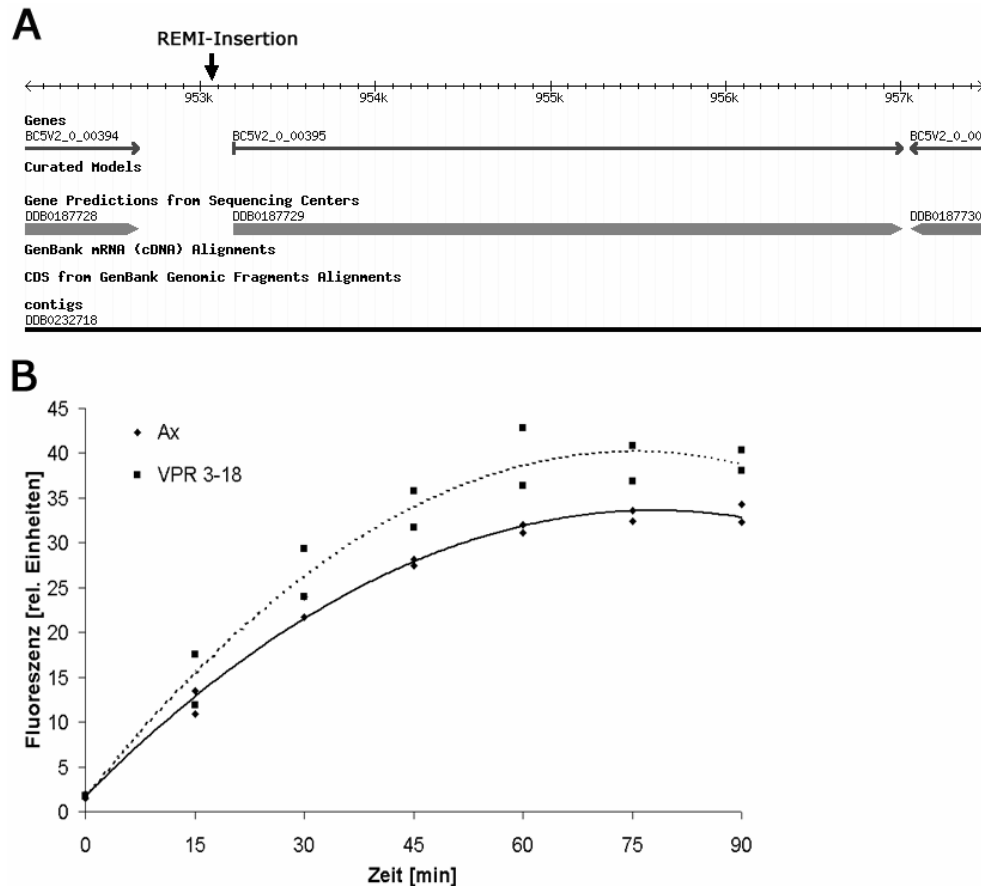


Abbildung 13 : Die REMI-Mutante 3-18 zeigt eine Erhöhung der Phagozytoserate; A) genomische Darstellung der Region 952428 bis 957769 auf Chromosom 5. Die Insertion befindet sich ca. 150 bp vor dem ATG. Das Gen überspannt, ohne Introns, den Bereich von 953191 bis 957006 auf dem „Watson Strang“. B) Die Phagozytoserate ist um ca. 20 % erhöht im Vergleich zu AX4-Zellen, in denen die REMI-Mutagenese durchgeführt wurde.

Die Tatsache, dass ein Enzym aus dem Fettsäure-Stoffwechsel, einen Einfluss auf die Phagozytoserate zeigt, scheint im Hinblick auf diese Arbeit sehr interessant zu sein.

Es handelt es sich bei der LC-FACS3 (DDB0187729) um ein größeres Protein, als bei den anderen LC-FACS Proteinen in Dictyostelium und anderen Organismen. Dabei kann das Protein in zwei Untereinheiten eingeteilt werden. Der N-terminale Bereich weist Homologien zu allen dargestellten LC-FACS-Proteinen auf. Der C-terminale Bereich hingegen hat eine Domäne, die auf drei unterschiedliche Weisen von dem Programm „SMART“ gedeutet wird. Zum einen wird eine  $3\beta$  Hydroxysteroiddehydrogenase erkannt. Diese Domäne wird aber auch als NAD-Bindesequenz oder Epimerase-Domäne erkannt. Zusätzlich befindet sich am äußersten N-Terminus eine Zinkfinger-Domäne.

Um mehr über die Funktion der N- bzw. C-terminalen Domänen der LC-FACS3 zu erfahren, wurden GFP-Konstrukte der Domänen erstellt (# 432: N-Terminus-GFP; # 439: GFP-C-Terminus). Hier sollte untersucht werden, ob die C-terminale Domäne Einfluss auf die Lokalisation der N-terminalen Domäne nimmt. Ein Volllänge-GFP-Konstrukt sollte als Referenz dafür dienen. Leider wurde dieses Konstrukt nicht in Dictyostelium exprimiert.

Die Lokalisation von Konstrukt #432 zeigt jedoch eine lockere Bindung an endosomale Strukturen (Abb. 14A). Mittels einer Doppelfärbung mit dem LC-FACS1 Antikörper (mAK 221-457-5) konnte sogar eine partielle Ko-Lokalisation nachgewiesen werden (Abb. 14A). Mit Hilfe einer Membranassoziations-Untersuchung konnte allerdings nur eine zytoplasmatische Lokalisation, ohne Assoziation zu Membranen, festgestellt werden (Abb. 14B).

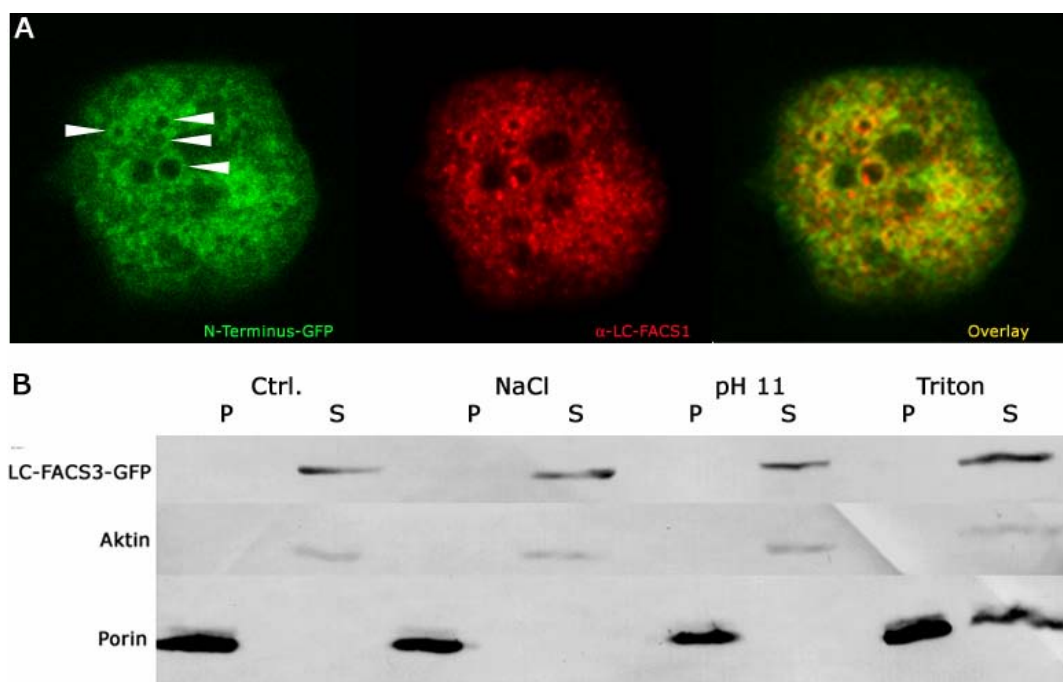


Abbildung 14: Das Konstrukt N-Terminus-GFP lokalisiert peripher an endosomalen Strukturen; A) Das N-terminale GFP-Konstrukt lokalisiert an endosomalen Strukturen, die partiell mit dem LC-FACS1 Antikörper ko-lokalisieren. Die Bildbreite beträgt jeweils 25  $\mu\text{m}$  B) Eine Membranassoziations-Studie zeigt, dass sich das N-terminale GFP-Konstrukt wie ein lösliches Protein (siehe Aktin) und nicht wie ein Transmembran-Protein (siehe Porin) verhält.

Konstrukt #439 hingegen zeigt keine Assoziation mit Organellen. Hier kann lediglich eine zytoplasmatische Färbung beobachtet werden (Abb. 15). Die Färbung zeigt keine Übereinstimmungen mit dem ER (Abb. 15) oder dem Zytoskelett (nicht gezeigt). Daraus resultiert, dass sich das Protein wie ein lösliches Protein in einer Membranassoziations-Studie verhält (nicht gezeigt).



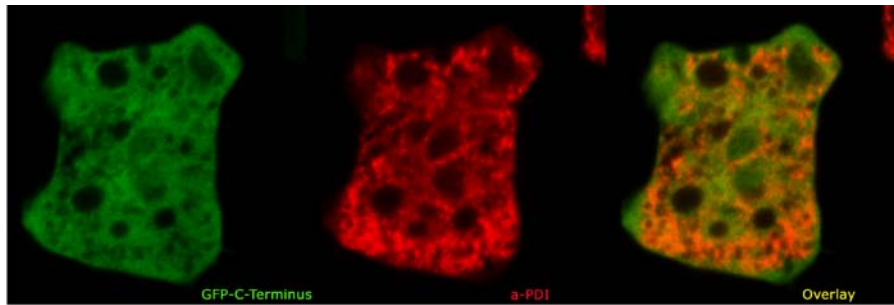


Abbildung 15: Die Lokalisation des C-terminalen GFP-Konstruktes ist zytoplasmatisch. Das Konstrukt #432 ko-lokalisiert nicht mit Strukturen des ER ( $\alpha$ -PDI). Die Bildbreite beträgt jeweils 20  $\mu$ m

Der Bereich der LC-FACS3, der die Homologie zu LC-FACS-Proteinen zeigt, liegt im N-Terminus. Dieser zeigt eine partielle Ko-Lokalisation mit der LC-FACS1. Aufgrund dieser Ko-Lokalisation sollte nun getestet werden, ob Konstrukt #432 in der Lage ist, die Funktion der LC-FACS1 übernehmen. Hierfür wurde das Konstrukt #432 in *fcsB*<sup>-</sup>-Zellen transformiert.

Da *fcsB*<sup>-</sup>-Zellen sich nur in der Aufnahme rate extrazellulär angebotener Fettsäuren vom Wildtyp unterscheiden, wurde die Aufnahme des fluoreszenzmarkierten Fettsäure-Analogons C<sub>1</sub>-Bodipy-C<sub>12</sub> untersucht (Abb. 16).

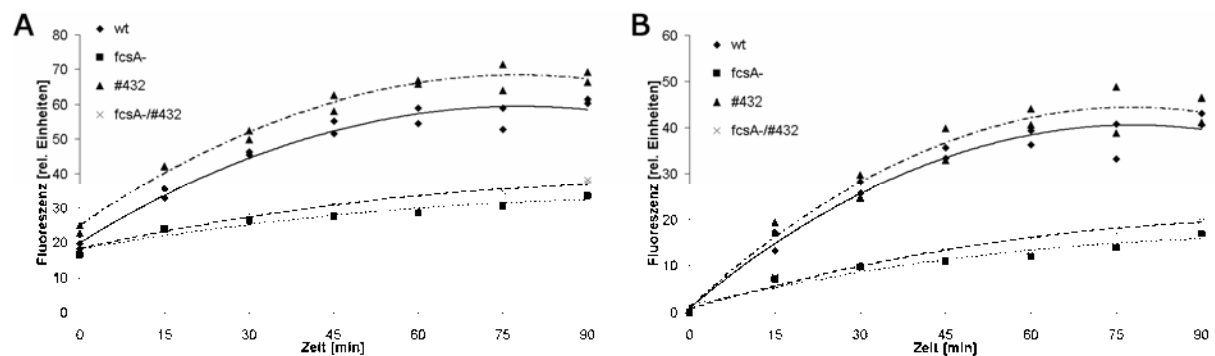


Abbildung 16: Die Bodipy-Aufnahme in Zellen, die Konstrukt #432 exprimieren verändert sich nicht. Auch die Aufnahme rate von *fcsA*<sup>-</sup>/#432-Zellen ändert sich nicht. In A) scheint die Aufnahme rate von Zellen, die das Konstrukt #432 exprimieren etwas erhöht. Dies liegt aber daran, dass diese Zellen einen erhöhten Startwert aufzeigten. Setzt man in allen Fällen den Startwert=0 und gleicht die restlichen Werte an, so kann man von einer wildtypischen Aufnahme rate sprechen.

Abbildung 16 zeigt, dass die LC-FACS3 nicht die Funktion der LC-FACS1 ersetzen kann. Die Aufnahme des fluoreszenz-markierten Fettsäureanalogons bleibt in *fcsA*<sup>-</sup>/#432 unverändert. Auch das Konstrukt #439 (nicht gezeigt) kann keine Veränderung in der Aufnahme rate von Fettsäuren hervorrufen.

Da die Funktion der LC-FACS3 vermutlich nicht die Aufnahme von Fettsäuren aus Endosomen ist, sollte nun durch einen „Knock-Out“ dieses Gens der REMI-Phänotyp

bestätigt und genauer analysiert werden. Hierfür wurde der N-terminale Bereich verwendet und mit einer  $Bs^I$ -Kassette unterbrochen. Über homologe Rekombination sollte dieser dann den endogenen Bereich ersetzen. Leider konnte kein „Knock-Out“ dieses Gens erzielt werden. Mehrere Versuche zeigten keinen Erfolg.

Im Zuge dieser Untersuchungen wurde eine RT-Reaktion der LC-FACS3 mRNA aus der REMI-Mutante durchgeführt. Überraschenderweise wird in der REMI-Mutante 3-18 noch *fcsC* mRNA transkribiert. An dieser Stelle wurden die Arbeiten an dieser LC-FACS vorerst eingestellt. Die REMI-Mutante, die durch den Phagozytose-Phänotyp interessant wurde, scheint nicht weiter glaubwürdig. Durch die Insertion vor dem Gen wurde vermutlich ein anderes Gen beeinträchtigt.

Die Lokalisation des N-terminalen Bereichs auf endosomalen Strukturen lässt jedoch Raum für eine Beteiligung an endozytotischen Prozessen. Um dies zu testen, müsste allerdings ein „Knock-Out“ generiert werden. Da dieser trotz diverser Versuche nicht hergestellt werden konnte, könnte es sich bei der LC-FACS3 um ein essentielles Protein handeln. In diesem Fall ist die Herstellung eines „Knock-Outs“ schwierig.

### 2.3 Eine peroxisomale LC-FACS wird für den retrograden Transport von Fettsäuren in Dictyostelium benötigt und beeinflusst indirekt die Aufnahme von Partikeln

Katharina von Löhneysen könnte während ihrer Promotion zeigen, dass die Behandlung von Zellen mit dem LC-FACS Inhibitor TriacsinC in Dictyostelium zu einer Reduktion der Phagozytoserate führt. Wir haben also eine Datenbankrecherche mit Hilfe der LC-FACS Signatur durchgeführt, um weitere LC-FACS Proteine in Dictyostelium zu identifizieren und zu analysieren. Alle gefundenen potentiellen LC-FACS Proteine weisen eine AMP-Bindedomäne und eine LC-FACS-Signatur auf (Abb. 17).

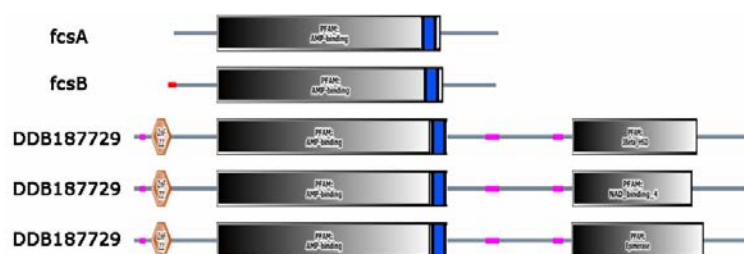


Abbildung 17: SMART-Analyse von Proteinen in Dictyostelium, mit Homologie zu der LC-FACS-Signatur aus (4) *fcsA* zeigt eine AMP-Bindedomäne (grau) und die LC-FACS Signatur (blau), *fcsB* zeigt zusätzlich eine ER-Signal-Sequenz (rot). Eine weitere mögliche LC-FACS (*fcsC*; DDB187729) zeigt zudem eine Domäne, die drei verschiedene Funktionen haben könnte. In rosa dargestellt sind Regionen mit wenig Komplexität. Im N-terminalen Bereich von DDB187729 befindet sich eine Zink-Finger-Domäne.

[http://smart.embl-heidelberg.de/smart/change\\_mode.pl](http://smart.embl-heidelberg.de/smart/change_mode.pl)

Die Datenbankrecherche mit der Sequenz der LC-FACS-Signatur ergab einige potentielle LC-FACS Proteinen in Dictyostelium

Die Sequenzen der mit DDB bezeichneten potentiellen Proteine wurden der Dictyostelium Datenbank ([www.dictybase.org](http://www.dictybase.org)) entnommen. In Tabelle 1 ist der Grad der Homologie zur LC-FACS1 aufgelistet. Es wurden auch weitere potentielle FACS-Proteine gefunden. Die Homologie zur LC-FACS-Signatur war jedoch nicht sehr hoch. Es handelt sich hierbei vermutlich um FACS-Proteine, die Fettsäuren anderer Kettenlängen aktivieren.

Potentielle Gen (Protein)	Homologie zur LC-FACS1	Ähnlichkeiten zu Proteinen in anderen Organismen
fcsB (LC-FACS2)	39% (99)	FAA1 (Hefe); ACLS1 (Säuger)
DDB187729 (LC-FACS3)	30%	

Tabelle 1: Homologien von potentiellen Proteinen aus Dictyostelium zur LC-FACS1 und Proteinen aus anderen Organismen; die Homologien wurden mit dem LALIGN Server berechnet. [http://www.ch.embnet.org/software/LALIGN\\_form.html](http://www.ch.embnet.org/software/LALIGN_form.html)

Neben ihren Ähnlichkeiten zur LC-FACS1 zeigen einige dieser potentiellen Proteine auch Ähnlichkeiten zu Proteinen aus anderen Organismen. fcsB weist Ähnlichkeit zu FAA1 aus Hefe auf. DDB0190808 weist neben der Homologie zur LC-FACS1 auch Ähnlichkeiten zu den LC-FACS Proteinen Faa3p und Faa4p aus Hefe auf. Für DDB205849 konnte eine Ähnlichkeit zu FATP1 aus dem Menschen und Fat1p aus Hefe festgestellt werden. Für DDB0231736 konnte ein mitochondrialer Leader mit 90%iger Wahrscheinlichkeit vorhergesagt werden.

Eine LC-FACS, fcsB, unterscheidet sich durch einen Leader für das Endoplasmatische Retikulum von allen anderen LC-FACS Proteinen. Dieses Protein zeigt auch die höchste Homologie zu der LC-FACS, die auf Endosomen lokalisiert. Eine LC-FACS, die eine ER-Signal-Sequenz trägt, könnte über das ER und den Golgi in Endosomen gelangen und die Verbindung zur Phagozytose darstellen. Diese LC-FACS wurde LC-FACS2 genannt und im Folgenden charakterisiert.

Um mehr über die Funktion der LC-FACS2 zu erfahren, wurden mögliche homologe Proteine in anderen Organismen gesucht. Abbildung 18 zeigt einen Sequenzvergleich, in dem die Sequenz der LC-FACS2, ACSL1 aus dem Menschen und FAA1 aus Hefe gegenübergestellt sind. Neben Bereichen, die kaum Homologien zeigen, existieren jedoch Bereiche mit hoher Homologie. Des Weiteren gibt es relativ viele konservative Aminosäure-Austausche. Die Homologie von FAA1 zur LC-FACS2 beträgt 32 % und die von ACSL1 zur LC-FACS2 beträgt sogar 38%. Die drei verglichenen Proteine könnten also ähnliche Funktionen innerhalb einer Zelle ausüben.

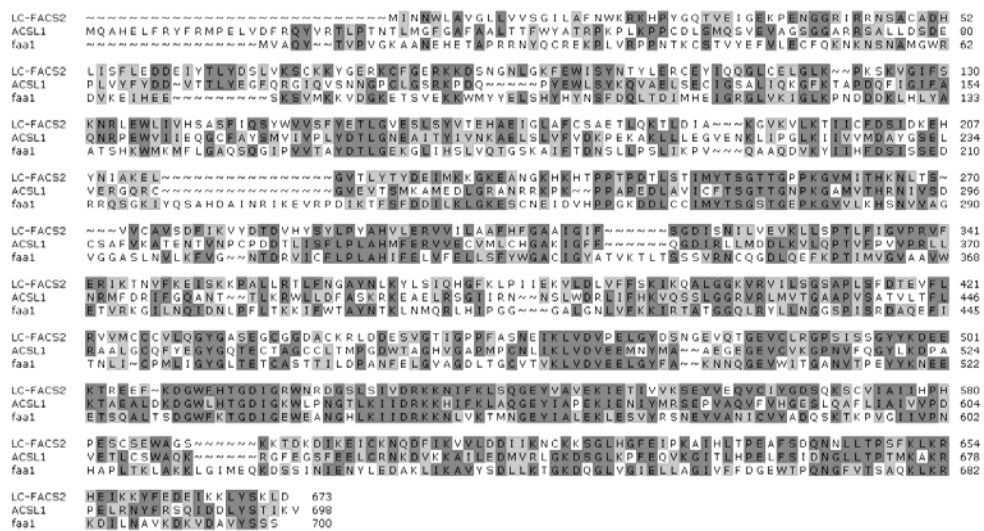


Abbildung 18: Sequenzvergleich zwischen LC-FACS2 und ACSL1 aus dem Menschen, sowie FAA1 aus Hefe. Die dunklen Bereiche stellen identische Aminosäuren dar; bei den hellgrauen Bereichen handelt es sich um konservative Aminosäure-Austausche. Die weißen Bereiche stellen Bereiche dar, in denen sich die Sequenz nicht ähnelt.

### 2.3.1 Die LCFACS2 ist ein Transmembran-Protein und lokalisiert in Peroxisomen

Die SMART-Analyse der LC-FACS2 ergibt, dass sich eine ER-Signal-Sequenz am N-Terminus des Proteins befindet. Proteine, die eine solche Signalsequenz tragen, können luminalen oder transmembranen Charakter besitzen. Für die LC-FACS1 konnte gezeigt werden, dass sie nur mit Membranen assoziiert und kein Transmembran-Protein ist (99). Die LC-FACS2 hingegen ist ein Transmembran-Protein, da sie nur durch die Extraktion mit einem Detergenz in den Überstand gelangt, wie Abbildung 19 zeigt.

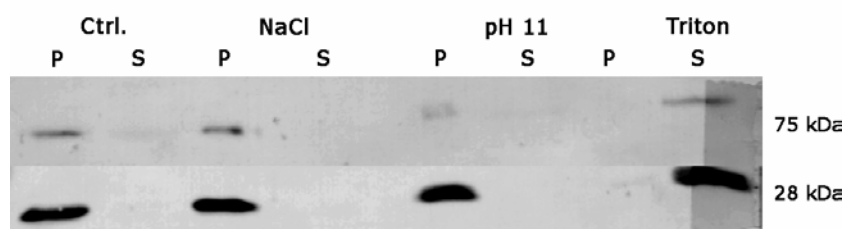


Abbildung 19: Membranassoziation von LC-FACS2 Aufgetragen sind Pellet (P) und Überstand (S) der 100.000 x g Zentrifugation eines postnuklearen Überstandes. Im Pellet befinden sich Membranen und daran haftende oder integrierte Proteine. Durch Erhöhung der Salzkonzentration (NaCl) oder des pH Wertes (pH 11), lösen sich assoziierte Proteine und integrale Proteine verbleiben in der Membran. Erst durch die Zugabe von 1% Triton, werden Membranen aufgelöst und die Transmembran-Proteine gelangen in den Überstand. Als Kontrolle für ein Transmembran-protein wurde mitochondriales Porin (28 kDa) verwendet.

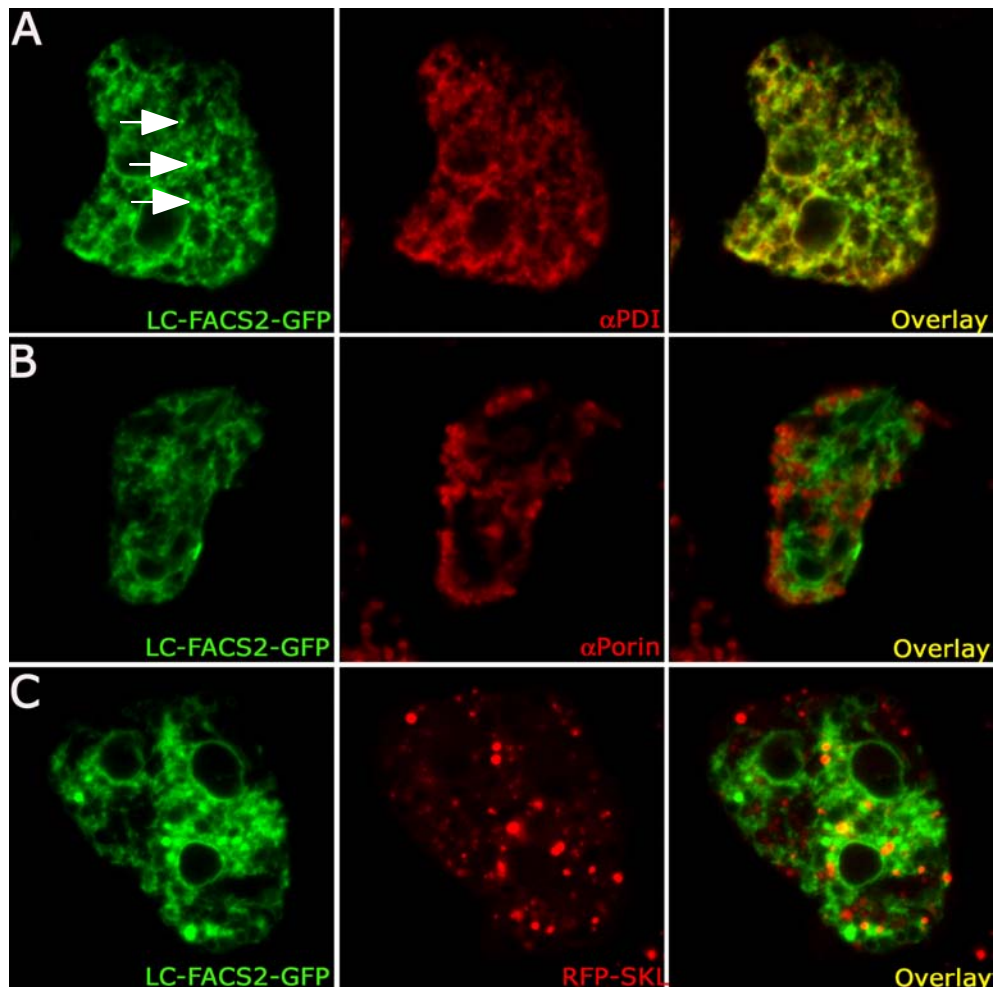


Abbildung 20: LC-FACS2-GFP lokalisiert fast ausschließlich im ER; (A) LC-FACS2-GFP und  $\alpha$ PDI ko-lokalisieren nicht vollständig (Pfeile); mit einem Antikörper gegen das mitochondriale Porin (70-100-1) kann keine Ko-Lokalisation festgestellt werden (B). Durch eine Ko-Transformation von LC-FACS2-GFP (#470) und einem Vector für die Expression von RFP-SKL (zur Verfügung gestellt von Christian Schmauch) kann auch keine Ko-Lokalisation mit von LC-FACS2-GFP und Peroxisomen festgestellt werden. Zellen in A und B wurden fixiert und mit dem Antikörper 221-135-1 (PDI) in A bzw. dem Antikörper 70-100-1 (mito. Porin) in B gefärbt. Die Zellen in C wurden lebend mikroskopiert. Die Bildbreite in A und C beträgt 25  $\mu$ m; in B beträgt sie 20  $\mu$ m.

Das Ergebnis der Membranassoziation kann mit der Analyse von Transmembran-Domänen innerhalb des Proteins bestätigt werden. Das Programm „TMPred“ ([http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED\\_form.html](http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html)) sagt voraus, dass die LC-FACS2 zwei Transmembran-Domänen besitzt.

Da die LC-FACS2 ein Transmembran-Protein ist, ist eine Lokalisation innerhalb einer Membran auf Organellen zu erwarten. Um dies zu überprüfen, wurde am C-terminalen Ende der LC-FACS2 GFP fusioniert (#470). Dieses Konstrukt lokalisiert im Endoplasmatischen Retikulum, wie die Ko-Lokalisation mit der Proteindisulfidisomerase (PDI) bestätigt (Abb. 20A). Neben der Ko-Lokalisation mit der PDI konnten jedoch punktförmige Strukturen detektiert werden, die nicht durch den Antikörper gegen die PDI erkannt wurden (Pfeile in A). Bei diesen Strukturen handelt es sich allerdings weder um Mitochondrien (nachgewiesen durch  $\alpha$ -Porin) noch um Peroxisomen (nachgewiesen durch

RFP-SKL); zwei Organellen, in denen ein LC-FACS Protein lokalisieren könnte (Abb. 20B und C).

Die letzten vier Aminosäuren der LC-FACS2 Sequenz lauten SKLD. Diese Sequenz weist Ähnlichkeiten zur "peroxisomal targeting sequence 1" (PTS1) auf. Außerdem könnte es sich hierbei laut dem Programm PSORT (<http://psort.hgc.jp/>) auch um ein KKXX-like Motiv und somit um ein ER-Rückhaltesignal handeln. Um auszuschließen, dass ein mögliches Signal im C-Terminus durch das GFP überdeckt wird, wurde ein Konstrukt erstellt (#372) in das das myc Epitop eingebracht wurde, damit eine Detektion mit Antikörpern möglich wird. Das myc-Epitop wurde vor die erste Transmembran-Domäne kloniert.

Überraschenderweise zeigt sich keine ausschließliche Lokalisation im Endoplasmatischen Retikulum, sondern auch auf runden bis ovalen Strukturen. Durch eine DAPI-Färbung konnte gezeigt werden, dass es sich hierbei nicht um Mitochondrien handelt (Abb. 21A).

Um zu prüfen, ob die Strukturen Peroxisomen sind (vgl. Abb. 20C), wurde eine Ko-Transformation des Vektors #372 und einem Konstrukt, das GFP-PTS1 enthält, durchgeführt. Tatsächlich konnte eine Ko-Lokalisation von GFP-SKL mit der durch das myc-Epitop dargestellten LC-FACS2 gezeigt werden (Abb. 21B).

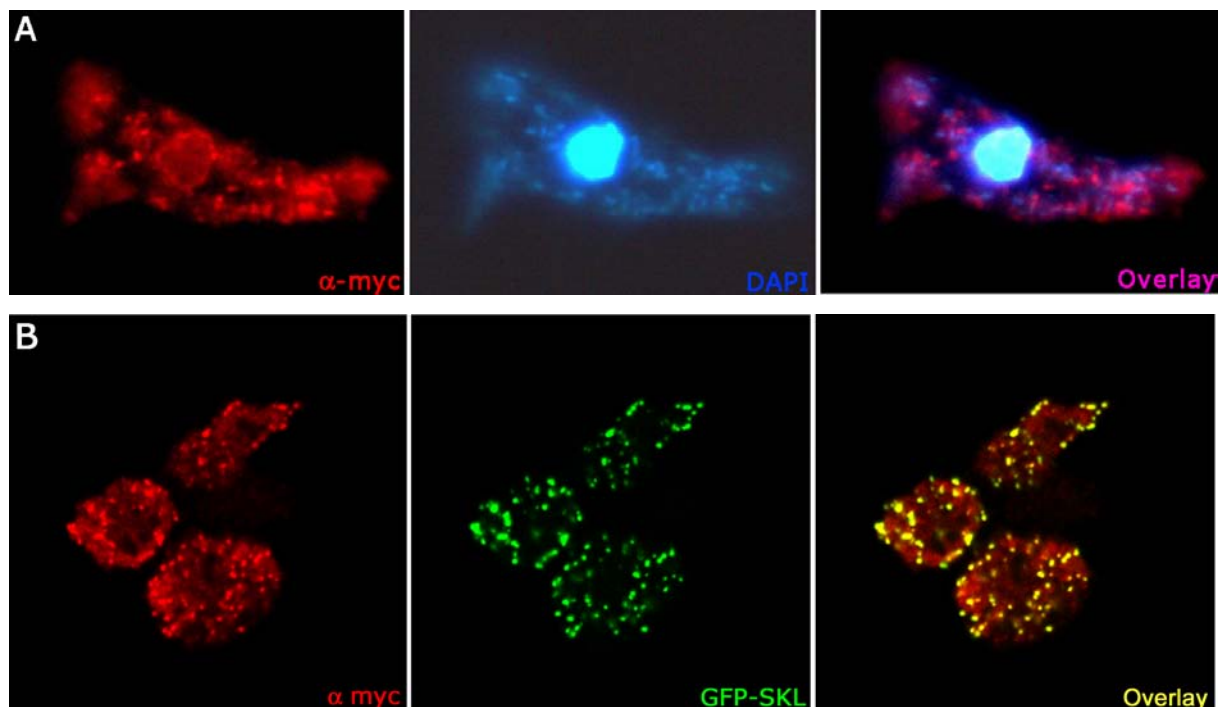


Abbildung 21: Lokalisation von LC-myc-FACS2 A) Es kann keine Ko-Lokalisation mit LCFACS2 ( $\alpha$ -myc) und Mitochondrien (DAPI) festgestellt werden. Aufnahme mit dem Fluoreszenzmikroskop; Die Bildbreite beträgt 25  $\mu$ m. B) Eine Ko-Lokalisation zwischen LC-FACS2 ( $\alpha$ -myc) und Peroxisomen (GFP-SKL) kann detektiert werden. Aufnahme mit dem CLSM. Die Bildbreite beträgt 35  $\mu$ m.

Diese Ko-Lokalisation konnte auch biochemisch nachgewiesen werden. In einer Dichtegradienten-Zentrifugation konnten sowohl die mit dem myc-Epitop versehene LC-FACS2, als auch GFP-PTS1 in den für Peroxisomen typischen Fraktionen (9-12) nachgewiesen werden (Abb. 22).

In den Fraktionen 1 bis 3 findet man ebenfalls GFP-PTS1. Vermutlich stammt dies aus zerstörten Peroxisomen (Abb. 22).

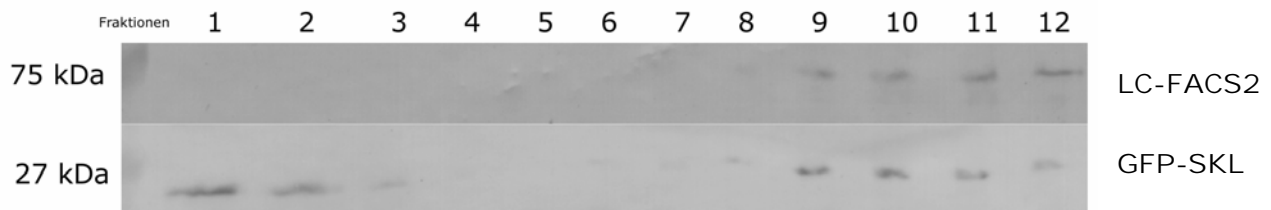


Abbildung 22: Dichtegradienten-Zentrifugation von Zellen, die GFP-PTS1 und LC-FACS2-myc exprimieren; das lösliche GFP findet sich in den schweren Fraktionen 9-12, aber auch in den oberen Fraktionen 1-3. Das Transmembran-Protein LC-FACS2 myc hingegen befindet sich nur in den schweren unteren Fraktionen 9-12, in denen typischerweise Peroxisomen lokalisieren.

### 2.3.2 Herstellung von LC-FACS2-Mutanten

#### „Knock-Out“-Mutanten

Um nun die Funktion der LC-FACS2 in *Dictyostelium* zu klären, wurden verschiedene mutante Stämme hergestellt. Dabei waren nicht alle Experimente für jeden Stamm sinnvoll.

Es wurden „Knock-Out“-Zellen durch Homologe Rekombination hergestellt. Hierzu wurde ein „Knock-Out“-Vektor konstruiert (#392). Durch die Insertion der Blasticidin-Resistenz-Kassette in die cDNA, wird der Leserahmen der Gens unterbrochen. Es entsteht also kein funktionelles Protein.

Dieser Vektor wurde in einen methylierungs-defizienten *E. coli* Stamm GM1674 transformiert, damit er mit Bcl I verdaut werden konnte. Durch diesen Verdau ergibt sich ein ca. 2,6 kb großes Fragment, das dann mittels Elektroporation in Ax2 Zellen eingebracht wurde.

Da für die LC-FACS2 kein Antikörper existiert, musste in diesem Fall der „Knock-Out“ über die veränderte mRNA mittels einer RT-PCR verifiziert werden. Des Weiteren wurde eine PCR mit Primern durchgeführt, die die Insertion des „Knock-Out“-Konstruktes zeigen.

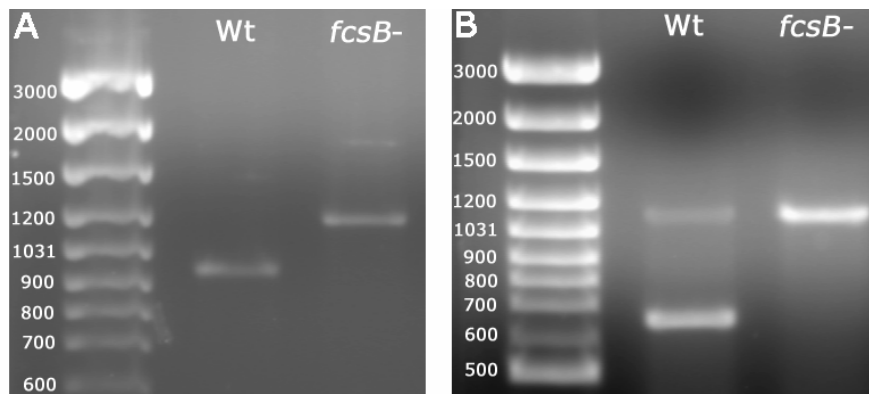


Abbildung 23: „Knock-Out“-Beweis. A) PCR an genomischer DNA des Wildtyps amplifiziert mit den Primern #84 und #81. Im *fcsB* „Knock-Out“-Stamm amplifiziert mit den Primern #84, #81 und #57. Durch das Einbringen der Blasticidin-Resistenz-Kassette wurde die Bindestelle für den Primer #81 im „Knock-Out“-Konstrukt eliminiert. Daher fehlt im *fcsB*<sup>-</sup> Stamm die Bande bei 910 bp. Stattdessen ergibt sich mit der Primerkombination #84, der 5' des eingebrachten „Knock-Out“-Konstruktes bindet und dem Primer #57, der in der Blasticidin-Resistenz-Kassette bindet, ein Fragment von 1162 bp. B) RT-PCR: An einer Gesamtzell-RNA-Isolation wurde die RT Reaktion mit den Primern #81 und #160 (Kontrolle LSD1) und anschließend eine PCR mit den Primern #182 und #81 bzw. #159 und #160 (Kontrolle LSD1) durchgeführt. Die Länge der LC-FACS2 mRNA, die mit dieser Primerkombination amplifiziert wird, beträgt 617 bp. Diese Bande fehlt im *fcsB*<sup>-</sup> Stamm. Als Kontrolle dient das 1084 bp großes Fragment, das die Primer #159 und #160 erzeugen.

Abbildung 23 zeigt, dass es sich bei dem ausgewählten Stamm um einen LC-FACS2 defizienten Stamm handelt. In Abbildung 23A fehlt das Signal des endogenen *fcsB* Gens. Es wurde durch eine Bande ersetzt, die mit einem Primer erzielt wurde, der in der Blasticidin-Resistenz-Kassette bindet. Abbildung 23B zeigt dann das Resultat auf der Ebene der mRNA. Die Bande auf der Höhe von 617 bp kann im Wildtyp detektiert werden; im „Knock-Out“ hingegen nicht.

#### LC-FACS2 überexprimierende Mutanten

Die Zellen hierfür wurden hergestellt, indem das Konstrukt #427 in Wildtyp-Zellen mittels Elektroporation eingebracht wurde. Konstrukt #427 codiert für die unmarkierte Version der LC-FACS2. Daher wird die Überexpression der mRNA durch eine RT-Reaktion bestätigt (Abb. 24).

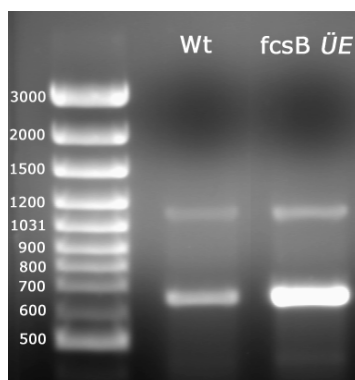


Abbildung 24: Beweis der Überexpression der *fcsB* mRNA. Primerkombination: #182+#81 für *fcsB*-Amplifikation (unten); #159+#160 (obere Bande; LSD1) als Kontrolle. Die Bande bei 617 bp ist in *fcsB* ÜE wesentlich stärker, obwohl vergleichbare Mengen RNA eingesetzt wurden (obere Kontrollbande).



„Rescue“ von *fcsB* Null Zellen

Um zu klären, ob der Phänotyp der *fcsB*<sup>-</sup>-Zellen tatsächlich durch das Fehlen des LC-FACS2 Proteins entsteht, wurden „Rescue“-Mutanten hergestellt werden, die das unmarkierte bzw. das myc-markierte Protein exprimieren (mittels der Konstrukte # 368 bzw. # 427). Die Mutanten wurden in einer Ko-Transformation zur selben Zeit in Wildtyp-Dictyostelium-Zellen eingebracht.

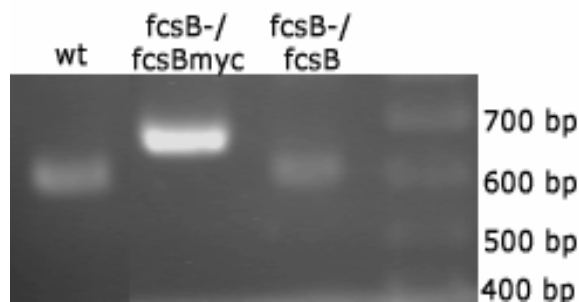


Abbildung 25: Die Rescue-Mutanten exprimieren wieder LC-FACS2 mRNA; Nach einer RT-Reaktion mit dem Primer #81, kann mit den Primern # 182 und #81 in „Rescue“-Zellen, die das myc-markierte Konstrukt bzw. das unmarkierte Konstrukt exprimieren, ein PCR-Produkt der entsprechenden Größe detektiert werden. In *fcsB*<sup>-</sup>/*fcsB*-Zellen kann die Größe des endogenen Produktes nachgewiesen werden. In *fcsB*<sup>-</sup>/*fcsBmyc*-Zellen ist das Produkt klonierungsbedingt um 66 bp größer.

Die LC-FACS-Aktivität ist in *fcsB* Null Zellen reduziert

Um nun sicher zu stellen, ob in den LC-FACS2 Null Mutanten die Reduktion der LC-FACS2-Menge auch eine Reduktion der LC-FACS-Aktivität zur Folge hat, wurde ein Aktivitäts-Assay etabliert, mit dessen Hilfe es möglich war, die LC-FACS Aktivität in Peroxisomen zu bestimmen. Hierzu wurde eine Dichtegradienten-Zentrifugation durchgeführt. Als Kontrolle ist die Verteilung der LC-FACS1 im Gradienten ist in Abbildung 26A dargestellt. In der Peroxisomen-Fraktion kann keine LC-FACS1 detektiert werden. In dieser Fraktion wird die LC-FACS Aktivität bestimmt. Da auch in dieser Fraktion eine Restaktivität vorhanden ist, scheinen sich neben der LC-FACS2 auch andere LC-FACS-Proteine in dieser Fraktion zu befinden. In Abbildung 26B sind nun die Unterschiede in der Aktivität der Peroxisomen-Fraktion dargestellt. Die Werte für den Wildtyp wurden hierbei 100% gesetzt.

Vorläufige Experimente zeigen, dass die Aktivität der überexprimierenden Zellen und die der "Rescue"-Zellen bei ca. 150 % liegt.

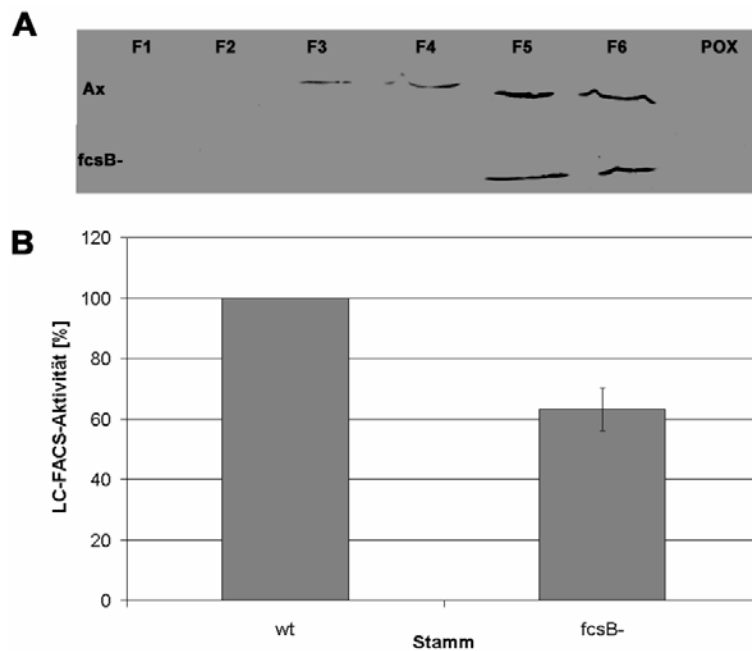


Abbildung 26: Die LC-FACS-Aktivität in Peroxisomen ist in *fcsB*<sup>-</sup>-Zellen reduziert; A) Die Menge an LC-FACS1 in der Fraktion F5 ist laut Western-Blot-Analyse in wt und den Mutanten gleich. B) LC-FACS-Aktivität in der Peroxisomen-Fraktion. Die Aktivität wurde auch in Fraktion F5 bestimmt. In dieser Fraktion befindet sich in etwa die gleiche Menge LC-FACS1. Die Aktivitätswerte für diese Fraktionen wurden als Referenzwert angenommen und die Aktivität der Peroxisomen-Fraktion (POX), die LC-FACS1 frei ist angepasst. Hierzu wurde eine Peroxisomen-Fraktion durch eine Dichtegradienten-Zentrifugation erzeugt, in der der Zellextrakt zuerst 2,5 h bei 180.000 x g zentrifugiert wurde. Das Pellet, das die Peroxisomen beinhaltet wird dann in 1 x TKM gewaschen und in 200 µl 1 x TKM resuspendiert. Von dieser Fraktion wurde der Proteingehalt bestimmt und 20 µg hiervon in die Aktivitäts-Bestimmung eingesetzt.

### 2.3.3 Die Fähigkeit zur Aufnahme und Reduktion extrazellulär angebotener Fettsäuren bleibt in *fcsB*<sup>-</sup>-Zellen erhalten

Der einzige Defekt, der für LC-FACS1 Null Zellen in *Dictyostelium* gemessen werden konnte, lag in einer verminderten Aufnahme extrazellulär angebotener Fettsäuren durch die Membran des Endosoms (99). Um auszuschließen, dass die LC-FACS2 am gleichen Vorgang beteiligt ist, wurde zunächst die Aufnahme des Fettsäureanalogons „C<sub>1</sub>-Bodipy-C<sub>12</sub>“ in LC-FACS2 „Knock-Out“-Zellen untersucht. Es konnte jedoch keine Veränderung bezüglich der Aufnahme dieser Fettsäuren gemessen werden (Abb. 27).

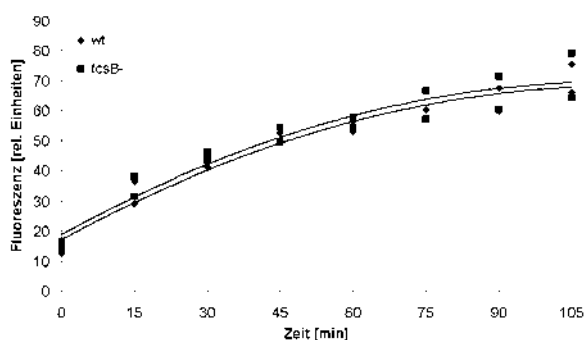


Abbildung 27: Die Aufnahme fluoreszenzmarkierter Fettsäuren aus dem Medium. Der Assay wurde analog einem Pinozytose-Assay durchgeführt. Anstatt TRITC-Dextran wurde dem Medium 20 µM C<sub>1</sub>-Bodipy-C<sub>12</sub> zugegeben und die Zunahme der intrazellulären Fluoreszenz fluorimetrisch vermessen.

Außerdem wurde untersucht, ob sich in  $fcsB^-$ -Zellen ein Unterschied in der Degradation von Fettsäuren zeigt. Um dies zu klären, wurde ein „Bodipy-Transit“ durchgeführt. Im Aufbau ähnelt er der Messung des endozytotischen Transits (vgl. 6.3.4). Der Rückgang der Fluoreszenz in diesem Assay geschieht langsam. Nach ca. 2 Stunden sind erst ca. 25 % der Fluoreszenz abgebaut.

Die Reduktion der Menge an fluoreszenz-markierter Fettsäure in den Zellen ist jedoch im Wildtyp und den  $fcsB^-$ -Zellen gleich (Abb. 28).

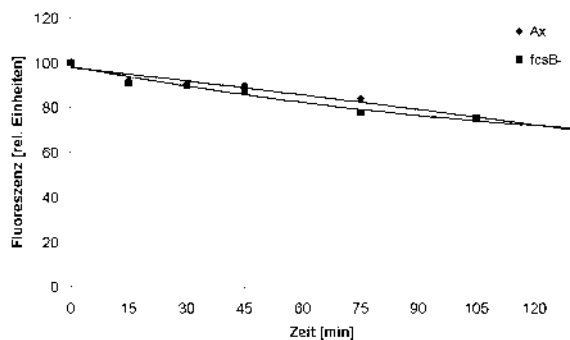


Abbildung 28: Der Abbau von C<sub>1</sub>-Bodipy-C<sub>12</sub> unterscheidet sich im „Knock-Out“ Stamm der LC-FACS2 nicht vom Wildtyp. 10 ml einer Kultur von  $5 \times 10^6$  Zellen/ml wurde 20  $\mu$ M fluoreszenz-markierte Fettsäure zugesetzt. Nach einem 15 minütigem Puls und anschließenden Waschschrinen wurde dann im Abstand von 15 Minuten eine Probe entnommen und fluorimetrisch vermessen.

#### 2.3.4 Der Weg einer Fluoreszenz-markierten Fettsäure in Dictyostelium

Mit der fluoreszenz-markierten Fettsäure C<sub>1</sub>-Bodipy-C<sub>12</sub> steht uns eine Substanz zur Verfügung, mit der man die Vorgänge im Fettsäurestoffwechsel von Dictyostelium sogar in lebenden Zellen beobachten kann.

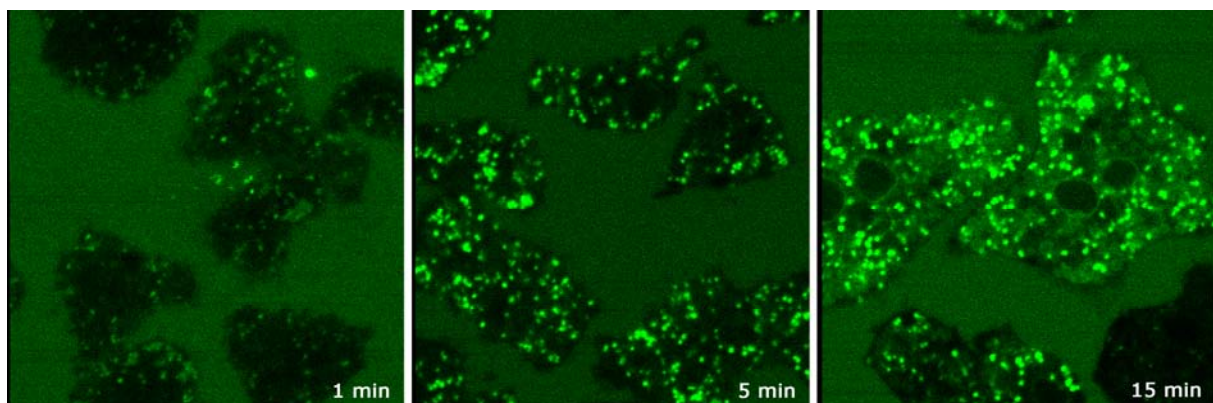


Abbildung 29: Zeitlicher Ablauf der Inkubation mit C<sub>1</sub>-Bodipy-C<sub>12</sub>. Dargestellt sind konfokale Aufnahmen lebender Zellen, die mit einer 20  $\mu$ M C<sub>1</sub>-Bodipy-C<sub>12</sub>-Lösung inkubiert wurden. Die Zeitangaben beziehen sich auf die Dauer der Inkubation. Die Bildbreite beträgt jeweils 35  $\mu$ m

Die Untersuchungen der LC-FACS1 zeigten, dass das Fettsäureanalogon C<sub>1</sub>-Bodipy-C<sub>12</sub> an der Endosomen-Membran aktiviert wird und in die Zelle aufgenommen wird. Der weitere Weg, den dieses Fettsäureanalogon anschließend in der Zelle nimmt, konnte bisher noch

nicht geklärt werden. Um zu prüfen, ob  $C_1$ -Bodipy- $C_{12}$  ein Substrat der LC-FACS2 sein kann, soll zunächst dieser Weg analysiert werden.

Werden axenisch gewachsene Zellen mit  $C_1$ -Bodipy- $C_{12}$  inkubiert können bereits nach einer Minute schwache Punkte in der Zelle beobachtet werden. Diese Punkte werden nach fünf Minuten Inkubation intensiver. Nach ca. 15 Minuten kann erstmals auch ein membranöses Netzwerk beobachtet werden. Aufgrund der Struktur und der großen Aussparung im Inneren dieser Strukturen, handelt es sich hierbei vermutlich um das Endoplasmatische Retikulum (ER) (Abb. 29). Da Fettsäuren in Form von Triglyceriden in Lipidtropfen gespeichert sind, könnte es sich bei den Punkten um solche Speicherorganelle handeln. Um dies zu testen verwendet man in der Literatur einen lipophilen Farbstoff (Nile Red) (55). Abbildung 30A zeigt Wildtyp-Zellen, die 20 Minuten mit  $20 \mu\text{M}$  Bodipy inkubiert wurden. In rot erkennt man die Lipidtropfen, die mit Nile Red angefärbt sind. Im "Overlay" erscheinen fast alle Punkte gelb. D.h. die Ko-Lokalisation von  $C_1$ -Bodipy- $C_{12}$  ist nahezu vollständig.

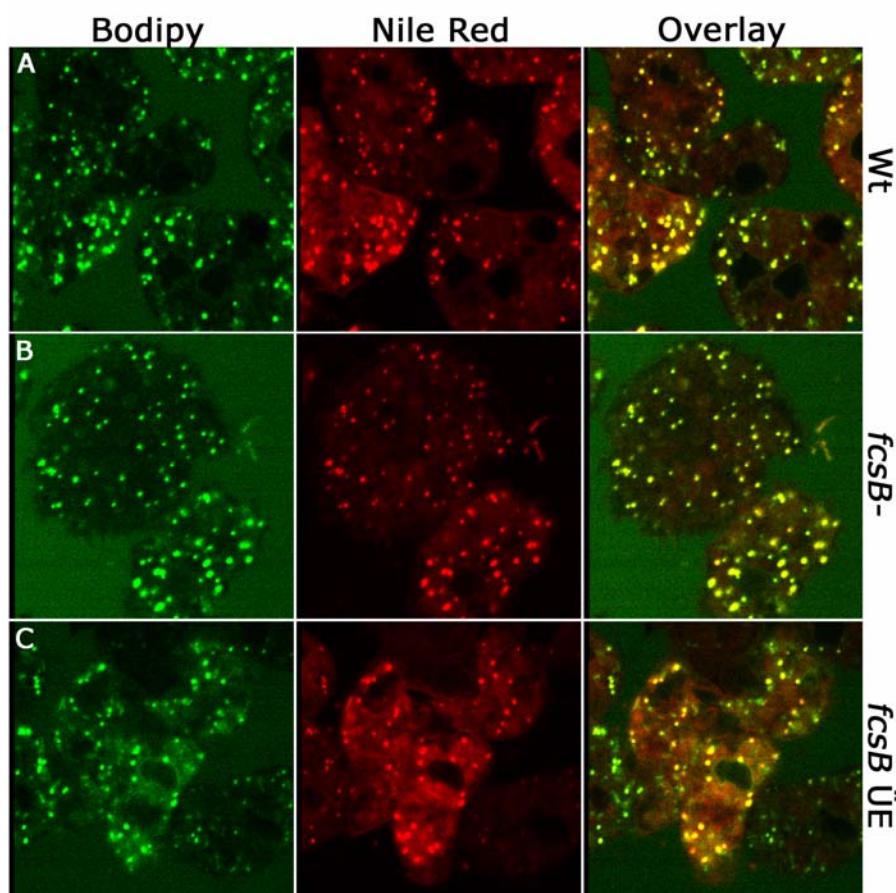


Abbildung 30: Inkubation der verschiedenen Zelltypen (rechter Rand) mit zwei Farbstoffen mit  $C_1$ -Bodipy- $C_{12}$  bzw. Nile Red (oben). Im "Overlay" wurden beide Bilder übereinander gelegt. Die konfokalen Bilder wurden ca. 20 min nach Beginn der Inkubation mit  $20 \mu\text{M}$  Bodipy und  $20 \mu\text{M}$  Nile Red aufgenommen. Zur Intensivierung von Lipidtropfen, wurden die Zellen in palmitinsäure-haltigem Medium kultiviert. Die Bildbreite beträgt jeweils  $25 \mu\text{m}$

### 2.3.5 Die LC-FACS2 in Dictyostelium aktiviert Fettsäuren, deren Ziel oder Herkunft Lipidtropfen sind

Vergleicht man die Färbung mit  $C_1$ -Bodipy- $C_{12}$  und Nile Red im „Knock-Out“ Stamm mit dem Wildtyp, kann ein Unterschied zwischen den Stämmen detektiert werden. Es scheint, dass die Lipidtropfen kleiner und weniger intensiv gefärbt sind (Abb. 30B). Im Gegensatz dazu zeigen die LC-FACS2 überexprimierenden Zellen eine intensivere Färbung und die Lipidtropfen erscheinen etwas größer (Abb. 30C). Um eine größere Menge an Daten zu erhalten, wurde die Intensität der Lipidtropfen in den Zellen mit einer Software von Leica (LCSLite), dem Herstellers des konfokalen Mikroskops, quantifiziert.

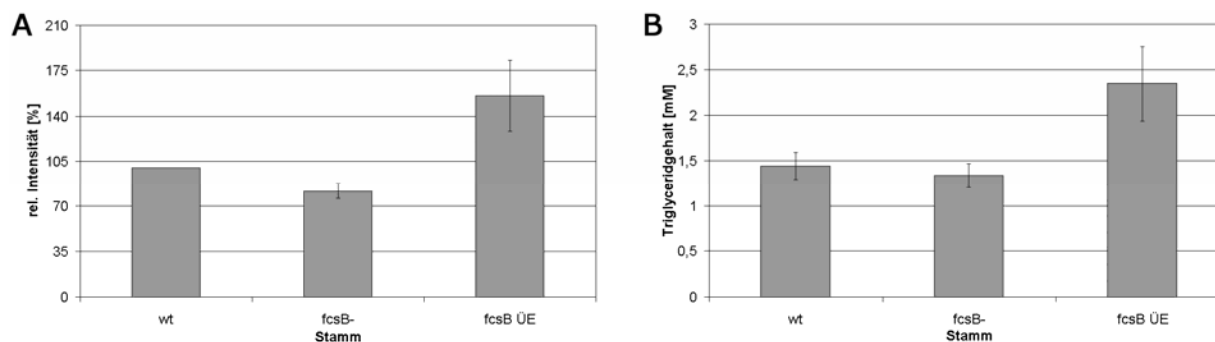


Abbildung 31: Die Intensität der Lipidtropfen korreliert mit der Menge an Neutral-Lipiden; A) Quantifizierung der konfokalen Bilder mit der LCSLite Software. Die Zellen hierfür wurden ü.N. in palmitinsäure-haltigem Medium kultiviert. Die Fluoreszenz-Intensität mehrerer Zellen pro konfokalem Bild wurde hierfür gemittelt. Die Standardabweichung ergibt sich aus drei unabhängigen Experimenten; B) Messung des Neutral-Lipid-Gehaltes im Assay der Firma Lehmann. Die Werte wurden durch einen Vergleich mit einer Standard-Lösung erhalten. Die Zellen wurden ü.N. in bakterieller Suspension kultiviert. *fcsB*<sup>-</sup>-Zellen zeigen eine Reduktion um ca. 10 %. *fcsB* ÜE Zellen hingegen eine Erhöhung des Triglycerid-Gehaltes um ca. 60 %.

Abbildung 31A zeigt die so erhaltenen Daten in einem Diagramm. Die Quantifizierung bestätigt die Beobachtung beim Betrachten der Bilder. Dasselbe Ergebnis liefert die Verifizierung der Daten auf biochemischem Weg mit einem Assay der Firma Lehmann. Dieser Assay kann die Menge an neutralen Lipiden, zu denen auch die Triglyceride gehören, quantifizieren. In diesen, bakteriell kultivierten Zellen findet man etwas weniger Neutral-Lipide im *fcsB*<sup>-</sup>-Stamm. Die Zellen, die die LC-FACS2 überexprimieren zeigen hingegen eine mehr als 50%ige Erhöhung des Neutral-Lipid-Gehaltes (Abb. 31B). Axenisch gewachsene Zellen hingegen zeigen alle ähnliche Mengen an Neutral-Lipiden (nicht gezeigt). Generell liegt der Neutral-Lipid-Gehalt des bakteriell kultivierten Wildtyps etwa zweifach über dem axenisch kultivierter Wildtyp-Zellen.

Auch in einer Lipid-Analyse mit anschließender Dünnschichtchromatographie konnte die Befunde bestätigt werden (Abb. 32). In Abbildung 32A sind die Unterschiede bakteriell gewachsener Zellen dargestellt. In *fcsB*<sup>-</sup>-Zellen sind weniger Triglyceride als im Wildtyp vorhanden. In den überexprimierenden Zellen werden etwas mehr Triglyceride detektiert. In Abbildung 32B sind Gesamtzell-Lipid-Isolate axenisch kultivierter Zellen aufgetragen.

Gibt man Palmitinsäure (PS) zu der Kultur, werden in den Zellen extrem viele Triglyceride eingelagert. Die schon bekannten Unterschiede zwischen den Stämmen sind auch hier erkennbar, jedoch nicht so deutlich, wie die vorangegangenen Methoden dies zeigten. Die Menge an Triglyceriden in Zellen, die ohne Palmitinsäure kultiviert wurden, unterscheidet sich hingegen nicht. Leider kann anhand der Dünnschichtchromatographie keine Aussage über die übrigen neutralen Lipide wie Diacylglycerol und Monoacylglycerol getroffen werden.

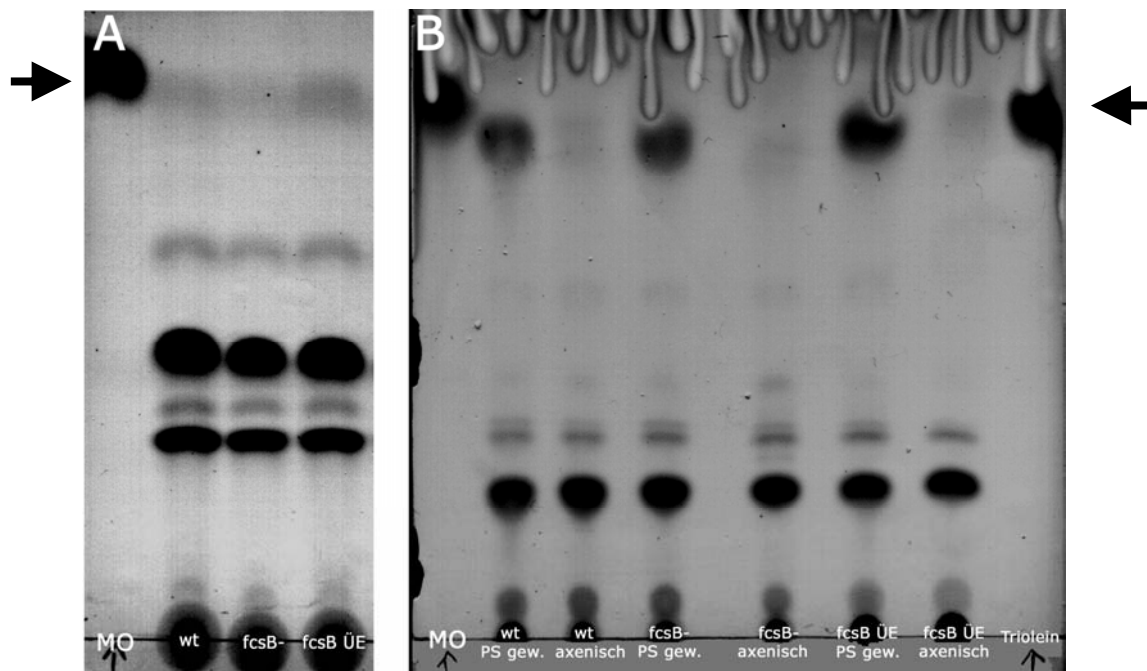


Abbildung 32: Lipid-Isolation unterschiedlich kultivierter Zellen; A) TLC bakteriell gewachsene Zellen; B) TLC axenisch gewachsener Zellen, denen z.T. Palmitinsäure (PS gew.) zugegeben wurde; MO: Methyloleat als Marker für Fettsäuren; Triolein als Marker für Triglyceride, die Pfeile markieren die Banden, bei denen es sich um Triglyceride handelt.

### 2.3.6 *fcsB*<sup>-</sup>-Zellen zeigen eine verringerte Phagozytoserate, jedoch keinen Wachstumsdefekt in bakterieller Suspension

Die Frage, die sich nun stellt ist, welche Folgen die Verringerung der Neutral-Lipid-Menge im „Knock-Out“ für die Zellen hat.

Neutrale Lipide werden in Lipidtropfen gespeichert. Sie bilden sich aus einem Überschuss an Nahrung. Eine Reduktion der Neutral-Lipide in Lipidtropfen könnte aus einem Defizit bei der Nahrungsaufnahme resultieren und dadurch ein reduziertes Wachstum hervorrufen. Daher wurde zunächst das Wachstum der Stämme verglichen. In axenischem Medium, in dem kaum Fettsäuren enthalten sind, kann kein Unterschied verzeichnet werden. Setzt man diesem Medium Palmitinsäure als Fettsäurequelle zu, wird für den „Knock-Out“ der LC-FACS2 ein langsames und für den überexprimierenden Stamm ein schnelleres Wachstum gegenüber dem Wildtyp detektiert. Allerdings verlangsamt sich schon die Verdopplungszeit im Wildtyp in Gegenwart von Palmitinsäure

um ca. 4 Stunden. Da hier bereits das Wachstums des Wildtyps in aus ungeklärter Ursache gestört wird, wird eine Interpretation dieser Daten schwierig. Das Wachstum in bakterieller Suspension ist in allen drei Stämmen unverändert (Tabelle 2). Es besteht also kein Zusammenhang zwischen der Menge an neutralen Lipiden und der Wachstumsrate.

Dictyostelium-Zellen wachsen im Waldboden auf Bakterien. Um diesen Zustand zu imitieren, werden Dictyostelium-Zellen auf einem Rasen aus *Klebsiella aerogenes* kultiviert. Die Amöben fressen Löcher (Plaques) in den Bakterien-Rasen und bilden an bakterienarmen Stellen Fruchtkörper aus. Unter diesen Bedingungen sind die Plaques, die der „Knock-Out“-Stamm im Bakterienrasen hervorruft, kleiner, als die des Wildtyps und des Überexprimierers (Abb.33). Für den „Knock-Out“-Stamm kann somit ein Defekt beobachtet werden, der mit der Reduktion neutraler Lipide einhergeht.

Medium	wt	fcsB <sup>-</sup>	fcsB ÜE
Axenisch	11,2	11,2	11,4
Palmitinsäure-haltig	15,5	12,7	16,1
<i>Klebsiella aerogenes</i>	3,8	3,6	3,4

Tabelle 2: Verdopplungszeiten unterschiedlicher Wachstumsbedingungen; „Knock-Out“ Zellen zeigen ein schnelleres Wachstum, wenn sie in Anwesenheit von Palmitinsäure kultiviert werden. Dies gilt nicht, wenn sie axenisch oder bakteriell wachsen. Der LC-FACS2 überexprimierende Stamm verhält sich unter allen Bedingungen wildtypisch. Die Verdopplungszeiten stellen Mittelwerte verschiedener Wachstumskurven dar.

Neben der Fähigkeit sich zu Teilen, müssen die Zellen, die auf einem Bakterienrasen wachsen die Bakterien auch phagozytieren können. Um zu prüfen, ob der Wachstumsunterschied der fcsB Null-Zellen durch eine Reduktion der Phagozytoserate hervorgerufen wird, wurden Phagozytose-Assays durchgeführt.

Tatsächlich zeigt nicht nur der fcsB „Knock-Out“-Stamm eine reduzierte Phagozytoserate; der überexprimierende Stamm zeigt sogar eine Erhöhung der Phagozytoserate (Abbildung 34A). Die Reduktion der Menge an neutralen Lipiden korreliert somit zu einer Reduktion der Phagozytoserate. Der Anstieg der Menge an neutralen Lipiden im überexprimierenden Stamm hätte demzufolge auch die Erhöhung der Phagozytoserate zur Folge.

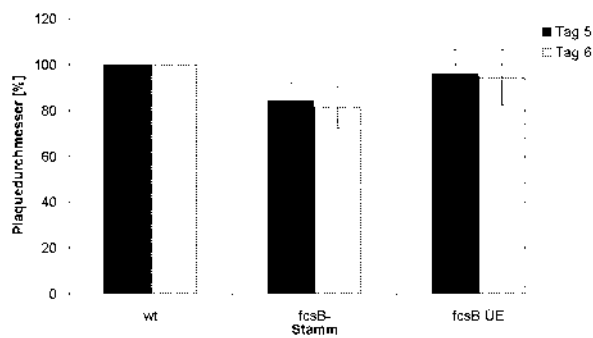


Abbildung 33: Der Plaquesdurchmesser von fcsB<sup>-</sup>-Zellen ist im Vergleich zu Wildtyp und Überexprimierter leicht reduziert; die fünf bzw. sechs Tage nach Ausplattieren der Zellen wurde der Durchmesser von 6 verschiedenen Kolonien bestimmt. Die Werte stellen Mittelwerte aus 5 unabhängigen Experimenten dar. Als Referenz wurde der Wert für den Wildtyp 100% gesetzt.

Wenn die Menge an neutralen Lipiden mit der Menge an Nährstoffen, die die Zelle aufnimmt, korreliert, sollte man die Phagozytoserate durch die Kultivierungsbedingungen manipulieren können. Um dies zu prüfen, wurden zunächst Phagozytose-Assays mit dem Wildtyp durchgeführt.

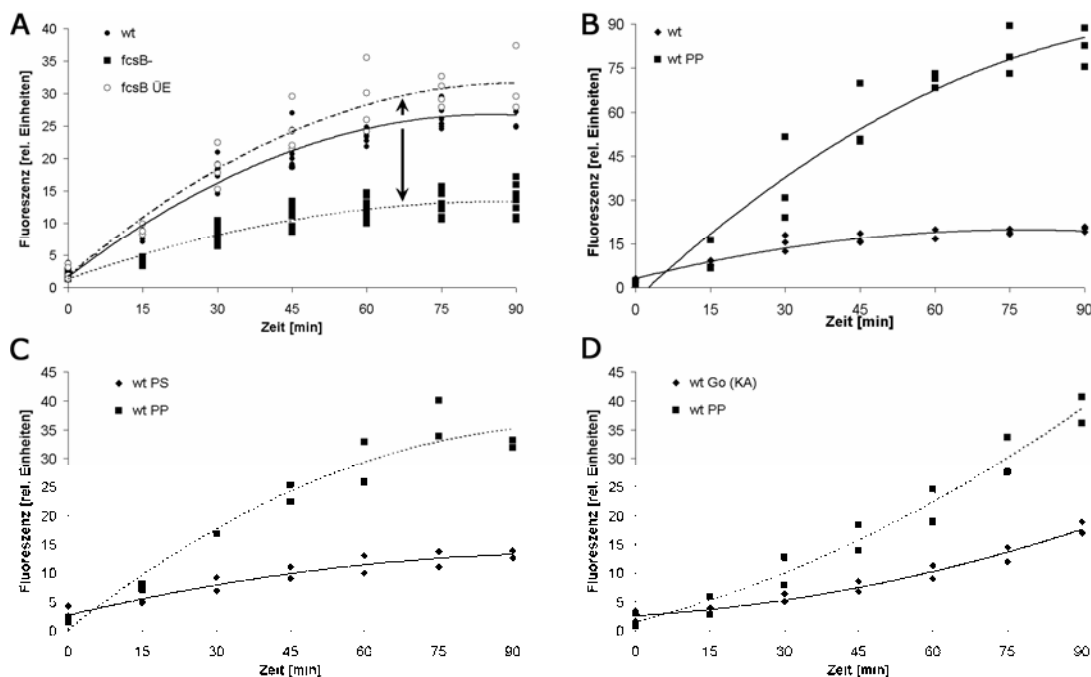


Abbildung 34: Die Phagozytoserate ist abhängig von der Nährstoffversorgung der Zellen. A) fcsB<sup>-</sup>-Zellen zeigen eine um 50 % erniedrigte und fcsB UE Zellen eine um 20 % höhere Phagozytoserate. B) Stehen den Zellen keine Nährstoffe zur Verfügung (PP) steigt die Phagozytoserate um fast das dreifache im Vergleich zu axenisch wachsenden Zellen. C) Setzt man dem Medium eine Fettsäure (Palmitinsäure) zu und misst dann die Phagozytoserate von Zellen in palmitinsäure-haltigem Medium im Vergleich zu Zellen in Phosphatpuffer, steigt die Phagozytoserate nur um ca. 110%. D) Zellen, die in bakterieller Suspension kultiviert wurden, zeigen nur noch eine Erhöhung der Phagozytoserate um ca. 90%, wenn die Zellen in Phosphatpuffer überführt wurden.

Hier konnte in der Tat eine Abhängigkeit der Phagozytose von den Kultivierungsbedingungen gezeigt werden. Wenn man axenisch kultivierte Zellen in Phosphatpuffer überführt, steigt die Phagozytoserate auf beinahe das Dreifache an. Die Zellen versuchen also weniger Nährstoffe über die Menge an aufgenommenen Substanzen auszugleichen



(Abb. 34B und Tabelle 3). Der Anstieg der Phagozytoserate in Phosphatpuffer fällt allerdings umso geringer aus, je „nährstoffreicher“ das Medium war, indem sie kultiviert wurden bevor der Assay gestartet wurde. Abbildung 34C zeigt das Phagozytose-Verhalten von Zellen, die in palmitinsäure-haltigem Medium kultiviert wurde. Hier findet man nur noch eine Steigerung auf ca. das Doppelte. Die Steigung fällt noch etwas geringer aus (90% Erhöhung), wenn die Zellen aus einer Bakterienkultur verwendet wurden (Abb. 34D und Tabelle 3). Dies bedeutet, dass die Zellen den Nährstoffmangel umso weniger detektieren, je nährstoffreicher das Medium war, indem sie herangewachsen sind.

In Bezug auf die Korrelation zwischen der Menge an neutralen Lipiden und der Phagozytoserate bedeutet dies jedoch, dass die Phagozytoserate mit sinkendem Nährstoffgehalt steigt.

Überträgt man den Befund nun auf die *fcsB*-Mutanten, beruht die erhöhte Phagozytoserate der überexprimierenden Zellen auf einem Mangel an Nährstoffen. Die Reduktion der Phagozytoserate in den „Knock-Out“-Zellen hätte somit die Ursache in einer besseren Versorgung mit Nährstoffen.

Medium	Wt	Wt PP	<i>fcsB</i> <sup>-</sup>	<i>fcsB</i> <sup>-</sup> PP	<i>fcsB</i> ÜE	<i>fcsB</i> ÜE PP
axenisch	100 %	270 %	50 %	130 %	120 %	250 %
palmitinsäure-haltig (200 µM)	100 %	210 %	60 %	140 %	110 %	190 %
<i>Klebsiella aerogenes</i>	100 %	190 %	70 %	150 %	90 %	170 %
Änderung der Phagozytoserate (von ax. nach bakt.)		↓	↑	↑	↓	↓

Tabelle 3: Phagozytoserate nach unterschiedlichen Wachstumsbedingungen und die Zunahme unter Einfluss von Phosphatpuffer (PP)  $2 \times 10^7$  Zellen wurden geerntet und in 10 ml des entsprechenden Mediums oder Phosphatpuffer aufgenommen und die Phagozytoserate bestimmt. Bakteriell gewachsene Zellen wurden über ein 20 %iges PEG-Kissen abzentrifugiert, um die Bakterien zu entfernen. Es wurden die Werte zwischen 15 und 60 min nach Zugabe der fluoreszierenden Hefen in die Berechnung einbezogen.

Um dies zu prüfen, wurden auch die *fcsB*-Mutanten in unterschiedlich nährstoffreichen Medien kultiviert und die Phagozytoserate bestimmt. Tabelle 3 zeigt, dass die verminderte Aufnahme von Partikeln tatsächlich abhängig von der vorherigen Kultivierung der Zellen ist. Jedoch gilt für den Wildtyp und auch für den *fcsB* Überexprimierer, dass die Phagozytoserate sinkt, wenn das Nährstoffangebot besser ist. Dies gilt sowohl für die Messung in Phosphatpuffer, als auch für die Messung in Medium. Der „Knock-Out“-Stamm hingegen verhält sich entgegengesetzt. In beiden Fällen steigt die Phagozytoserate, wenn das Nährstoffangebot verbessert wird. In Bezug auf die

Phagozytoserate bakteriell gewachsener Zellen bedeutet dies, dass die Zellen im Schnitt nur 30 % weniger phagozytieren als der Wildtyp.

Somit kann durch eine externe Zugabe von Fettsäuren bzw. Bakterien der Phagozytose-Defekt in *fcsB* Null Zellen gerettet werden.

### 2.3.7 Änderungen in der Menge der Neutral-Lipide haben auch in LC-FACS2 Mutanten Einfluss auf die Vorgänge am späten Endosom

Wie bereits von *fcsA*<sup>-</sup>/*vacB*<sup>-</sup>-Doppelmutanten bekannt ist, korreliert eine verminderte Einlagerung an Triglyceriden mit einem schnelleren endozytotischen Transit und einem reduzierten endosomalen pH-Wert. Da *fcsB*<sup>-</sup>-Zellen auch eine verringerte Einlagerung von Neutral-Lipiden zeigen, soll nun geprüft werden, ob auch hier ein Einfluss auf den endozytotischen Transit bzw. den endosomalen pH-Wert die Folge ist. Abbildung 35A zeigt, dass eine minimale Verzögerung gemessen werden kann. Der pH-Wert der Doppelmutanten und *vacB*<sup>-</sup>-Zellen liegt unterhalb des Wildtyp-pH-Wertes; in *fcsB*<sup>-</sup>-Zellen liegt der pH-Wert über dem des Wildtyps (Abb. 35B).

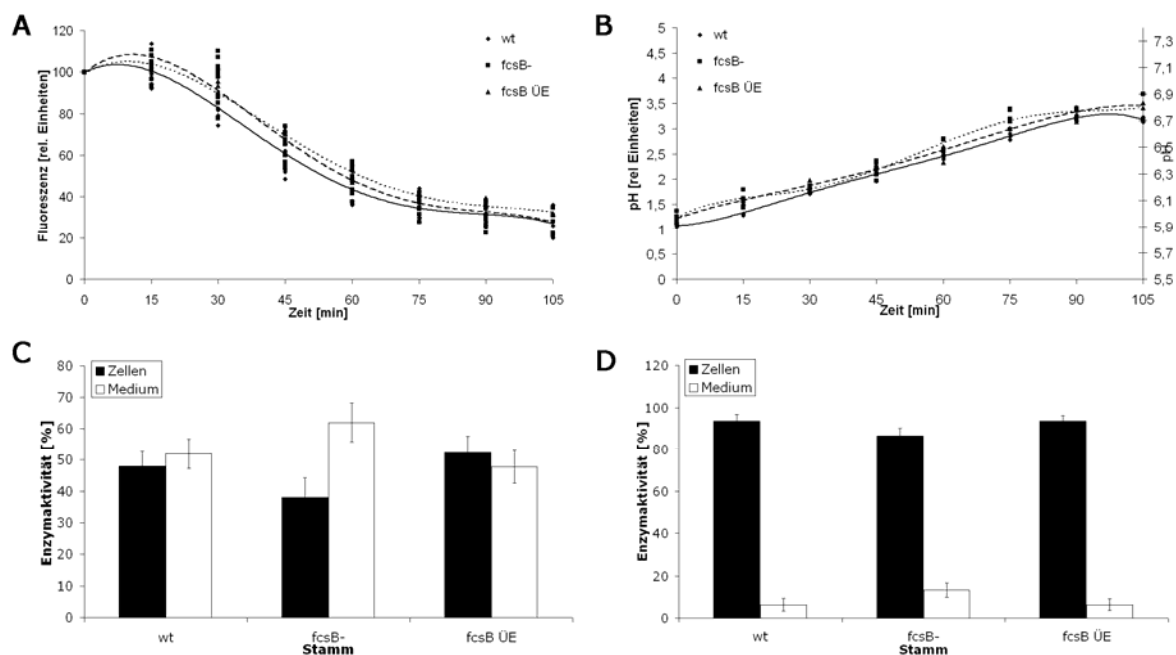


Abbildung 35: Sekretionsverhalten von *fcsB*<sup>-</sup>-Zellen; A) Der Endozytotische Transit ist minimal verzögert. Auch die pH-Wert-Änderung beträgt nur 0,1 pH-Einheit (B). Die Sekretion der  $\alpha$ -Mannosidase (C) bzw. der sauren Phosphatase (D) ist in *fcsB*<sup>-</sup>-Zellen erhöht und in *fcsB* überexpressierenden Zellen wildtypisch.

Wenn es einen Zusammenhang zwischen pH-Wert und lysosomaler Sekretion gibt, sollte in *fcsB*<sup>-</sup>-Zellen die Sekretion steigen. Und tatsächlich haben *fcsB*<sup>-</sup>-Zellen eine vermehrte

Sekretion lysosomaler Enzyme (Abb. 35 C+D). Dies gilt sowohl für die  $\alpha$ -Mannosidase, als auch für die saure Phosphatase.

In  $fcsA^-/vacB^-$  und  $vacB^-$ -Zellen korreliert eine verminderte Sekretion lysosomaler Enzyme mit einem vergrößerten späten Endosomen. Im umgekehrten Fall, könnte eine erhöhte Sekretion dieser Enzyme mit verkleinerten späten Endosomen korrelieren. Um dies zu prüfen, wurden Immunfluoreszenz-Bilder mit Vacuolin-spezifischem Antikörper erstellt.

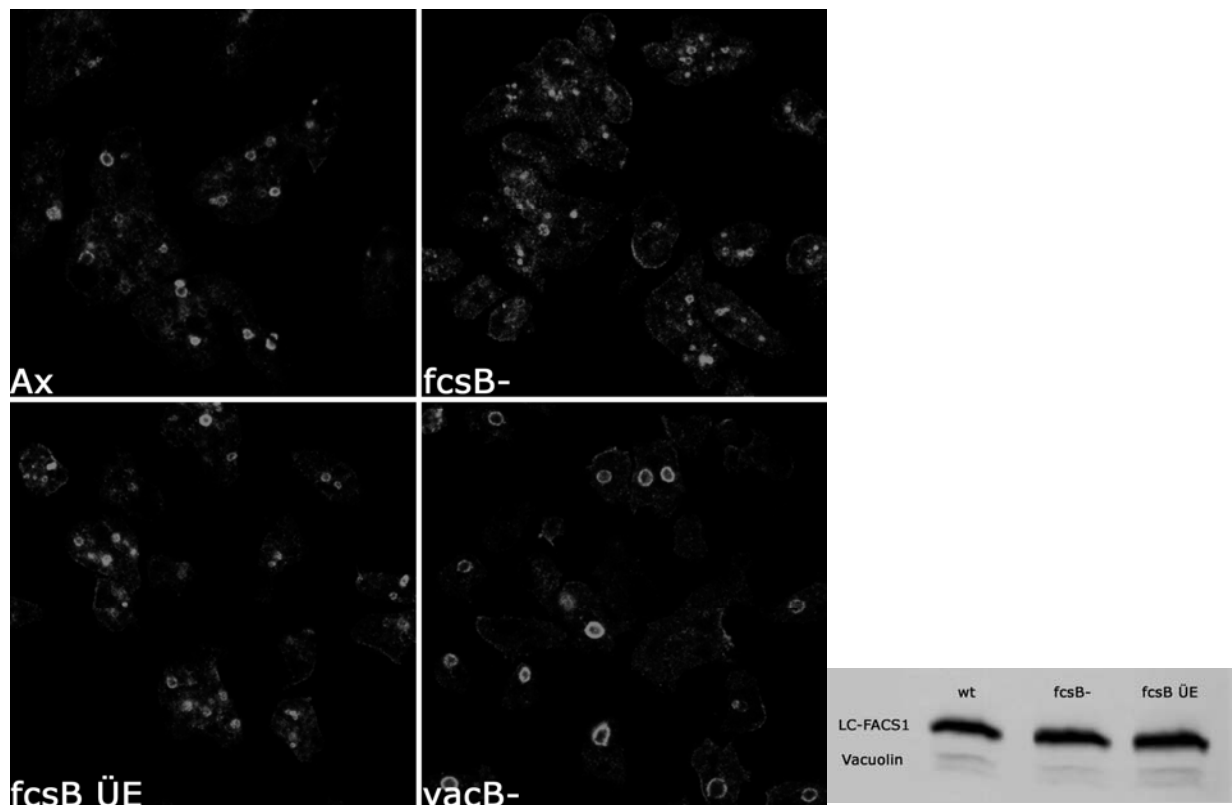


Abbildung 36: Färbung von späten Endosomen mit dem Antikörper 263-79-2 gegen Vacuolin;  $vacB^-$ -Zellen zeigen die typische Verteilung von späten Endosomen;  $fcsB$  überexprimierende Zellen zeigen eine wildtypische Färbung.  $fcsB^-$ -Zellen hingegen zeigen fragmentierte, relativ kleine späte Endosomen. Kleiner Ausschnitt: Western Blot mit  $\alpha$ -Vacuolin (263-79-2) und  $\alpha$ -LC-FACS1 (221-457-5);  $fcsB^-$ -Zellen zeigen keine schwächere Färbung der Vacuolin-Banden. Die Bildbreite beträgt 60  $\mu$ m (Ax). Die übrigen Bilder weisen eine Breite von 65  $\mu$ m auf.

Als Kontrolle dienen  $vacB^-$ -Zellen. Hier findet man nur ein paar wenige, jedoch stark vergrößerte späte Endosomen (Abb. 36  $vacB^-$ ). Im LC-FACS2 Überexprimierer (Abb. 36  $fcsB$  ÜE), findet man immer mehrere späte Endosomen, die in Form und Zahl mit dem Wildtyp vergleichbar sind (Abb. 36 Ax). LC-FACS2 „Knock-Out“ Zellen hingegen zeigen eine Morphologie, die sich von den anderen Stämmen unterscheidet. Die späten Endosomen scheinen fragmentiert aber zahlreich zu sein (Abb. 36  $fcsB^-$ ). Die Menge an Vacuolin in den Zellen ist jedoch immer gleich (Abb. 36 kleines Bild).

LC-FACS1/Vacuolin Doppelmutanten zeigen eine Reduktion in der Speicherung von Triglyceriden, weisen ein vergrößertes spätes Endosom auf und halten lysosomale Enzyme im Zellinneren zurück. *fcsB*<sup>-</sup>-Zellen hingegen zeigen auch eine Reduktion in der Speicherung von Neutral-Lipiden, weisen viele, kleine späte Endosomen auf und sezernieren mehr lysosomale Enzyme als der Wildtyp.

In beiden Fällen korreliert der Status der Neutral-Lipide mit Veränderungen am späten Endosom.

### 2.3.8 GFP-LSD1 aus Dictyostelium lokalisiert auf Lipidtropfen

Da die Reduktion der Menge neutraler Lipide in *fcsB*<sup>-</sup>-Zellen recht schwach ist, könnte der existierende Phänotyp verstärkt werden, indem man die Menge an Neutral-Lipiden weiter manipuliert. LSD1 ist das Dictyostelium-Homolog von Perilipin, ein Protein, von dem man aus Säuger-Zellen weiß, dass die Überexpression zu einem Anstieg der Neutral-Lipid-Menge führt (7). Um dies zu testen, wurde in die existierende *fcsB* „Knock-Out“-Mutante zusätzlich GFP-LSD1 eingebracht. Außerdem wurde das GFP-LSD1-Konstrukt (#438) allein und auch in einer Ko-Transformation gemeinsam mit einem LC-FACS2-Konstrukt (#427) in Wildtypzellen eingebracht.

In Abbildung 37A ist eine RT-PCR dargestellt, die dokumentiert, dass in den „Knock-Out“-Zellen keine *fcsB* mRNA mehr gebildet wird, wohingegen in den überexprimierenden Zellen tatsächlich mehr *fcsB* mRNA existiert. In Abbildung 37B ist die GFP-LSD1-Expression mittels Antikörperfärbung nachgewiesen.

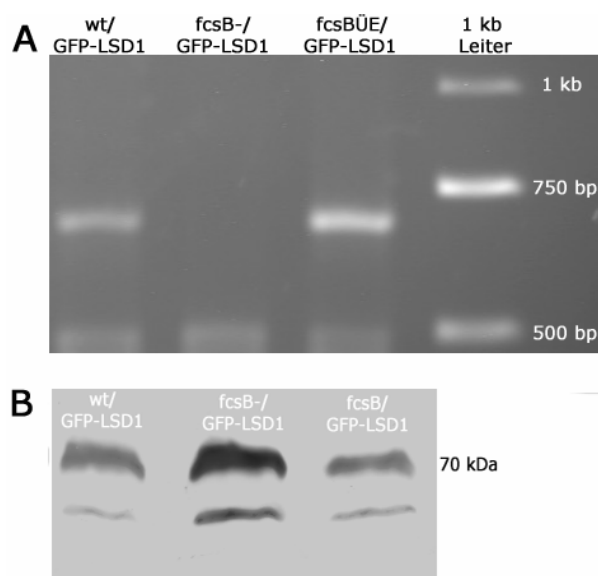


Abbildung 37: Nachweis der Mutanten; A) RT-PCR mit den Primern #182 und #81 von wt, „Knock-Out“ und ÜE, die GFP-LSD1 exprimieren; als Mengen-Kontrolle dienen die Primer #101 und #102; B) Western Blot mit dem Antikörper gegen GFP (264-449-2) zum Nachweis von GFP-LSD1. Die untere Bande scheint durch Degradation des Proteins entstanden zu sein.

LSD1 aus Dictyostelium wurde erst in einer Arbeit beschrieben (56). Miura und Ko-Autoren zeigten, dass LSD1 aus Dictyostelium in "Chinese Hamster Ovary" (CHO) Zellen auf Lipidtropfen lokalisiert. Abbildung 38A erweitert diese Aussage und zeigt, dass die Lokalisation auch für Dictyostelium gilt. In den Zellen, die GFP-LSD1 exprimieren, können Cluster von Lipidtropfen beobachtet werden. Die Hülle ist mit GFP-LSD1 dekoriert und das lipophile Lumen mit Nile Red gefärbt.

In *fcsB* „Knock-Out“ bzw. überexprimierende Zellen findet man die gleiche GFP-LSD1-Lokalisation wie im Wildtyp (Abb. 38 B u.C). Aufgrund der Aggregation lässt sich die Intensität der Lipidtropfen jedoch nur schlecht am Bild bestimmen. Daher wurde der Neutral-Lipid-Gehalt dieser Mutanten nur mit Hilfe des quantitativen Neutral-Lipid-Assays bestimmt.

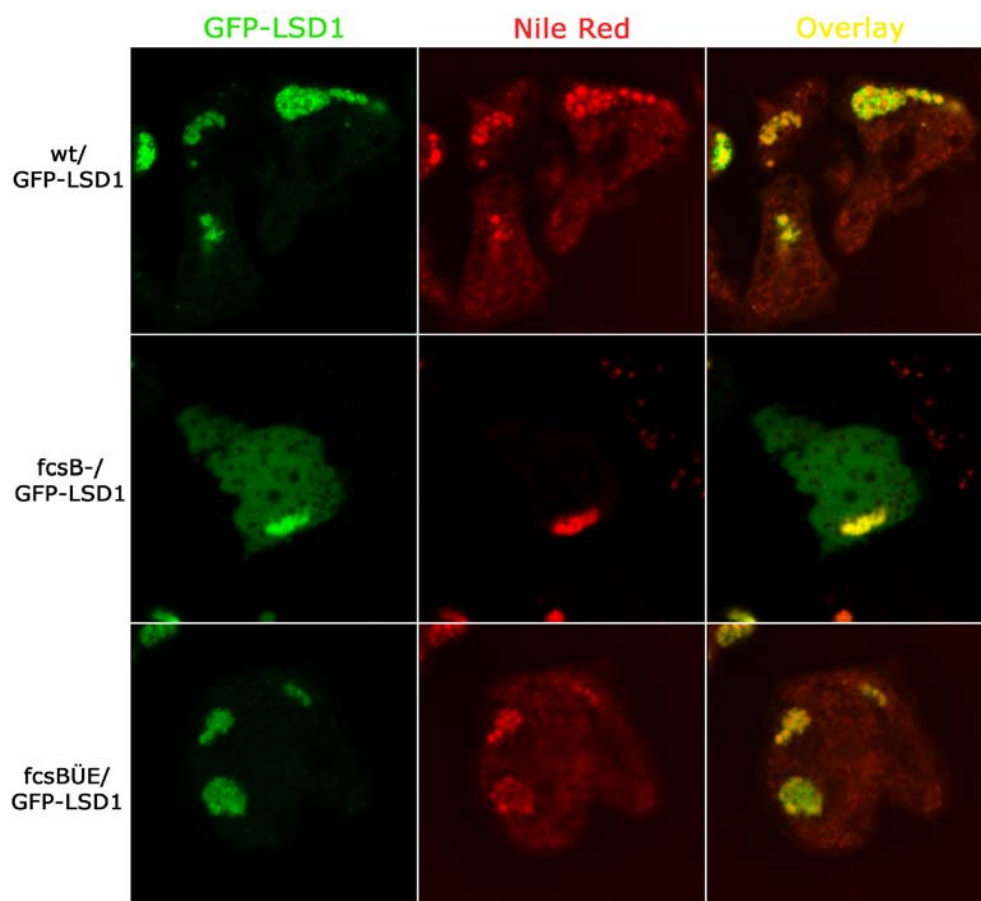


Abbildung 38: Lokalisation von GFP-LSD1 in verschiedenen Hintergründen; die Zellen wurden ü.N. in palmitinsäure-haltigem Medium kultiviert (200  $\mu$ M) und anschließend fixiert. Die Inkubation mit 20  $\mu$ M Nile Red-Lösung betrug 1 h. In A) sind wt-Zellen dargestellt, die GFP-LSD1 exprimieren, in B) *fcsB*<sup>-</sup>-Zellen und in C) *fcsB* überexprimierende Zellen. In allen Stämmen findet man Cluster von Lipidtropfen, die mit GFP-LSD1 dekoriert sind und deren Lumen durch Nile Red rot markiert wurde. Die Bildbreite beträgt jeweils 25  $\mu$ m für *fcsB*<sup>-</sup>/GFP-LSD1 und 30  $\mu$ m für die übrigen Stämme.

### 2.3.9 Die Expression von GFP-LSD1 erhöht die Neutral-Lipid-Menge in bakteriell kultivierten Zellen

Für Säuger-Zellen, die das LSD-Homolog Perilipin überexprimieren wurde gezeigt, dass diese Zellen eine verminderte Hydrolyse von Neutral-Lipiden aufweisen (7). Auf diesem Befund aufbauend, sollten in *fcsB*<sup>-</sup>-Zellen durch die Expression von GFP-LSD1 die Neutral-Lipid-Menge erhöht sein. Um dies zu prüfen wurden Neutral-Lipid-Assays durchgeführt. In axenisch gewachsenen Zellen kann keine Veränderung der Neutral-Lipid-Menge detektiert werden (Abb. 39A). In bakteriell gewachsenen Zellen hingegen kann tatsächlich eine Änderung der Menge an neutralen Lipiden detektiert werden. Hierbei ist die Menge an neutralen Lipiden in GFP-LSD1 exprimierenden Zellen im Wildtyp-Hintergrund in etwa doppelt so hoch, wie im Wildtyp (Daten nicht gezeigt). Die Menge der neutralen Lipide der *fcsB*<sup>-</sup>/GFP-LSD1-Zellen gegenüber wt/GFP-LSD1-Zellen liegt mit ca. 20 % Reduktion im selben Bereich wie *fcsB*<sup>-</sup>-Zellen im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 39B). *FcsB*<sup>ÜE</sup>/GFP-LSD1-Zellen weisen eine Erhöhung um ca. 20 % verglichen mit den wt/GFP-LSD1-Zellen auf. Die Werte zeigen allerdings eine hohe Standard-Abweichung. Setzt man nun die Menge der Neutral-Lipide des Wildtyps 100% und gleicht die Werte für die GFP-LSD1 exprimierenden Zellen hierauf an, so ergeben sich die Werte, die in Tabelle 4 zusammengefasst sind.

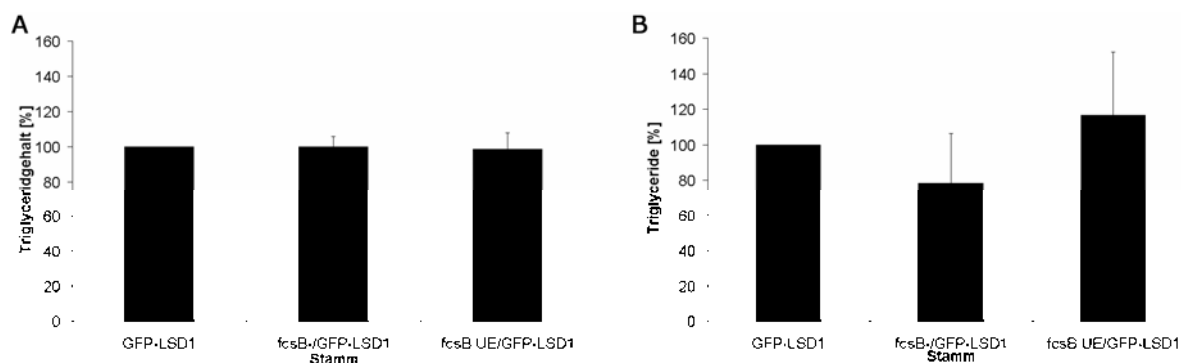


Abbildung 39: Neutral-Lipid-Assay von GFP-LSD1 exprimierenden Zellen in verschiedenen Hintergründen; A) in axenisch gewachsenen Zellen unterscheiden sich auch hier die Mutanten nicht vom wt, der GFP-LSD1 exprimiert. (n=4) B) bakteriell kultivierte Zellen (n=3), der LC-FACS2 „Knock-Out“ zeigt auch hier eine 20 %ige Reduktion der Neutral-Lipid-Menge. Die Menge im LC-FACS2 überexprimierenden Stamm ist nur noch um ca. 20% erhöht.

	wt	<i>fcsB</i> <sup>-</sup>	<i>fcsB</i> <sup>ÜE</sup>	GFP-LSD1	<i>fcsB</i> <sup>-</sup> /GFP-LSD1	<i>fcsB</i> <sup>ÜE</sup> /GFP-LSD1
Neutral-Lipid-Gehalt	100%	90%	160%	210%	170 %	250%

Tabelle 4: Vergleich der Neutral-Lipid-Menge bakteriell kultivierter Zellen unter Einfluss der GFP-LSD1 Expression in verschiedenen Hintergründen; durch die Expression von GFP-LSD1 lagern alle Mutanten mehr Neutral-Lipide ein. Das Verhältnis zwischen *fcsB* „Knock-Out“ und wt bzw. überexprimierenden Zellen und Wildtyp bleibt erhalten.

### 2.3.10 Die Expression von GFP-LSD1 hat Einfluss auf die Phagozytoserate und den endozytotischen Transit

Für den „Knock-Out“ der LC-FACS2 ist bekannt, dass die Phagozytoserate abhängig vom Nährstoffgehalt des Wachstums-Medium ist. Im Wildtyp und im Überexprimierer ist die Phagozytoserate umso höher, je weniger Nährstoffe im Medium zu finden sind (Tabelle 3). Wenn nun in Zellen LSD-GFP1 exprimiert wird, steigt die Menge an Neutral-Lipiden innerhalb der Zellen. Dies gilt jedoch nur für bakteriell kultivierte Zellen. In axenischem Medium kultiviert, zeigen diese Zellen eine kaum merkliche Erhöhung des Neutral-Lipid-Gehaltes.

Die Messung der Phagozytoserate in Abbildung 40A zeigt axenisch kultivierte Zellen. Trotzdem, dass die Expression von GFP-LSD1 keinen Einfluss auf die Menge an neutralen Lipiden hat, wird hier die Phagozytoserate verändert. *fcsB*<sup>-</sup>/GFP-LSD1-Zellen weisen eine bessere Phagozytoserate auf, wohingegen die Phagozytoserate von *fcsB*<sup>ÜE</sup>/GFP-LSD1-Zellen auf Wildtyp-Niveau sinkt.

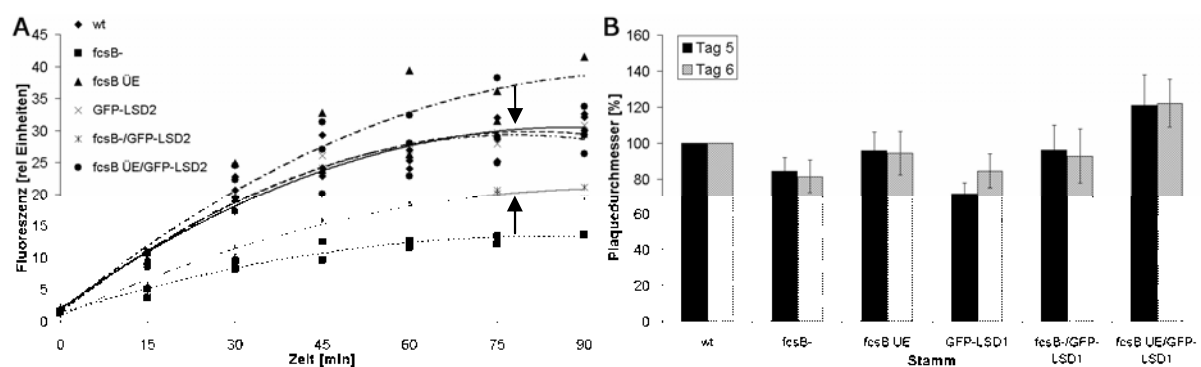


Abbildung 40: Die Phagozytoserate von axenisch kultivierten *fcsB*<sup>-</sup>/GFP-LSD1-Zellen ist partiell gerettet; (A) Messung der Phagozytoserate (n=2-4). Die Phagozytoserate von *fcsB*<sup>-</sup> „Knock-Out“ Zellen wird partiell gerettet, wenn sie GFP-LSD1 exprimieren (unterer Pfeil); Die Phagozytoserate der *fcsB*<sup>ÜE</sup> überexprimierenden Zellen sinkt, wenn sie GFP-LSD1 exprimieren (oberer Pfeil) (n=4). Dies korreliert nicht mit der Messung des Plaque-Durchmessers.

Auch mit diesen Zellen wurden Plaque-Assays durchgeführt (Abb. 40B). Hier zeigen die *fcsB*<sup>-</sup>/GFP-LSD1-Zellen einen kleinen Anstieg der Plaque-Größe im Vergleich zu *fcsB*<sup>-</sup>-Zellen. Dieser Anstieg ist jedoch nicht signifikant. Zudem zeigen die wt/GFP-LSD1-Zellen eine Reduktion, anstatt einer Zunahme des Plaque-Durchmessers. Außerdem nimmt die Größe des Plaque-Durchmessers von *fcsB*<sup>ÜE</sup>/GFP-LSD1-Zellen im Vergleich mit ihrem Eltern-Stamm zu. Die Daten bezüglich der Plaque-Größe stimmen ein weiteres Mal nicht mit den Messungen der Phagozytoserate überein. Es zeigt sich hier erneut, dass das Wachstum auf Bakterienrasen nicht allein durch die Phagozytoserate bestimmt wird.

Obwohl der Neutral-Lipid-Spiegel in Zellen, die GFP-LSD1 exprimieren im Vergleich zu Wildtyp-Zellen annähernd unverändert ist, zeigen diese Zellen im mutanten *fcsB*<sup>-</sup>

Hintergrund eine Veränderung der Phagozytoserate. LSD1 scheint also in der Zelle neben der Inhibition der Triglycerid-Hydrolyse, zusätzliche Aufgaben zu haben. Um zu prüfen, ob dieser Einfluss auch andere phänotypische Merkmale der *fcsB*-Mutanten betrifft, wurden diese Zellen weiter untersucht.

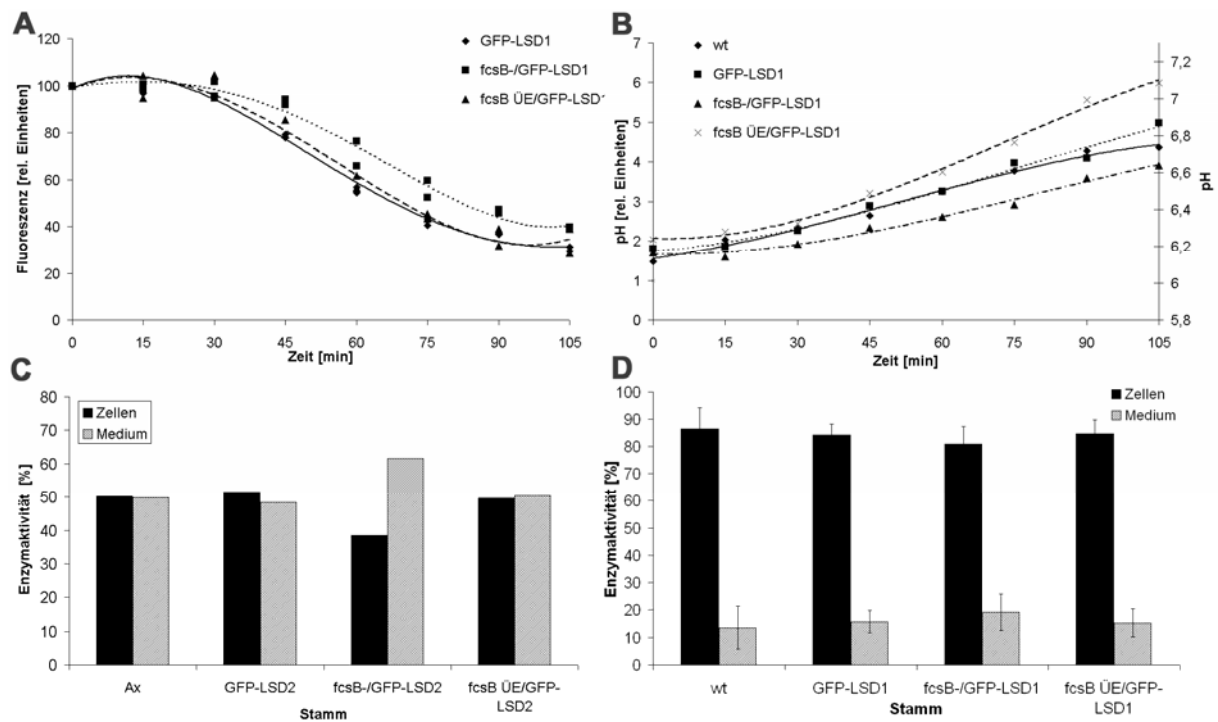


Abbildung 41: Endozytotischer Transit und Enzymsekretion von Zellen, die GFP-LSD1 in verschiedenen Hintergründen exprimieren; Der endozytotische Transit in *fcsB*<sup>-</sup>/GFP-LSD1 Zellen ist um ca. 20 min verzögert (A) (n=2). Auch der pH-Verlauf ist verändert. In *fcsB*<sup>-</sup>/GFP-LSD1 Zellen liegt der pH-Wert ca. 0,1 pH-Einheit unterhalb des wt; Der pH-Wert der Zellen, die LC-FACS2 und GFP-LSD1 überexprimieren liegt hingegen ca. 0,4 pH-Einheiten oberhalb des wt (B) Es sind die entsprechenden Messwerte für FITC-Dextran dividiert durch die Werte in A. Die Sekretion lysosomaler Enzyme verändert sich nicht im Vergleich zum Elternstamm. Nur im LC-FACS2 „Knock-Out“ Stamm findet eine erhöhte Exozytose statt. C)  $\alpha$ -Mannosidase, D) saure Phosphatase.

Während *fcsB*<sup>-</sup>-Zellen keine deutliche Verzögerung im Transit zeigen, führt die Expression von GFP-LSD1 zu einer Transit-Verzögerung von ca. 20 Minuten (Abb. 41A). Auch der pH-Wert sinkt in diesen Zellen, während der pH-Wert der LC-FACS2 Überexprimierer, die GFP-LSD1 exprimieren steigt. Die pH-Wert-Reduktion führt auch hier zu einer Transit-Verzögerung. Ein Anstieg des pH-Werts hat jedoch keinen Einfluss (Abb. 41B). Die Sekretion der  $\alpha$ -Mannosidase (Abb. 41C) oder der sauren Phosphatase (Abb. 41D) bleibt durch die Expression von GFP-LSD1 unverändert. Nur die *fcsB*<sup>-</sup>/GFP-LSD1-Zellen zeigen eine vermehrte Sekretion beider Enzyme. Dies entspricht dem Sekretions-Verhalten des Eltern-Stamm.

Da in GFP-LSD1 exprimierenden Zellen im *fcsB* „Knock-Out“ Hintergrund eine ähnliche Transitverzögerung und eine Reduktion des pH-Wertes vorliegt wie in *fcsA*<sup>-</sup>/*vacB*<sup>-</sup>-Zellen, soll auch in diesen Zellen die Morphologie des späten Endosoms untersucht werden.



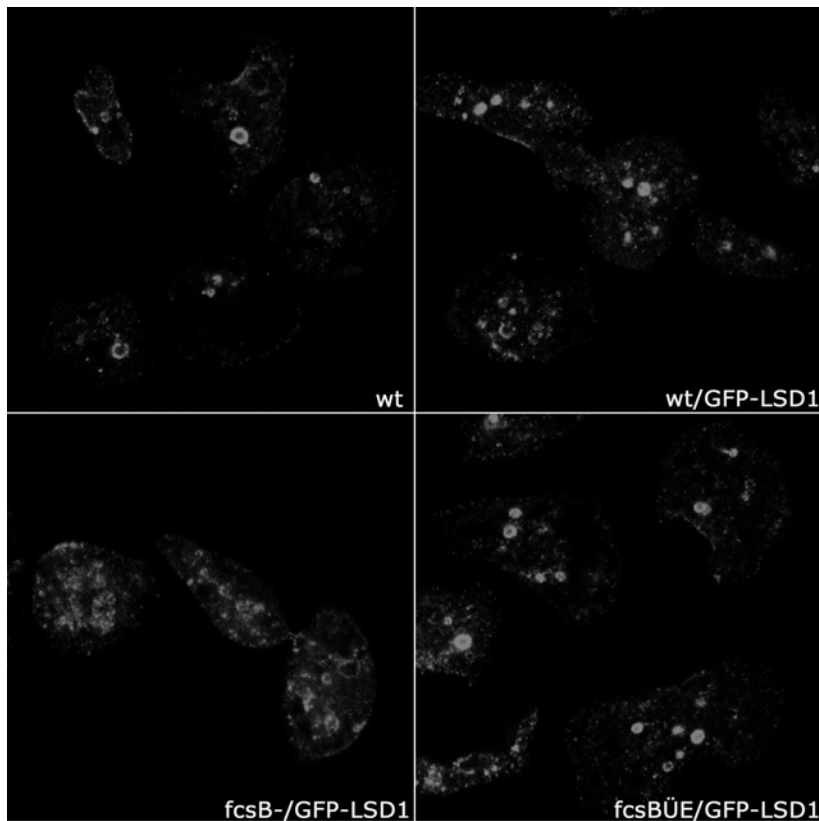


Abbildung 42: Lokalisation von Vacuolin in GFP-LSD1 exprimierenden Zellen; Immunfluoreszenzfärbung mit dem vacuolin-spezifischen Antikörper 263-79-2 A) Wildtyp-Zellen, B) wt/GFP-LSD1-Zellen, C) *fcsB*<sup>-</sup>/GFP-LSD1-Zellen und D) *fcsB*<sup>ÜE</sup>/GFP-LSD1-Zellen. Die Bildbreite beträgt jeweils 50 µm.

Abbildung 42 zeigt, dass sich die Morphologie des späten Endosoms in Zellen, die GFP-LSD1 exprimieren nicht von der ihres Ausgangsstamms unterscheidet. Die Verzögerung im endozytotischen Transit und der damit einhergehenden Reduktion des pH-Wertes, die die Expression von GFP-LSD1 im „Knock-Out“ Hintergrund bewirkt, wird also nicht durch eine Änderung der Morphologie der späten Endosomen hervorgerufen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die Endozytose in Dictyostelium nicht allein von der korrekten Funktion des Zytoskeletts bzw. damit assoziierter Proteine bestimmt wird. Der Organismus Dictyostelium zeigt, dass er viel komplexere Möglichkeiten hat, seine Exozytoserate zu determinieren. Durch die Regulation von Stoffwechselwegen kann sowohl die Aufnahmerate von Partikeln, als auch Morphologie von Organellen beeinflusst werden, was sowohl für *fcsA*<sup>-</sup>/*vacB*<sup>-</sup>-Zellen als auch für *fcsB*<sup>-</sup>-Zellen nachgewiesen werden konnte.

### 3 Diskussion

#### 3.1 Fehlende LC-FACS-Aktivität ruft Phänotypen im Triglycerid-Gehalt und der Endozytose hervor.

Um die Richtigkeit von Daten zu unterstützen, die mit „Knock-Out“-Mutanten erzielt wurden, werden in der Regel „Rescue“-Stämme erzeugt, die den Phänotyp der Mutanten retten sollen. Dies gelingt für *fcsB* „Knock-Out“-Zellen weder mit einem myc- oder einem GFP-markierten, noch mit einem unmarkierten Konstrukt. Die Defekte der *fcsB*-Null Zellen liegen in der Sekretion lysosomaler Enzyme, der Phagozytose und der Menge an neutralen Lipiden. In allen gemessenen Parametern, verhalten sich die „Rescue“-Zellen jedoch wie „Knock-Out“-Zellen (Daten nicht gezeigt).

Dass für *Dictyostelium*-Zellen die Aktivierung von Fettsäuren essentiell für die Phagozytose ist, konnte von Katharina von Löhneysen gezeigt werden. Sie inkubierte Zellen mit dem LC-FACS-Inhibitor TriacsinC. Die Phagozytoserate, die unter Einfluss dieser Droge gemessen wurde, lag ca. 50% unter der Phagozytoserate unbehandelter Zellen (98). Diese Reduktion der Phagozytoserate hat in etwa denselben Umfang wie die, die in LC-FACS2 „Knock-Out“-Zellen gemessen wurde. Es ist daher wahrscheinlich, dass die Reduktion der Phagozytoserate durch TriacsinC durch die Inhibition der LC-FACS2 hervorgerufen wurde.

Initiale Experimente deuten auch darauf hin, dass die LC-FACS2-Aktivität in der peroxisomalen Fraktion der „Rescue-Mutanten“ sogar über der des Wildtyps liegt. Dies bedeutet, dass ein funktionelles Protein exprimiert wird, das trotzdem nicht in der Lage ist, den mutanten Phänotyp zu retten.

Dass der Phänotyp der *fcsB*<sup>-</sup>-Zellen nicht durch das Fehlen der LC-FACS2 hervorgerufen wird, sondern durch eine Mutation in einem anderen Gen, das durch das Einbringen des „Knock-Out“-Konstruktes ausgeschaltet wurde, kann durch Abbildung 23 ausgeschlossen werden. Die Primerkombination wurde so gewählt, um nachweisen zu können, dass tatsächlich der Locus des *fcsB*-Gens durch homologe Rekombination getroffen wurde. Des Weiteren wurden aus vier Transformationen unabhängige Klone erhalten, die alle denselben Phänotyp aufwiesen. Es ist daher unwahrscheinlich, dass der Phänotyp durch ein sekundäres, unspezifisches Rekombinations-Ereignis erzeugt wird.

Eine weitere mögliche Erklärung ist, dass die Phänotypen sekundäre Effekte auf das Ausschalten der LC-FACS2 darstellen. Die LC-FACS2 zeigt hohe Homologie-Werte zu den Proteinen *faa1p* aus Hefe und *ACSL1* aus Säugern (Abb. 18 und Text). Für beide Proteine konnte eine Interaktion mit *Fat1p* (Hefe) bzw. *FATP1* (Säuger) nachgewiesen werden (75, 106). Es ist daher anzunehmen, dass auch die LC-FACS2 aus *Dictyostelium* einen Interaktionspartner hat, der Homologien zu *FATP1* aufweist. Für *Dictyostelium* wird ein

solches Protein in der Datenbank (DDB0205849) vorhergesagt. Wenn das Einbringen von funktionellem LC-FACS2-Protein keinen Einfluss auf den Phänotyp der „Knock-Out“-Mutante hat, so könnte dies darauf zurückzuführen sein, dass die Expression eines potentiellen Interaktionspartners irreversibel verändert wurde.

Hier könnte eine Analyse der Expressionsmuster Hinweise auf die tatsächlichen Vorgänge geben. Dies könnte durch eine gezielte Untersuchung des Expressionsverhaltens des potentiellen Fat1p-Homologs in Dictyostelium (DDB0205849) durch z.B. RT-PCRs erreicht werden. Ist jedoch das Expressionsmuster eines unbekanntes Proteins betroffen, müsste eine „Micro-Array-Untersuchung“ durchgeführt werden. Der Erfolg dieser Analysen ist jedoch fragwürdig.

### 3.2 Die LC-FACS2 in Dictyostelium lokalisiert in Peroxisomen

Die Lokalisation der LC-FACS2 in Dictyostelium wurde mit Fusions-Konstrukte mit GFP bzw. dem myc-Epitop analysiert (Abb. 20 und 21). Dies sind anerkannte Methoden, um die Lokalisation eines Proteins zu bestimmen, wenn kein Antikörper zur Verfügung steht. Dennoch haben sie ihre Limitationen.

Das C-terminale GFP-Konstrukt, das hier verwendet wurde, lokalisiert im ER (Abb. 20). Aufgrund der vorhergesagten ER-Signal-Sequenz bzw. des ER-Rückhalte-Signals (KKXX-like), ist diese Lokalisation auch nahe liegend. Lässt man jedoch den C-Terminus unverändert und bringt ein myc-Epitop in der Mitte des Proteins ein, findet man dieses LC-FACS2-Protein in Peroxisomen (Abb. 21). Diese unvereinbaren Befunde könnten entweder durch eine Misslokalisierung des myc-markierten Konstruktes oder die Überdeckung eines Sortierungs-Signals durch das GFP verursacht werden.

Die ER-Lokalisation kann in Zellen, die das myc-markierte Protein exprimieren kaum detektiert werden. Abbildung 21 A zeigt eine der seltenen Aufnahmen, in denen die ER-Lokalisation auch mit dem myc-markierten Protein sichtbar ist. Wenn das Protein in das ER translatiert wird, akkumuliert es möglicherweise in Bereichen, die von Geuze et al. als „spezialisiertes ER“ bezeichnet werden. Von dort knospen dann Vesikel, die zu Peroxisomen heranreifen (27). In Abbildung 20 A können punktförmige Strukturen (Pfeile) detektiert werden, die frei von der PDI sind. Laut Geuze et al. ist dies ein Charakteristikum des „spezialisierten ERs“. Die Lokalisation des LC-FACS2-GFP-Konstrukts scheint in Richtung der ER-Lokalisation verschoben. Vermutlich wird durch das GFP ein Signal überdeckt, das dazu führt, dass sich die LC-FACS2 in den Vesikeln befindet, die vom ER knospen und zu Peroxisomen heranreifen.

Schon mehrfach wurde darüber berichtet, dass das Anhängen von GFP an ein Zielprotein die Funktion und die Lokalisation eines Proteins beeinträchtigt (10, 26, 44). Das kleine

myc-Epitop scheint hierauf keine Auswirkungen zu haben. Es ist daher wahrscheinlich, dass das relativ große Molekül GFP ein Sortierungs-Signal in der LC-FACS2 überdeckt, was dann zu einer ausschließlichen ER-Lokalisation führt.

Dass die LC-FACS-Aktivität in der Peroxisomen-Fraktion im „Knock-Out“-Stamm reduziert ist (Abb. 26), deutet auch darauf hin, dass diese peroxisomale Lokalisation, die mit dem myc-markierten Konstrukt nachgewiesen wurde, die korrekte Lokalisation des endogenen Proteins darstellt.

Um zweifelsfrei zu klären, ob die LC-FACS2 im ER lokalisiert, oder nur durch das ER hindurch transportiert wird, könnte ein Konstrukt hergestellt werden, in dem das GFP hinter die ER-Signal-Sequenz fusioniert wird. Jedoch kann auch hier nicht gänzlich ausgeschlossen werden, dass ein Signal überdeckt werden würde. Zudem könnten jedoch weitere myc-markierte Konstrukte hergestellt werden, die das myc-Epitop an unterschiedlichen Stellen tragen. Trägt man dann die Lokalisations-Daten zusammen, erhält man nahezu vollständige Sicherheit über die Richtigkeit der Lokalisation der LC-FACS2. Die beste Möglichkeit die Daten abzusichern ist einen Antikörper gegen dieses Protein herzustellen. Mit all diesen Möglichkeiten, könnte man die Lokalisations-Daten sicherer machen.

In der Einleitung dieser Arbeit wurde bereits auf die Peroxisomen-Biogenese eingegangen (1.3.3). Der Disput, der unter Wissenschaftlern schon seit einiger Zeit existiert, beschäftigt sich mit der Beteiligung des ERs an der Biogenese der Peroxisomen. Ein weiterer Hinweis, dass das ER an der Peroxisomen-Biogenese beteiligt ist, konnten kürzlich Haan und Mitarbeiter zeigen. Sie untersuchten die Lokalisation von Pex3p in *Hansenula polymorpha*. Sie demonstrierten, dass Pex3p, das eine N-terminale ER-Signal-Sequenz trägt (überprüft mit dem Programm SignalP; <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>), sowohl im ER, als auch in Peroxisomen lokalisiert (29). Pex3p ist somit strukturell mit der LC-FACS2 vergleichbar und lokalisiert in denselben Kompartimenten.

Die Daten dieser Arbeit stützen somit die Annahme, dass peroxisomale Proteine das ER durchlaufen können. Dabei ist unumstritten, dass Matrix-Proteine vom Zytoplasma direkt und bereits korrekt gefaltet in Peroxisomen gelangen. Der umstrittene Punkt ist der Transport von Transmembran-Proteinen. Die LC-FACS2 ist ein solches Transmembran-Protein. Sie wird, wie Pex3p, in das ER translatiert und findet sich zu einem späteren Zeitpunkt in Peroxisomen wieder. Es handelt sich jedoch bei der LC-FACS2 um ein Protein, das nicht direkt in die Peroxisomen-Biogenese involviert ist und trotzdem sowohl im ER, als auch in Peroxisomen zu finden ist.

Für die weitere Analyse der beobachteten Phänotypen ist die Lokalisation der LC-FACS2 jedoch nicht maßgeblich. Auch für das unter 3.4 vorgestellte Modell hat es keinen Einfluss, auf welcher Organelle die LC-FACS2 lokalisiert.

### 3.3 Das Ziel von LC-FACS2 aktivierten Fettsäuren ist nicht die $\beta$ -Oxidation

Langkettige Fettsäuren werden in der Regel in Mitochondrien und nicht in Peroxisomen abgebaut. Nur für Hefe ist bekannt, dass sie langkettige Fettsäuren in Peroxisomen verstoffwechselt (42). Für *Dictyostelium*-Zellen werden diverse Enzyme, die für die  $\beta$ -Oxidation von Fettsäuren nötig sind, vorhergesagt ([www.dictybase.org](http://www.dictybase.org)). Ihre Lokalisation ist jedoch nicht bekannt. Nachgewiesen wurde bisher nur, dass  $\beta$ -Oxidation in Peroxisomen stattfindet. Matsuoka et al. fusionierten GFP an das „Multifunctional Protein 1“ (MFE1), das die ersten beiden Schritte der  $\beta$ -Oxidation katalysiert und detektierten eine Lokalisation in Peroxisomen. Eine MFE1 „Knock-Out“-Mutanten hat einen Defekt in der peroxisomalen Degradation von Fettsäuren. Phänotypisch zeigt sich dies in einem Defekt im Entwicklungszyklus. Der Phänotyp wird auf eine Akkumulation von Zyklopropan-Fettsäuren zurückgeführt (55). Wäre die Funktion der LC-FACS2 diese zyklischen C17:0-Fettsäuren zu aktivieren, würde man in *fcsB*<sup>-</sup>-Zellen einen ähnlichen Phänotyp wie in MFE1 „Knock-Out“-Mutanten erwarten. Da die *fcsB*<sup>-</sup>-Zellen jedoch keinen Defekt in der Entwicklung zeigen, aktiviert die LC-FACS2 vermutlich keine langkettigen Fettsäuren, die degradiert werden sollen.

### 3.4 Ein Pool aus Acyl-CoAs und unaktivierten Fettsäuren als Regulator zellulärer Prozesse

In dieser Arbeit wird postuliert, dass Fettsäuren die Phagozytoserate regulieren. Wie dies möglich ist, wird in Abbildung 43 veranschaulicht. Hier wird ein Modell des Wirkungsspektrum von Acyl-CoAs, das Faergmann und Knudsen postulieren, vorgestellt (24). Dem Modell liegt die Idee zu Grunde, dass im Zytoplasma aller untersuchten Eukaryoten das „Acyl CoA Binding Protein“ (ACBP) lokalisiert, das dort CoA-aktivierte Fettsäure bindet. Die höchste Affinität liegt hierbei auf Fettsäuren mit einer Kettenlänge zwischen C<sub>14</sub> und C<sub>22</sub>. Fettsäuren, die nicht aktiviert sind, werden nicht gebunden (76). Neben ACBP gibt es jedoch auch „Fatty acid binding proteins“ (FABPs), die freie Fettsäuren binden (1). Sie wurden in dieser Abbildung nicht berücksichtigt. Diese an ACBP und FABP gebundenen Fettsäuren bilden einen Pool aus Acyl-CoA und freien Fettsäuren, auf den verschiedene Organellen und Enzyme zugreifen können. Hierbei ist die Aktivität der Bindeproteine

entscheidend. Diesen Pool müssen Fettsäuren durchlaufen, ehe sie z.B. in Triglyceride oder Lipide eingebaut oder der  $\beta$ -Oxidation zugeführt werden (72).

Der Acyl-CoA-Pool beeinflusst auch eine Vielzahl von Membranvorgängen. Bereits vor einigen Jahren konnte die Wichtigkeit von Acyl-CoAs für das Knospen von Vesikeln am Golgi-Apparat nachgewiesen werden (68). Für die Fusion von Vesikeln mit Golgi-Zisternen wurde die Beteiligung von Acyl-CoAs postuliert. Sie werden nach der Bindung des NEM-sensitiven Fusions-Proteins (NSF) an der Zielmembran für das „Uncoating“ von „coated vesicles“ benötigt (67). Des Weiteren konnte der Einfluss von Acyl-CoA auf Fusionsprozesse (18, 39) und auf Fissionsprozesse (8) an der ER-Membran gezeigt werden. Inhibiert man die Acyltransferase im ER, so wird das Knospen von COP dekorierten Vesikeln unterdrückt (8). Außerdem benötigt die Protein-Acylierung, ein wichtiger Mechanismus, um Proteine in der Membran zu verankern, Acyl-CoAs. Zu den acylierten Proteinen gehören die  $G\alpha$ -Untereinheiten von trimeren G-Proteinen, verschiedene Rezeptoren oder auch einige Proteine der Ras-Familie [zusammengefasst in (74)].

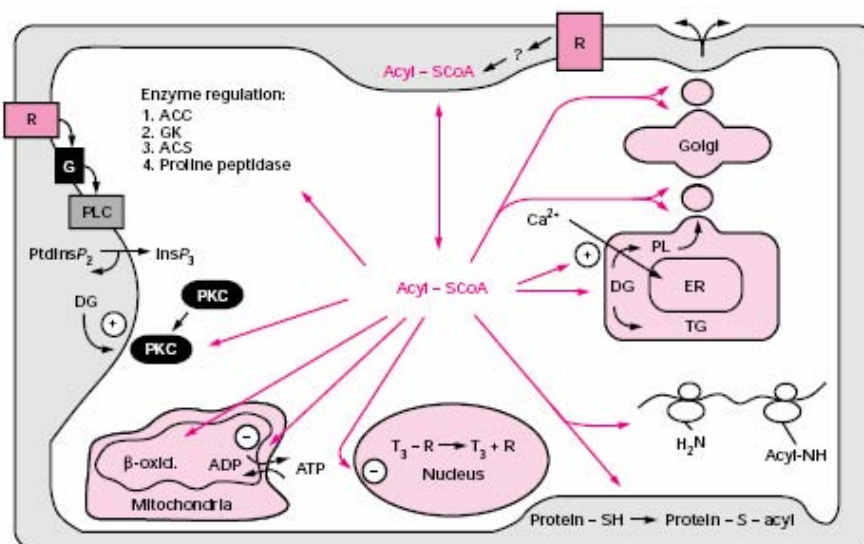


Abbildung 43: Acyl-CoA Metabolismus und die daraus resultierende Signaltransduktion; es konnten diverse Prozesse identifiziert werden, die durch Acyl-CoAs reguliert werden. Ein Acyl-CoA Pool wird durch die Bindung von ACBP generiert. ACBP wiederum ist in der Lage, die Acyl-CoA Synthetase-Aktivität zu stimulieren und die Hydrolyse von Acyl-CoA-Estern zu verhindern. Abkürzungen: ACC: Acetyl-CoA Carboxylase; ACS: LC-FACS; DG: Diacylglycerol; ER: Endoplasmatisches Retikulum; GK: Glucokinase; PL: Phospholipid; PLC: Phospholipase C; R: Rezeptor; TG: Triacylglycerol

Zudem nehmen Acyl-CoAs Einfluss auf die Energiegewinnung in Mitochondrien. Palmitinsäure (C16:0) ist das Produkt der Fettsäuresynthese im Zytoplasma. Diese Fettsäure kann nun verlängert oder mit Doppelbindungen versehen werden. Palmitinsäure bildet also das Substrat für die verschiedensten Enzyme. Es konnten in den vergangenen Jahren für diverse Enzyme nachgewiesen werden, dass Palmitinsäure in der

aktivierten, Palmitoyl-CoA-Form ihre Aktivität herabsetzt. Die Synthese von Palmitinsäure wird z.B. durch Palmitoyl-CoA gehemmt (40). Des Weiteren konnte eine Inhibition des Citrat-Transportes bei höheren Palmitoyl-CoA Konzentrationen festgestellt werden (31). Außerdem wurden eine Reduktion der Aktivität der mitochondrialen Pyruvat-Dehydrogenase und eine Inhibition der Adenin-Nukleotid-Kinase (ANT) beschrieben (58, 82). All diese Befunde sprechen dafür, dass die Erhöhung der Palmitoyl-CoA-Konzentration eine verminderte Energiegewinnung in Mitochondrien zur Folge hat. Diese verminderte Energieausbeute könnte der Grund dafür sein, dass *Dictyostelium*-Zellen mit einer geringeren Verdopplungszeit wachsen, wenn die Palmitinsäure-Konzentration im Medium erhöht ist (Tabelle 2).

Abbildung 43 zeigt eine Vielzahl von Effektoren von Acyl-CoAs. Ein Kompartiment lässt dieses Schema jedoch aus. Auch die neutralen Lipide, die in Lipidtropfen gespeichert vorliegen, werden aus Acyl-CoA synthetisiert [zusammengefasst in (17)]. Die Daten, die in dieser Arbeit gesammelt wurden, deuten jedoch darauf hin, dass Lipidtropfen eine entscheidende Rolle im Lipid-Metabolismus in *Dictyostelium* einnehmen.

### 3.4.1 LC-FACS Proteine in *Dictyostelium* erzeugen einen Pool aus Fettsäuren

Sowohl *fcsB* „Knock-Out“-, als auch *fcsB* überexprimierende Zellen besitzen einen Phänotyp, der von der Art der Kultivierung abhängig ist (Tabelle 3). Hierbei scheint ein inverser Zusammenhang der Kultivierungs-Bedingungen und der Phagozytoserate zu bestehen. Man könnte von einer „Feedback“-Reaktion der Zelle sprechen. Die Zelle misst in einer noch ungeklärten Weise die Menge an Fettsäuren und somit ihren „Energiesstatus“. Ist dieser gering muss die Zelle vermehrt endozytieren, damit dieses Defizit ausgeglichen werden kann. Misst die Zelle hingegen ausreichend Nährstoffe, wird die Aufnahmerate gesenkt (Tabelle 3 und Abb. 34).

Als Basis des Modells der LC-FACS-Funktion, gehen wir von folgenden Grundannahmen aus, die in Abbildung 44 veranschaulicht werden. In axenisch kultivierten Wildtyp-Zellen, befinden sich gerade ausreichend Nährstoffe, dass die Zelle pinozytieren und sich teilen kann. Fettsäuren werden in der Hauptsache *de novo* gebildet. Es existiert allerdings trotzdem ein Fettsäure-Pool. Dieser wird jedoch kaum aus der Nahrung, sondern vor allem von zellulären Enzymen beliefert. So entsteht kein Überschuss an Fettsäuren, der in Lipidtropfen gespeichert werden muss (Daten nicht gezeigt). Die geringe Menge neutraler Lipide, die in axenisch kultivierten Zellen messbar ist, wird an anderen Orten in der Zelle verwendet.

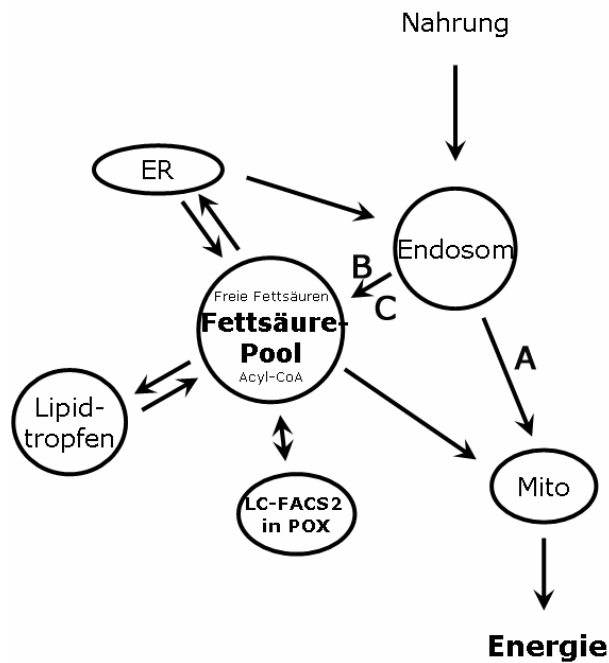


Abbildung 44: Modell der Vorgänge zwischen Lipidtropfen, Peroxisomen und Mitochondrien in Dictyostelium, A) bei axenischem Wachstum werden Zucker aus dem Flüssigmedium in Mitochondrien verstoffwechselt B) in Gegenwart von Palmitinsäure und C) bei bakteriellem Wachstum wird der Fettsäure-Pool mit Fettsäuren beliefert; in B) und C) spielen Zucker nur eine untergeordnete Rolle

In bakteriell kultivierten Wildtyp-Zellen werden Fettsäuren durch Bakterien von außen zugeführt. Dies erhöht den intrazellulären Fettsäure-Pool. Das Plus an Fettsäuren führt dazu, dass die Zellen weniger phagozytieren müssen (Tabelle 3). Umgekehrt führt eine geringere Aufnahme energiereicher Substanzen, wie in Phosphatpuffer dazu, dass die Zellen einen kleineren Fettsäure-Pool und somit einen niedrigeren Energiestatus haben; die Phagozytose steigt (Tabelle 3). Wenn nun eine geringere Größe des Fettsäure-Pools zu einer Steigung der Phagozytoserate führt, bedeutet dies für den *fcsB* überexprimierenden Stamm, dass sein Fettsäure-Pool kleiner sein muss als der des Wildtyps. Im umgekehrten Fall bedeutet dies für den „Knock-Out“, dass dieser einen größeren Pool besitzt. D.h. die LC-FACS2 entzieht dem Pool Fettsäuren.

Rasmussen et al. stellten fest, dass eine erhöhte Menge an Acyl-CoAs zu einem Anstieg der Triglycerid-Konzentration führt (72). Abbildung 21 zeigt, dass die Lipidtropfen des *fcsB* überexprimierenden Stammes der in palmitinsäure-haltigem Medium kultiviert wurde, intensiver gefärbt sind. Dies impliziert, dass die LC-FACS2 den Anteil von Acyl-CoAs im Fettsäure-Pool erhöht. In *fcsB*-Zellen hingegen sind die Lipidtropfen in den Zellen kleiner, als die des Wildtyps. Der Acyl-CoA-Anteil sinkt.

Dies deutet darauf hin, dass das Substrat, aber auch das Produkt der LC-FACS2 im Fettsäure-Pool zu finden ist. Daher muss für eine Klärung der Phänotypen ein zweigeteilter Fettsäure-Pool angenommen werden.



### 3.4.2 Nur eine Komponente des zweigeteilten Fettsäure-Pool reguliert die Phagozytoserate

Das Substrat von LC-FACS-Proteinen sind unaktivierte, freie Fettsäuren; das Produkt sind Acyl-CoAs. Wenn also im Fall der LC-FACS2 Substrat und Produkt im Fettsäure-Pool lokalisieren, sollte der Pool zum einen aus unaktivierten Fettsäuren und zum anderen aus Acyl-CoAs bestehen.

Wie Tabelle 5 demonstriert, ist die Phagozytose zu einem Teil des Fettsäure-Pools umgekehrt proportional. Ist der Pool an unaktivierten Fettsäuren groß, weil die LC-FACS2 dort keine Fettsäuren entnehmen kann (*fcsB<sup>-</sup>*), so ist die Phagozytose niedrig. Ist der Pool an unaktivierten Fettsäuren klein (z.B. *fcsB* ÜE), so steigt die Phagozytoserate.

In axenisch kultivierten Zellen, die GFP-LSD1 exprimieren, wird eine minimale Erhöhung der Menge neutraler Lipide detektiert (Daten nicht gezeigt). Dies ist das einzige Merkmal, das sie von ihrem jeweiligen Elternstamm unterscheidet. Sie sollten somit etwa das gleiche Phagozytose-Verhalten aufweisen, wie ihr jeweiliger Eltern-Stamm. Dies ist nicht der Fall. Vermutlich hat die Expression von GFP-LSD1 zusätzliche Folgen, die mit den hier verwendeten Methoden nicht vollständig erfasst werden können.

Stamm	Acyl-CoA-Pool	unaktivierte Fettsäuren	Phagozytose
Wildtyp	0	0	0
<i>fcsB<sup>-</sup></i>	↓	↑	↓
<i>fcsB</i> ÜE	↑	↓	↑
wt/GFP-LSD1	↓	0	0
<i>fcsB<sup>-</sup></i> /GFP-LSD1	↓	↑	↓
<i>fcsB</i> ÜE/GFP-LSD1	↓↑	↓	0

Tabelle 5: Das Verhältnis von Acyl-CoAs und unaktivierten Fettsäuren ist entscheidend für die Phagozytoserate axenisch kultivierter Zellen. Sinkt die Menge an unaktivierten Fettsäuren und verschiebt sich der Fettsäure-Pool in Richtung der Acyl-CoAs, so steigt die Phagozytose; steigt die Menge unaktivierter Fettsäuren, so sinkt die Phagozytoserate; 0 weist hier auf ein wildtypisches Verhalten hin.

Wird die LC-FACS2 überexprimiert, so werden vermehrt Acyl-CoAs produziert. Dies hat eine Reduktion des Anteils freier Fettsäuren zur Folge. In der Abwesenheit der LC-FACS2 können keine freien Fettsäuren aktiviert werden; der Anteil freier Fettsäuren vergrößert sich.

Die Fettsäurebestandteile von Bakterien werden von der LC-FACS1 aktiviert und in den Acyl-CoA Anteil des Fettsäure-Pools überführt. Diese Reaktion ist abhängig von der Menge an LC-FACS1 (99). Zellen, die LC-FACS1 überexprimieren, aktivieren mehr Fettsäuren aus den Endosomen. Dies impliziert, dass die Menge an LC-FACS1 limitierend ist. Die Fettsäuren, die die LC-FACS1 nicht aktiviert, verlassen das Endosom in Richtung eines Konzentrations-Gefälles als freie, unaktivierte Fettsäure. Somit erhöht bakterielles Wachstum sowohl den Anteil an freien Fettsäuren, als auch den Anteil an Acyl-CoAs. Ein erhöhter Anteil freier Fettsäuren korreliert mit einer Reduktion der Phagozytoserate. In Abbildung 45 wird ein Modell vorgestellt, das veranschaulicht, welche Organellen auf den Fettsäure-Pool wirken.

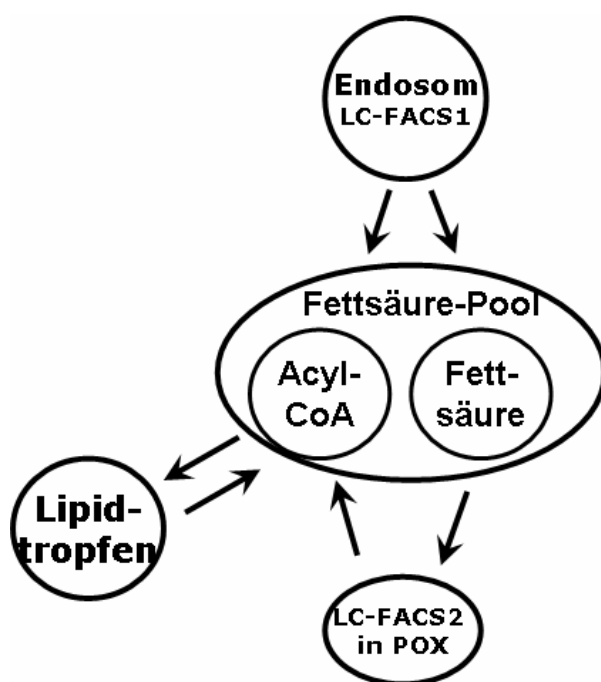


Abbildung 45: Der Fettsäurepool besteht aus unaktivierten Fettsäuren und CoA aktivierten Fettsäuren. Die LC-FACS2 entzieht dem Pool Fettsäuren und gibt gleichzeitig Acyl-CoAs zurück. Die Hydrolyse oder der Aufbau von neutralen Lipiden in Lipidtropfen, hat nur Einfluss auf den Acyl-CoA-Anteil des Fettsäurepools.

Wird nun durch das Wachstum in bakterieller Kultur oder in Gegenwart von Palmitinsäure der Input in diesen Pool erhöht, nähert sich die Phagozytoserate der *fcsB* Mutanten wildtypischem Niveau. Dies gilt sowohl für die überexprimierenden, als auch für die „Knock-Out“-Zellen (Tabelle 3).

LC-FACS2 überexprimierende Zellen weisen in axenischem Medium einen reduzierten Anteil unaktivierter Fettsäuren auf. Durch bakterielles Wachstum wird der Anteil unaktivierter Fettsäuren erhöht. Die Zellen phagozytieren mit einer wildtypischen Rate. In bakteriell kultivierten LC-FACS2 „Knock-Out“-Zellen wird u.a. der Anteil an Acyl-CoAs erhöht. Dies könnte den Überschuss an unaktivierten Fettsäuren ausgleichen. Dieser Überschuss würde zwar immer noch die Phagozytoserate reduzieren; im Vergleich zum Anteil CoA aktivierter Fettsäuren wäre er jedoch nicht mehr so hoch wie in axenisch kultivierten Zellen.

### 3.5 Der Anteil an Acyl-CoAs in VacuolinB/LC-FACS1 Doppelmutanten ist reduziert.

Durch das Ausschalten des *fcsA*-Gens werden weniger Fettsäuren aus Endosomen aktiviert. Für axenisches Wachstum bleibt dies ohne Konsequenzen. Für bakteriell kultivierte „Knock-Out“-Zellen konnte entgegen der Erwartungen auch keine Änderung der Wachstumsrate verzeichnet werden (99). Unter Berücksichtigung des Modells aus Abbildung 45 und der Annahme, dass auch freie Fettsäuren die Endosomen-Membran passieren, hat der „Knock-Out“ der LC-FACS1 eine Reduktion des Anteils an Acyl-CoAs zur Folge. Dass der Acyl-CoA-Anteil des Pools nicht durch die Aktivität der LC-FACS1 beliefert wird, wird auch in einer Reduktion der Triglycerid-Menge deutlich (Abbildung 12). Die freien, unaktivierten Fettsäuren, die durch die Degradation der Bakterien in Endosomen entstehen, werden unaktiviert in das Zytoplasma entlassen. Diese können dann z.B. von der LC-FACS2 aktiviert werden. Da jedoch die Aktivität der LC-FACS1 fehlt, sinkt der Anteil an Acyl-CoAs.

Die Zusammensetzung der Fettsäure-Pools hat für *fcsA* „Knock-Out“-Zellen keine messbaren Effekte. *vacB*<sup>-</sup>/*fcsA*<sup>-</sup>-Zellen wurden hergestellt, um synthetische Effekte herbeizuführen. Tatsächlich konnte der *vacB* "Knock-Out"-Phänotyp abgemildert werden. Eine mögliche Ursache hierfür könnte in einer Reduktion des Triglycerid-Gehaltes liegen, wobei in den Doppelmutanten mehr Triglyceride gespeichert werden, als in *fcsA*<sup>-</sup>-Zellen.

	<i>vacB</i> <sup>-</sup>	<i>vacB</i> <sup>-</sup> / <i>fcsA</i> <sup>-</sup>
Transit	- -	-
Enzym-Sekretion	- -	- -
Exozytose	- -	- -
Pinozytose	+ +	+
Triglycerid-Menge	wt	- -

Tabelle 6: Zusammenfassung des Phänotyps der Doppelmutanten im Vergleich zu Vacuolin „Knock-Out“ Zellen; Nur die Enzymsekretion weist gleiche Werte auf. Im endozytotischen Transit, Exozytose und Pinozytose zeigen die Mutanten unterschiede auf. + bedeutet eine Erhöhung im Vergleich zum wt, - eine Erniedrigung im Vergleich zum wt.

Vacuolin „Knock-Out“ Zellen erreichen das Plateau, also den Zeitpunkt, bei dem Endo- und Exozytose des Flüssigphasen-Markers im Gleichgewicht stehen, wesentlich später als der Wildtyp, aber auch als die Doppelmutanten (Abb. 9D und (38)). Auch im endozytotische Transit liegen die Werte der Doppelmutanten zwischen *vacB*<sup>-</sup>-Zellen und dem Wildtyp (Abb. 9C). Die Exozytoserate ist annähernd gleich (Abb. 10).

Wie kann es sein, dass trotz einer ähnlichen Exozytoserate, der Transit im Gegensatz zu  $\text{vacB}^-$ -Zellen beschleunigt wurde? Tabelle 6 veranschaulicht die Unterschiede der beiden Mutanten. Nur der endozytotische Transit und die Pinozytoserate sind in der Doppelmutante verändert. Da die Veränderung der Pinozytoserate und damit die Verschiebung des „steady state“ durch die Verzögerung im endozytotischen Transit hervorgerufen werden, liegt die Ursache für die veränderte Pinozytoserate in der Verzögerung des endozytotischen Transits.

Die Ursache für die Verzögerung des endozytotischen Transits hingegen benötigt eine etwas komplexere Erklärung. Der endozytotische Transit ist die Zeit, die ein aufgenommenes Marker-Molekül X benötigt, um dann wieder exozytiert zu werden. In *Dictyostelium* führt eine Absenkung des pH-Wertes zu einer Reduktion der Exozytoserate. Dies wird u.a. in einer Verzögerung des endozytotischen Transits messbar. Sowohl das Ausschalten verschiedener Proteine (9, 38), als auch osmotische Veränderungen (69), können zu einer Reduktion des endosomalen pH-Wertes führen. Damit einher geht eine Verzögerung der Exozytose (9, 38, 69). In  $\text{vacB}^-/\text{fcsA}^-$ -Doppelmutanten kann umgekehrt beobachtet werden, dass eine pH-Wert-Erhöhung den endozytotischen Transit beschleunigt.

Für Vacuolin wird angenommen, dass es sich bei diesem Protein um einen Fusions-Inhibitor handelt. Gestützt wird diese Idee dadurch, dass Vacuolin B „Knock-Out“ Zellen nur noch ein bis zwei große späte Endosomen besitzen (21). Durch die vermehrte Fusion mit sauren Kompartimenten kommt es in diesen „Knock-Out“ Zellen vermutlich zu der Reduktion des endosomalen pH-Wertes (Abb. 9B und (38)). In den  $\text{vacB}^-/\text{fcsA}^-$ -Doppelmutanten findet man weiterhin ein bis zwei große, späte Endosomen. Der Unterschied zu ihrem Ausgangsstamm liegt darin, dass ein Marker-Molekül weniger Zeit dafür benötigt die Kompartimente der Zelle zu durchlaufen (Abb. 9C). Eine verminderte Fusion saurer Endosomen mit bereits neutralisierten, ist unwahrscheinlich, da VacuolinB auch in diesen Zellen als Fusions-Inhibitor fehlt. Daher fusionieren vermutlich trotz des Fehlens der LC-FACS1 saure Endosomen mit bereits neutralisierten.

Eine andere Möglichkeit könnte allerdings sein, dass die VacuolinB negativen Endosomen einem höheren Grad der Vesikel-Fission ausgesetzt sind. Im Folgenden wird ein Modell vorgestellt, das erklärt, wie ein erhöhter Grad an Vesikel-Fission den Phänotyp hervorrufen kann.

Das endozytierte Material wird im Verlauf des endozytotischen Transits durch die Aktivität verschiedener Verdauungs-Enzyme zerlegt. Das saure Milieu, das hierfür benötigt wird, wird durch die Aktivität der vakuolären Protonenpumpe, die sich in der Endosomen-Membran befindet, erzeugt und aufrechterhalten. Diese Enzyme, und auch die Protonenpumpe werden anschließend in Form von kleinen „Recycling“-Vesikeln vom Endosom entfernt. Wenn nun die Endosomen einer verstärkten Fission dieser

„Recycling“-Vesikel unterliegen, so würde das Volumen der späten Endosomen nicht beeinflussen. Da die Endosomen eine kleinere Oberflächen/Volumen-Ratio haben, als die Vesikel, die abgeschnürt werden, ändert sich durch „Recycling“-Vorgänge das Volumen der Endosomen nur geringfügig. Die Protonenpumpe, die mit der Membran von den Endosomen abgeschnürt wird, kann nun keine Protonen mehr in das Lumen der Endosomen pumpen; der pH-Wert steigt. In den Doppelmutanten wird nur noch ein pH-Wert von 6,6 gemessen, wohingegen der des Ausgangstammes ( $vacB^-$ ) bei 6,4 liegt.

Diese Annahme wird durch die Befunde aus den Versuchen mit „Lucifer Yellow“ gestützt (Abb. 11). Das kleine Molekül „Lucifer Yellow“ wird in den Doppelmutanten besser recycelt als in  $vacB^-$ -Zellen. TRITC-Dextran hingegen ist zu groß, um recycelt zu werden.

Enzyme wie die saure Phosphatase und die  $\alpha$ -Mannosidase verhalten sich in diesem Modell wie TRITC-Dextran. Beide werden im Wildtyp unterschiedlich stark in den Zellen zurückgehalten. In Vacuolin B Null Zellen und den Doppelmutanten werden beide Enzyme im Vergleich zu Wildtyp-Zellen stärker in den Zellen zurückgehalten (Abb. 10A und B). Die Menge der Enzyme in den Zellen ist in  $vacB^-$  und  $vacB^-/fcsA^-$ -Zellen jedoch gleich. Somit kann eine erhöhte Fission kleiner Vesikel die Enzym-Menge innerhalb der Endosomen nicht ändern.

Die Exozytoseraten von Vacuolin Null-Zellen und den Doppelmutanten sind ebenfalls gleich. Dieser Befund entspricht dem Sekretionsverhalten der lysosomalen Enzyme, die an das Medium abgegeben werden. Es befinden sich gleiche Mengen an TRITC-Dextran in den Zellen, da dieses Molekül unabhängig von Recycling-Vorgängen in der Zelle transportiert wird.

Um den Grad der Vesikel-Fission zu erhöhen, muss der Charakter der Endosomen-Membran verändert sein. Die Membran muss entweder selbst die Eigenschaft erworben haben, besser Vesikel abschnüren zu können, oder aber Proteine wie z.B. Myosin Ib (92) oder Rab7 (9) können nun besser an sie binden und begünstigen so die Fission von Vesikeln.

Für die Doppelmutanten konnte eine Reduktion der Triglycerid-Menge detektiert werden (Abb. 12). Für diese Zellen gilt dieselbe Annahme wie für den LC-FACS1 „Knock-Out“-Stamm: das Fehlen des Enzyms, welches Fettsäuren an der Endosomen-Membran aktiviert, führt zu einer Reduktion des Acyl-CoA Anteils des Fettsäure-Pools. Wie bereits unter 3.4 erwähnt, haben Acyl-CoAs eine Vielzahl an Funktionen in der Zelle. Neben der Notwendigkeit für Fusions- und Fissions-Prozesse werden sie auch in Membran-Lipide eingebaut. Welcher Mechanismus im Detail für die Verbesserung des endozytotischen Transits in den Doppelmutanten zum Tragen kommt, kann an dieser Stelle nicht geklärt werden. Eine Lipid-Analyse der Endosomen-Membranen könnte Hinweise dafür liefern, dass die Zusammensetzung der Membran direkt für den Phänotyp verantwortlich ist.

In dieser Arbeit wurde versucht mit chemischen Methoden die verschiedenen Fettsäuren und Lipid-Klassen voneinander zu trennen. Die modernere, jedoch teurere Methode der Massenspektrometrie kann sowohl die Länge der Fettsäuren, als auch die Identität der Kopfgruppen von Lipiden bestimmen. Auch die Anzahl von Doppelbindungen in einer Acyl-Kette kann bestimmt werden. Würden die hier vorgestellten Mutanten mit Hilfe dieser Methode analysiert, könnten sicherlich weitere Daten den Zusammenhang zwischen Fettsäure-Derivaten und der Phagozytoserate bzw. dem endozytotischen Transit belegen.

### 3.6 Schlussfolgerung

Die Korrelation der Daten gibt einen Hinweis darauf, dass Fusions- und/oder Fissions-Prozesse durch die Zusammensetzung des Fettsäure-Pools gesteuert werden können. Dabei gibt es verschiedene Möglichkeiten die Zusammensetzung des Fettsäure-Pools zu manipulieren.

Schaltet man die LC-FACS1 aus, so wird der Acyl-CoA-Pool reduziert, was in einer Reduktion der Triglycerid-Menge sichtbar wird (Abb. 12). Diese Manipulation des Fettsäure-Pools hat eine Veränderung der Membran-Dynamik zur Folge. Es handelt sich hierbei um einen subtilen Defekt, der nur in Verbindung mit einer weiteren Mutation auftritt. Nur in *vacB<sup>-</sup>/fcsA<sup>-</sup>*-Zellen kann eine Veränderung der Membran-Dynamik beobachtet werden. In *fcsA<sup>-</sup>*-Zellen ist dieser Defekt nicht detektierbar.

Anders als die Defekte in *fcsA<sup>-</sup>*-Zellen wirkt sich das Ausschalten der LC-FACS2 direkt auf das Energie-Niveau der Zellen aus. Messbar wird dies in einer Reduktion der Phagozytoserate (Abb. 34). Erst unter Berücksichtigung der Wachstumsbedingungen wird der indirekte Einfluss der LC-FACS2 auf den Energie-Haushalt der Zelle erkennbar (Tabelle 3). Die Zelle misst ihren Energie-Status über die Konzentration der freien, unaktivierten Fettsäuren.

Beide, bisher bekannten LC-FACS-Proteine in *Dictyostelium* beliefern somit einen zytoplasmatischen Pool von Acyl-CoAs. Das Substrat der LC-FACS1 liegt jedoch innerhalb der Endosomen; das der LC-FACS2 hingegen liegt im zytoplasmatischen Fettsäure-Pool.

Wenn man den Weg bestimmter Fettsäuren in der Zelle zeitlich auflösen könnte, würde dies viel zum Verständnis des Lipid-Stoffwechsels beitragen. So könnte differenziert werden, zu welchem Zeitpunkt bestimmte Fettsäuren das Substrat der LC-FACS-Proteine bilden. Kuerschner et al. haben hierfür neue Chemikalien entworfen, die sich, im Gegensatz zu vielen anderen synthetischen Fettsäure- oder Lipid-Analoga, wie Lipide verhalten und selbst fluoreszieren (41). Diese Polyen-Lipide stellen ein neues Werkzeug dar, mit dessen Hilfe man den Lipid-Metabolismus vielleicht sogar zeitlich auflösen kann.

## 4 Material

### 4.1 Geräte

Autoklav	Zirbus, Bad Grund
Binokular	Zeiss, Göttingen
Blot-Kammern	MPI Martinsried
Cell Cracker	EMBL, Heidelberg
Coulter Counter ZM	Coulter Electronics, Krefeld
Elektrophorese-Kammern	MPI Martinsried; PeqLab Erlangen
Fluorimeter SFM 25	Kontron Instruments, Neufahr
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
Kühlschränke (4°C)	Liebherr, Ochsenhausen
Küvetten (Quarz)	Hellma, Mühlheim
Magnetrührer mit Heizplatte	IKA, Staufen im Breisgau
Scintillations-Counter	Wallac, Finnland
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
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
Vacuboy	Eppendorf, Hamburg
Vortex Genie	Integra Bioscience, Fernwald
Waagen	Bender & Hohbein AG, Schweiz
Wasserbad	Sartorius, Göttingen
	B. Braun, Melsungen
Zentrifugen	
-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	Beckman, Krefeld

## 4.2 Verbrauchsmaterial

Costar-Platten (24-Loch)	Sarstedt, Nümbrecht
Deckgläschen (Ø 18 mm)	Assistent
Deckgläschen (50 mm x 50 mm)	Assistent
Dünnschichtchr.-Platten	Macherey & Nagel, Düren
Indikatorstäbchen	Macherey & Nagel, Düren
2 ml Plastik-Küvetten	Greiner Labortechnik
Einmalhandschuhe	
-Nitril	Ansell, Belgien
-Latex	Servoprax GmbH, Wesel



Einwegtücher	Kimberly-Clark, England
Einwegspritzen	B. Braun, Melsungen
Elektroporations-Küvetten	PeqLab, Erlangen
Falcon-Röhrchen (15 ml; 50 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Filterpapier 3MM	Whatman, Göttingen
Injektionsnadeln	B.Braun AG, Melsungen
Objektträger	Mentzelgläser
Parafilm M	American National Can, USA
Petrischalen (Ø 10 cm; Ø 5 cm)	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen	Gilson, Frankreich
Reaktionsgefäße (0,5 ml; 1,5ml, 2ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Sterilfilter (0,45µm)	Sarstedt, Nümbrecht
Skalpelle	C. Bruno Bayha GmbH, Tuttlingen
Transfermembranen	
-Nitrocellulose PROTRAN®	Schleicher & Schuell, Dassel

### 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
BSA	Sigma, Deisenhofen
Dimethylformamid (DMF)	Roth, Karlsruhe
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth, Karlsruhe
Dinatriumhydrogenphosphat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	Roth, Karlsruhe
Dithiotreit (DTT)	Roth, Karlsruhe
EDTA	Roth, Karlsruhe
EGTA	Roth, Karlsruhe
Essigsäure	Roth, Karlsruhe

---

Ethanol	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
Fischgelatine	Amersham Life Science, Freiburg
Formamid	Roth, Karlsruhe
Gelvatol Typ II	Sigma, Deisenhofen
Geneticin (G418) [100 mg/ml]	ICN, Eschwege
Glucose	Roth, Karlsruhe
Glycerin	Roth, Karlsruhe
Glycin	Roth, Karlsruhe
Guanidiniumthiocyanat	Roth, Karlsruhe
<sup>3</sup> H-Palmitinsäure	Hartmann Analytic, Braunschweig
Harnstoff	Roth, Karlsruhe
Hefe (getrocknet)	Sigma, Deisenhofen
Hefeextrakt	Oxoid, England
HEPES	Roth, Karlsruhe
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
Kaliumacetat (KAc)	Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid (KCl)	Roth, Karlsruhe
Kaliumhydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Roth, Karlsruhe
Kupfersulfat (CuSO <sub>4</sub> )	Roth, Karlsruhe
Lithiumchlorid (LiCl)	Roth, Karlsruhe
Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> )	Roth, Karlsruhe
Magnesiumsulfat (MgSO <sub>4</sub> )	Roth, Karlsruhe
β-Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe
Methanol	Roth, Karlsruhe
Milchpulver (blotting grade)	Roth, Karlsruhe
MOPS	Roth, Karlsruhe
Natriumacetat (NaAc)	Roth, Karlsruhe
Natriumcarbonat (NaCO <sub>3</sub> )	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid (NaCl)	Roth, Karlsruhe
Natriumcitrat	Roth, Karlsruhe
N-Laurylsarcosin	USB, USA
Natriumdihydrogenphosphat (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Roth, Karlsruhe
Dinatriumhydrogenphosphat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxidplättchen (NaOH)	Roth, Karlsruhe
NBT	Roth, Karlsruhe
NP-40	Calbiochem, La Jolle
Palmitinsäure	Sigma, Deisenhofen
Polyethylenglycol	Fluka, Buchs

Penicillin/Streptomycin [10.000 U/ml]	Gibco BRL, Eggenstein
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt
PCIA	Roth, Karlsruhe
PEG (Polyethylenglycol 4000)	Fluka, Deisenhofen
Pepton aus Casein	Merck, Darmstadt
Phosphorsäure (H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> )	Roth, Karlsruhe
PIPES	Roth, Karlsruhe
Pikrinsäure	Merck, Darmstadt
Phenylmethylsulfonylfluoride (PMSF)	Serva, Heidelberg
PNPP (p-Nitrophenylphosphat)	Roth, Karlsruhe
PNP $\alpha$ M (p-Nitrophenyl- $\alpha$ - D-mannopyranosid)	Sigma, Deisenhofen
Proteose-Pepton	Oxoid, England
QuickSafeA (Liquid Szintillator)	Zeisser Analytic, Frankfurt
Rotiphorese <sup>®</sup> Gel 30	Roth, Karlsruhe
Saccharose	Roth, Karlsruhe
Salzsäure (HCl)	Merck Darmstadt
SDS	Roth, Karlsruhe
Stickstoff (flüssig)	Messer Griesheim, Krefeld
TEMED	Roth, Karlsruhe
Tris	Roth, Karlsruhe
Trypanblau	Merck, Darmstadt
Tween <sup>®</sup> 20	Roth, Karlsruhe

#### 4.4 Puffer und Lösungen

Alle hier genannten Puffer und Lösungen wurden mit sterilem bidest. H<sub>2</sub>O angesetzt.

Soerensen-Phosphatpuffer (pH 6,0) (50)	2 mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
	15 mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
EP-Puffer	10 mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
	50 mM	Saccharose
	ad 1 l Bidest.; sterilfiltrieren	
DNA-Auftragspuffer	6 x DNA BlueRun <sup>™</sup> der Firma Fermentas	
Ethidiumbromid-Lösung	10 mg/10 ml Bidest.	

Lösung I (für Plasmid-Präparation)	50M	Tris-HCl, pH 8,0
	10 mM	EDTA
	100µg/ml	RNase A
Lösung II (für Plasmid-Präparation)	200 mM	NaOH
	1 % [w/v]	SDS
Lösung III (für Plasmid-Präparation)	3 M	Kaliumacetat
Kernlysepuffer	0,05 M	HEPES
	0,04 M	MgCl <sub>2</sub>
	0,2 M	KCl
	5 % [w/v]	Sucrose
	14 mM	β-Mercaptoethanol
Puffer 6.6.2	6 mM	Tris-HCl; pH, 7,4
	6 mM	NaCl
	0,2 mM	EDTA; pH, 7,2
LyB-Puffer	10 mM	Tris-HCl; pH 8,3
	50 mM	KCl
	2,5 mM	MgCl <sub>2</sub>
	0,45 %	NP40
	0,45 %	Tween
10 x PBS-Puffer (pH 7,4)	1370 mM	NaCl
	81 mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
	27 mM	KCl
	15 mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
PBS/ Glycin	100 mM	Glycin
	in 1 x PBS lösen	
PBG	0,5 % [w/v]	BSA
	0,045% [w/v]	Fischgelatine

2 x HBS	4,0 g	NaCl
	0,18 g	KCl
	0,05 g	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	2,5 g	HEPES
	0,5 g	Glucose
	pH 7,05 ad 250 ml Bidest, sterilfiltrieren,	
TfB I -Puffer	100 mM	KCl
	50 mM	RbCl <sub>2</sub>
	10 mM	CaCl <sub>2</sub>
	30 mM	Kaliumacetat
	15% [v/v]	Glycerin
	pH mit 0,2 M Essigsäure auf 5,8 einstellen, sterilfiltrieren	
TfB II -Puffer	10 mM	MOPS
	10 mM	RbCl
	15 % [v/v]	Glycerin
	pH mit NaOH auf 7,0 einstellen, sterilfiltrieren	
10 x SDS-Probenpuffer (pH 6,8)	0.2 M	Tris-HCl
	6,7 %	SDS
	28,9 % [v/v]	Glycerin
	16,7 % [v/v]	β-Mercaptoethanol
	10 mg/100 ml	Bromphenolblau
10 x Protein-Laufpuffer	0,25 M	Tris
	1,9 M	Glycin
	1 % [w/v]	SDS
SDS-Sammelgel-Puffer (pH 6,8) (4xTris-HCl/SDS-Puffer)	0,5 M	Tris
	0,4 % [w/v]	SDS
SDS-Trenngel-Puffer (pH 8,8) (4xTris-HCl/SDS)	1,5 M	Tris
	0,4 % [w/v]	SDS

Semidry-Transfer-Puffer (pH 8,2 -8,4)	48 mM	Tris
	39 mM	Glycin
	0,0375 % [w/v]	SDS
	20 % [v/v]	Methanol
Blockier-Lösung	5 % [w/v]	Milchpulver
	in 1 x PBS lösen, optional eine Spatelspitze $\text{NaN}_3$ zugeben	
Carbonat-Puffer (pH 10,5) (BCIP Substrat-Puffer)	100mM	$\text{Na}_2\text{CO}_3$
Coomassie-Färbelösung	20 ml $\text{H}_3\text{PO}_4$ (85%ig) in 600 ml Bidest.;	
	60 g $\text{NH}_4\text{Cl}$ in 250 ml Bidest.;	
	1 g Coomassie Brilliant Blue G250 in 20 ml Bidest.;	
	$\text{H}_3\text{PO}_4$ -Lsg. und Coomassie-Lsg. vereinigen und	
	$\text{NH}_4\text{Cl}$ -Lsg. unter ständigem Rühren langsam zugeben	
Trypanblau-Lösung	0,087 g	NaCl
	0,058 g	Citrat
	0,02 g	Trypanblau
	$\text{H}_2\text{O}$ ad 10 ml ; pH 4,4	
	durch Faltenfilter filtrieren, dann sterilfiltrieren	
1,5 x Homogenisations-Puffer	30 mM	Tris-HCl
	2 mM	DTT
	4 mM	EGTA
	2 mM	EDTA
	5 mM	Benzamidin
	30 %	Saccharose
	Zugabe von 1/100 Volumen 50 mM PMSF und 1/3 Soerensen Phosphatpuffer vor Gebrauch	

TKM-Puffer	50 mM	Tris-HCl; pH 7,6
	25 mM	MgCl <sub>2</sub>
	5 mM	MgCl <sub>2</sub>
	Durch die Zugabe von Saccharose entstehen die jeweiligen STKM Puffer	

Enzymtest-Puffer	37 mM NaAcetat; pH 5,0
	1 mM EDTA

#### 4.5 Medien

Sofern nicht anders angegeben, wurden alle Medien mit deionisiertem H<sub>2</sub>O angesetzt und bei 120°C autoklaviert; nach dem Abkühlen auf ca. 50°C wurden gegebenenfalls Antibiotika hinzugefügt. Die Lagerung erfolgte auf 4°C.

##### Escherichia coli Medien

LB-Medium (pH 7,0)	10 g	Bacto-Trypton
	5 g	Hefeextrakt
	5 g	NaCl
	H <sub>2</sub> O ad 1 l	
LB <sub>Amp</sub> -Medium	wie LB-Medium +50 µg/ml Ampicillin	
LB-Agar	wie LB-Medium +13 g Agar-Agar	
LB <sub>Amp</sub> -Agar	wie LB-Agar +50 µg/ml Ampicillin	
M9-Medium (Minimalmedium)	850 ml	H <sub>2</sub> O
	100 ml	10 x M9-Salze (s. u.)
	2 ml	1 M MgSO <sub>4</sub>
	10 ml	20 % [w/v] Glucose
	0,1 ml	1 M CaCl <sub>2</sub>
	1 ml	1 % [w/v] Thiamin

H<sub>2</sub>O ad 1 l. Alle Lösungen mit Ausnahmen von Glucose und Thiamin (stattdessen sterilfiltriert) zuvor autoklaviert.

Dictyostelium discoideum Medien

HL5-Medium (pH 6,7) (102)	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 <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	0,35 g	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ( x 2H <sub>2</sub> O)
	H <sub>2</sub> O ad 1 l	
G <sub>0</sub> -Medium	wie HL5-Medium + Penicillin/Streptomycin, auf eine Endkonzentration von [100 U/ml].	
G <sub>10</sub> -Medium	wie G <sub>0</sub> -Medium + Geneticin (G418), auf eine Endkonzentration von [10 µg/ml].	
B <sub>10</sub> -Medium	wie G <sub>0</sub> -Medium + Blastocidin S, auf eine Endkonzentration von [10 µg/ml].	
G10/B10-Medium	wie G <sub>0</sub> -Medium + Geneticin (G418) und Blastocidin S, jeweils auf eine Endkonzentration von [10 µg/ml].	
SM-Agarplatten (pH 6,5)	15 g	Bacto-Agar
	10 g	Pepton
	10 g	Glucose
	1 g	Hefe-Extrakt
	1 g	MgSO <sub>4</sub> ( x 7 H <sub>2</sub> O)
	2,2 g	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	1 g	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
	H <sub>2</sub> O ad 1 l	
KA-Platten	mit Klebsiella aerogenes bewachsene SM-Platte; die Platten werden nach ausplattieren von KA-Suspension bei 30°C ü.N. inkubiert.	



Phosphatagar-Platten (pH 6,0) 15 g Bacto-Agar mit Soerensen-Phosphatpuffer auf 1 l auffüllen.

MES-HI-5-Medium (pH 7,2) 5,0 g Hefeextrakt  
10,0 g Glucose  
10,0 g Proteose-Pepton  
1,32 g MOPS  
H<sub>2</sub>O ad 1 l

#### 4.6 Enzyme und Kits

Restriktionsenzyme und Reaktionspuffer	Hybaid, Freiburg und jeweilige MBI Fermentas, St. Leon-Rot
RNase A	Roth, Karlsruhe
Proteinase K	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
SAP (Shrimp alkaline Phosphatase)	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
T4-DNA Ligase	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Taq-DNA-Polymerase	MBI Fermentas, St. Leon-Rot und Abt. Genetik, Uni Kassel
QIAGEN Plasmid Midi Kit (100)	Qiagen, Hamburg
Invitrogen Plamid Midi Kit	Invitrogen, Karlsruhe
BCA Protein Assay Kit	Pierce, Rockford USA
Roti-Quant	Roth, Karlsruhe
PCR Aufreinigungs-Kit Charge Switch	Invitrogen, Karlsruhe
Neutral-Lipid-Kit	Lehmann, Berlin
Längen- und Größenstandards	
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

## 4.7 Plasmide

Plasmid	Beschreibung	Zweck
# 354	cDNA Klon des fcsB Gens, ohne die ersten 51 bp, Herkunft Dictyostelium cDNA Project Japan	
# 362	Insert: Polylinker aus pIC20H (#25) mit Hind III Vector: pDexRH (#1) mit Hind III	Herstellung eines Expressions-Vektors für Dictyostelium mit großem Polylinker
# 365	Insert: 3' Bereich der fcsB cDNA aus #354 mit EcoRV und Xho I Vector: pIC19H (20) mit EcoRV und Xho I	1. Schritt in der Herstellung eines Volllänge LCFACS II Konstruktes
# 367	Insert: PCR an genom. wt DNA, Primer #79 & #81 mit Bam HI und EcoRV Vector: #365 mit Bam HI und EcoRV	letzter Schritt in der Herstellung eines Volllänge LCFACS II Konstruktes
# 368	Insert: myc-Epitop aus pICmyc (85) mit Ecl136II und Hinc II Vector: #367 mit Eco RV	1.Schritt in der Herstellung eines LCFACS II myc Konstruktes
# 372	Insert: fcsB aus #368 mit Hinc II und Ecl 136 II Vector: pDex RH (#1) mit EcoRI (blunt mit Klenow Fragm.)	Letzter Schritt in der Herstellung eines LCFACS II myc Konstr. (Expressions-Vektor)
# 392	Insert: Bs <sup>r</sup> -Kassette aus pUCBsr (#42) mit Sma I und Nsi I Vector: #367 mit EcoRV und Nsi I	Herstellung eines fcsB „Knock-Outs“
# 427	Insert: fcsB aus #368 mit Hinc II und Ecl 136 II Vector: #362 mit Hinc II	Herstellung eines unmarkierten LCFACS II Konstruktes (Expressions-Vektor)
# 429	cDNA Klon des 5' Bereichs des fcsC Gens; Herkunft Dictyostelium cDNA Project Japan	
# 431	cDNA Klon des lsd2 Gens; Herkunft Dictyostelium cDNA Project Japan	
# 432	Insert: PCR an Vector #429 mit Primern #97 & #168 blunt (Pfu-Polymerase) Vector: A15GFP w/o ATG (84) mit Bam HI blunt mit T4 Pol	GFP-Konstrukt des 5' Bereichs der LCFACS III (Expressions-Vektor)
# 433	Insert: PCR an Vector #367 mit Primern #79 & #136 blunt (Pfu-Polymerase) Vector: #362 mit Hinc II	Herstellung eines Konstruktes LCFACS II myc, dem die letzten 4 aa fehlen. (Expressions-Vektor)
# 434	Insert: Bs <sup>r</sup> aus pBsr (#361) mit BamHI Vector: # 429 (in dam <sup>-</sup> transformiert) mit Bcl I (dam methyliert)	Herstellung eines fcsC „Knock-Outs“
# 435	cDNA Klon des 3' Bereichs des fcsC Gens; Herkunft Dictyostelium cDNA Project Japan	

Plasmid	Beschreibung	Zweck
# 437	Insert: PCR an #367 mit Primern #79 & #80 mit Bam HI Vector: A15GFP w/o ATG (84) mit Bam HI	LCFACS II-GFP Konstrukt, (schlechte Expression) (Expressions-Vektor)
# 438	Insert: PCR an #431 mit Primern #159 & #160 mit Bam HI und Sal I Vector: pDNeo II-GFP mit Bam HI und Sal I	GFP-LSD2 Konstrukt (Expressions-Vektor)
# 439	Insert: 3' Bereich von fcsC aus #435 mit Eco RI und Xho I Vektor: pDNeo II-GFP mit Eco RI und Xho I	GFP-Konstrukt des 3' Bereichs der LCFACS III (Expressions-Vektor)
# 466	Insert: 3' Bereich der LCFACS III aus #435 mit Xba I und Cla I (partiell) Vector: #429 mit Xba I und Cla I	Herstellung eines Volllänge Konstruktes LCFACS III
# 467	Insert: PCR an Vector #354 mit Primern # 89 & #80 mit Bam HI und Xho I blunt mit Klenow Fragment Vector: pDdA15GFP (#14) Mit Bam HI und Bgl II blunt mit Klenow Fragment	Herstellung eines Konstruktes LCFACS II-GFP ohne ER Leader (Expressions-Vektor)
# 468	Insert: Leader aus #436 mit Pst I Vector: pDNeo II mit Pst I	1.Schritt zu einem Konstrukt, durch das der Leader der LCFACS II GFP in das ER leitet
# 469	Insert: PCR an Vector #68 mit Primern #169 & #170 mit Bam H I und Sal I Vector: #468 mit Bam H I	Konstrukt, durch das der Leader der LCFACS II GFP in das ER leitet
# 470	Insert: PCR an Vector #68 mit Primern #182 & #80 mit Bam H I Vector: A15GFP w/o ATG (84) mit Bam H I	AAA-LCFACS II-GFP Konstrukt (Expressions-Vektor)
# 471	Insert: #364 verdaut mit Xho I Vector: pB15 (# 151) mit Xho I	Herstellung eines Konstruktes LCFACS II myc ohne Leader (Expressions-Vektor)
# 472	Insert: PCR an Vector #368 mit Primern #182 & #184 ungeschnitten Vector: pDexMCS (#362) mit Hinc II	Herstellung eines Konstruktes AAA-LCFACS II myc (Expressions-Vektor)
# 473	Insert: PCR an Vector #436 mit Primern #182 & #9 ungeschnitten Vector: pDexMCS (#362) mit Hinc II	Herstellung eines Konstruktes LCFACS I-GFP mit Leader der LCFACS II (Expressions-Vektor)

## 4.8 Oligonukleotide

### LCFACS II:

# 79: LCFACS II 5' Bam HI

TAGGATCCATGATAAACAATTGGTTAGCAGTTGG

# 80: LCFACS II 3' Bam HI

GCGGATCCATCAAGTTTTGAATATAATTTTTTAATTCATCC

# 81: LCFACS II Mitte 3'

GATCGTATGTATATAATGTTACACC

# 84: LCFACS II genomisch 5'

TAAATAACTAAAAGTAACTTTAATTCG

# 89: LCFACS II Seq

CGTTACAGATCCAAGCTCTGAAAAACC

# 136: LCFACS II 3' minus SKLD

GTCCTCGAGATCTTAATATAATTTTTTAATTCATCC

# 169: GFP 5' Bam HI

GAGGGATCCGAAAATGAGTAAAGGAGAAGAAC

# 170: 3' GFP KDEL

GCGTCGACTTATAATTCATCTTACCACCTTGTATAGTTCATCCATGCC

#182: LCFACS II 5' Bam

TAGGATCCAAAATGATAAACAATTGGTTAGCAGTTGG

#183: LCAFACS II 3' Δ SKLD

GTCCTCGAGATCTTAATATAATTTTTTAATTCATC

#184: LCFACS II 3' NEU

GCGGATCCTTAATCAAGTTTTGAATATAATTTTTTAATTCATCC

### LCFACS III

# 97: LCFACS III GEN Sal

CGGTGACGAAATGTAAAACATATTAATAATTTTTTAAGTAG

# 98: LCFACS III 3' GEN Bam

AGGGATCCACAACTATACATTTTGATTCCGG

# 118: LCFACS III Mitte 3' Bam HI

GCGGATCCCTTAACCTTGTTGAATTTTATCAATTATATC

# 119: LCFACS III 3' Stop BglII

CGTAGATCTTTATTTATTAATTGTTTGAATTAAATTATTTGAG

# 161: LCFACS III 5' Mitte NEU Sal

GTCGTCGACCCTAAATCATTTCGATAAAAAATTAATAAAAAATTGGCAG

# 162: 3' LCFACS III Bam

GTCGTCGACCCTAAATCATTTCGATAAAAAATTAATAAAAAATTGGCAG

# 168: LCFACS III Mitte 3' NEU

GCGGATCCCTTAACCTTGTTGAATTTTATCAATTATATC

#### LSD

# 159: LSD 5' Sal

CGTGTCGACATGTCATCTCAAGAACAACAAAATCAAAGC

# 160: LSD 3' Bam

CGTGGATCCATCTAATTGGTTGAGTTATCATTTGAAGATGAAG

## 4.9 Antikörper

Monoklonale Primär-Antikörper

Die monoklonalen Antikörper sind in Kulturüberständen der entsprechenden Hybridomazellen enthalten.

$\alpha$ LC-FACS1	mAK 221-457-5	(99)
$\alpha$ -Aktin	mAK Act-1-11	(83)
$\alpha$ Coronin (C-terminal)	mAK 176-3D-6	(53)
$\alpha$ VacA/B (pref. N-Term.)	mAK 263-79-2	(103)
$\alpha$ VacB (pref.)	mAK 264-285-2	Maniak, persönl. Mitteilung
$\alpha$ -myc	mAK 9 E 10	(59)
$\alpha$ -PDI	mAK 221-135-1	(57)
$\alpha$ -Porin	mAK 70-100-1	(94)

$\alpha$ -Protonenpumpe	mAK 221-35-2	(63)
$\alpha$ -GFP	mAK 264-449-2	erhältlich bei Chemicon, USA
Polyklonaler Primär-Antikörper		
$\alpha$ -myc		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-Kaninchen IgG		
konjugiert mit CY3		Dianova, Hamburg
Ziege-anti-Maus IgG		
konjugiert mit Oregon Green		Molecular Probes, Leiden NL

#### 4.10 Fluoreszierende Reagenzien

DAPI (4,6-Diamidino-2-phenylindol), Nukleinsäurefarbstoff; Sigma, Deisenhofen  
 Absorption<sub>max</sub> 358 nm, Emission<sub>max</sub> 461 nm

TRITC (Tetramethylrhodamin Isothiocyanat); Sigma Deisenhofen  
 Absorption<sub>max</sub> 544 nm; Emission<sub>max</sub> 574 nm

TRITC-Dextran (Tetramethylrhodamin Isothiocyanat-Dextran); Sigma, Deisenhofen  
 Absorption<sub>max</sub> 544 nm; Emission<sub>max</sub> 574 nm

FITC-Dextran(Flourescein Isothiocynat-Dextran); Sigma, Deisenhofen  
 Absorption<sub>max</sub> 480 nm; Emission<sub>max</sub> 520 nm

FITC-Dextran( Flourescein Isothiocynat); Sigma, Deisenhofen  
 Absorption<sub>max</sub> 480 nm; Emission<sub>max</sub> 520 nm

Lucifer Yellow; Fluka, Buchs  
 Absorption<sub>max</sub> 455 nm; Emission<sub>max</sub> 535 nm

Oregon Green-Phalloidin; Molecular Probes, Leiden NL

Absorption<sub>max</sub> 496 nm; Emission<sub>max</sub> 520 nm

C<sub>1</sub>-Bodipy500/510C<sub>12</sub> (4,4-difluoro-5-methyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-3-indacene-3-dodecanoic acid); Molecular Probes, Leiden NL

Absorption<sub>max</sub> 480 nm; Emission<sub>max</sub> 520 nm

Nile Red; ICN, Eschwege

Absorption<sub>max</sub> 545 nm; Emission<sub>max</sub> 640 nm

#### 4.11 Biologische Stämme

Bakterien-Stämme: Escherichia coli JM105

Escherichia coli DH5 $\alpha$

Klebsiella aerogenes (KA)

Dictyostelium-Stämme: AX-2 (Watts & Ashworth, 1970)

REMI Mutante 3-18 (von Robin Williams)

#### 4.12 Verwendete Internet-Programme und Seiten

<http://www.peroxisome.org>

<http://dictybase.org>

[http://smart.embl-heidelberg.de/smart/change\\_mode.pl](http://smart.embl-heidelberg.de/smart/change_mode.pl)

<http://psort.hgc.jp/>

[http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED\\_form.html](http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html)

[http://www.ch.embnet.org/software/LALIGN\\_form.html](http://www.ch.embnet.org/software/LALIGN_form.html)

<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>

## 5 Methoden

Die Formulierung der Methoden wurde z.T. aus meiner Diplomarbeit übernommen.

### 5.1 Molekularbiologische Methoden

#### 5.1.1 Präparation von Nukleinsäuren

##### Plasmid-DNA Mini-Präparation aus E. coli (3)

1,5 ml LB<sub>Amp</sub>-Medium werden mit einer Kolonie des entsprechenden E. coli Stammes angeimpft und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wird diese Kultur 3 Minuten bei 3000 rpm zentrifugiert, und die Zellen in 200 µl Lösung I resuspendiert. Durch Zugabe von 200 µl Lösung II, vorsichtigem Mischen und Inkubation für 5 Minuten bei RT lysieren die Zellen. Die nun frei gewordenen Proteine, sowie die genomische DNA werden durch Hinzufügen von 200 µl Lösung III und einer 5 minütigen Inkubation auf Eis gefällt.

Es folgt eine Zentrifugation für 10 Minuten bei 13.400 rpm in einer Heraeus-Tischzentrifuge, wobei die Proteine und die genomische DNA sedimentieren und die Plasmid DNA im Überstand bleibt. Dieser Überstand wird nun in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und mit 0,7 Vol. 100%igem Isopropanol gefällt. Nach einer 20 minütigen Zentrifugation bei 13.400 rpm, bei der die Plasmid-DNA präzipitiert, wird das Pellet mit 70%igem Ethanol gewaschen. Die getrocknete DNA wird anschließend in 20 µl Bdest. resuspendiert. Um eine höhere Reinheit der Plasmid-DNA zu erreichen kann der Isopropanol-Fällung eine PCIA-Extraktion vorangestellt werden.

##### Plasmid-DNA Midi-Präparation aus E. coli

30 ml LB<sub>Amp</sub> Medium werden mit einer Kolonie des entsprechenden E. coli Stammes beimpft und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wird die Plasmid-DNA mit dem QIAGEN Plasmid Midi-Kit der Firma Qiagen aufgereinigt. Die Präparation erfolgt nach Herstellervorschrift unter Benutzung der mitgelieferten Lösungen über eine Anionenaustauscher-Säule.

Mit dieser Methode können bis zu 100 µg Plasmid isoliert werden. Die Konzentration wird photometrisch bestimmt. Alternativ wurde auch der PureLink HiPure Plasmid DNA Midi-Purification Kit der Firma Invitrogen benutzt. Auch hier wurde nach Herstellerangaben mit den mitgelieferten Puffern gearbeitet.



### Isolation chromosomaler DNA aus Dictyostelium discoideum

Für die „Polymerase Chain Reaction“ (PCR, s. 4.1.5.3), in der nur wenig DNA eingesetzt wird, wurde diese Präparation durchgeführt. Hierzu wird eine 10 ml Petrischale, die dicht mit Dictyostelium-Zellen bewachsen ist, mit Soerensen-Phosphatpuffer abgespült und 3 Minuten bei 1200 rpm in der Kälte geerntet. Das Pellet wird in 1 ml Kernlyse-Puffer resuspendiert und einige Minuten auf Eis inkubiert. Durch die Zugabe von 60 µl 20%iger NP-40-Lösung, lysieren die Zellen. Die Kerne bleiben hierbei intakt und werden für 8 Minuten bei 4.000 rpm und 4 °C pelletiert. Anschließend wird der Überstand vollständig entfernt und das Pellet mit 1 ml Kernlysepuffer gewaschen. Das Pellet wird nun in 200 µl Puffer 6.6.2 resuspendiert. Nach der Zugabe von 7 µl 10%iger SDS-Lösung und 15 µl Proteinase K wird die Lösung für 2 Stunden (alternativ auch ü.N.) bei 65 °C inkubiert.

Zwei Extraktionen mit je 1 Vol. Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol scheiden einen grossteil der Proteine ab. Der klare Überstand wird dann mit 0,7 Vol. Isopropanol gefällt und die DNA mit 70 %igem Ethanol gewaschen. Das getrocknete DNA-Pellet wird schließlich in 200 µl Puffer 6.6.2 aufgenommen und Konzentration und Reinheit photometrisch bei 260 und 280 nm bestimmt.

### Mini-Präparation chromosomaler DNA aus Dictyostelium discoideum (11)

Diese Methode wurde verwendet, um genomische DNA von Dictyostelium-Klone auf „24 Multi-Well-Platten“ zu isolieren. Hierzu werden die Zellen in einem Well mit 1 ml Medium abgespült und für 3 min bei 2000 rpm in einer Heraeus Tischzentrifuge zentrifugiert. Das Pellet wird in 200 µl Soerensen-Phosphatpuffer resuspendiert. Nach der Zugabe von 100 µl LyB-Puffer und 2 µl Proteinase K-Lösung wird die Suspension für 5 min bei RT inkubiert. Nachdem die Proteinase K 1 min bei 95 °C inaktiviert worden ist, können 5-10 µl der abgekühlten Lösung in eine PCR eingesetzt werden.

### 5.1.2 „Polymerase Chain Reaktion“ (PCR)

Mit der „Polymerase Chain Reaktion“ (78) ist es möglich, bestimmte DNA-Abschnitte so zu vervielfältigen, dass sie mit herkömmlichen Nachweismethoden detektierbar sind. Hierzu benötigt man u.a. Oligonukleotidprimer. Dies sind kurze, einzelsträngige DNA-Moleküle, die komplementär zu den Enden der zu amplifizierenden Sequenz einer doppelsträngigen DNA-Matrize sind. Zu Beginn der Reaktion wird die Matrizen-DNA auf 95 °C erhitzt, um die DNA zu denaturieren und die einzelnen Stränge zugänglich zu machen. Es schließt sich eine Phase geringer Temperaturbedingungen (abhängig von der Zusammensetzung der Primer) an, in der sich die Primer an die zu amplifizierenden Stränge anlagern (annealing). Es folgt eine Temperaturphase bei 72 °C, die optimale Bedingungen für die Funktion der Taq-Polymerase (12) aus dem thermophilen Bakterium

*Thermophilus aquaticus*, Oligonukleotide an freien 3'-OH-Enden an einer komplementären Matrize unter Verwendung von dNTPs zu elongieren, schafft.

Diese Methode wurde verwendet, um zu zeigen, dass ein gewünschtes Fragment über homologe Rekombination in das Genom von *Dictyostelium* inseriert wurde.

Standard-Reaktionsansatz:

- x µl Matrizen-DNA
- 2 µl 5' Primer (10 pM)
- 2 µl 3' Primer (10 pM)
- 2 µl 10 x PCR-Puffer (ohne MgCl<sub>2</sub>)
- 2 µl dNTPs
- 2 µl MgCl<sub>2</sub>
- 0,5 µl Taq-Polymerase
- ad 20 µl H<sub>2</sub>O

Das nachfolgend beschriebene PCR-Programm stellt lediglich ein Standard-Programm dar, das bezüglich Temperatur und Dauer der einzelnen Schritte nach jeweiligen Anforderungen, wie Primerkombination oder der Länge des zu amplifizierenden Fragments, modifiziert werden kann. Bei der Wahl der Elongationszeit ist auch die Leistung der verwendeten Polymerase zu berücksichtigen.

Standard-PCR-Programm:

1 x	Schritt 1	3 min, 95 °C	Initialdenat.
1 x	Schritt 2	30 s, 50 °C	Annealing
1 x	Schritt 3	30 s 72 °C	Elongation
30 x	Schritt 4	30 s, 95 °C	Denaturierung
		40 s, 50 °C	Annealing
		30 s, 72 °C	Elongation
1 x	Schritt 5	5 min, 72 °C	finale Elongation
			Kühlen auf 4°C

Für die Taq-Polymerase gilt, dass sie ca. 1 kb pro Minute synthetisiert. Für Proof-Reading-Polymerasen hingegen gelten meist längere Elongationszeiten. Eine Ausnahme stellt das Enzym „Phusion“ der Firma Finnzymes dar. Sie kann 1 kb innerhalb 15-30 Sekunden synthetisieren. Für dieses Enzym wurde sowohl der Reaktions-Ansatz, als auch das PCR-Programm nach Herstellerangaben gewählt.

### 5.1.3 DNA-Spaltung durch Restriktionsendonukleasen

Die Spaltung 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 sonst das in der Enzymlösung enthaltene Glycerin störend auswirkt. Mit Bidest. wird auf das gewünschte Volumen aufgefüllt. Plasmid-DNA wird 1-2 h, chromosomale DNA 3-16 h verdaut und die Vollständigkeit der Reaktion durch Agarose-Gelelektrophorese kontrolliert.

#### 5.1.4 Klonierung eines DNA-Fragmentes

Am Beginn einer Klonierung steht der Verdau eines Vektors und eines Inserts mit Restriktionsenzymen. Bei einem Insert kann es sich sowohl um einen bestimmten Teil eines Vektors handeln, als auch um ein PCR-Produkt. Handelt es sich um ein PCR-Produkt, muss dieses vor dem Restriktionsverdau von Primern, dNTPs u.ä. befreit werden. Dazu existieren unterschiedliche Methoden. Zum einen wurde das PCR-Produkt mit 2 Vol. Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol extrahiert und anschließend einer Ethanol-Fällung unterzogen. Alternativ wurde das PCR-Produkt mit Säulen der Firmen Qiagen oder Macherey & Nagel aufgereinigt. Eine dritte Methode basiert auf der Bindung von DNA an magnetische Beads (Firma Invitrogen). Im Falle der Aufreinigung an Säulen bzw. magnetischen Beads wurde nach Herstellerangaben aufgereinigt.

Der Verdau geschieht für mehrere Stunden oder auch über Nacht. Wird Plasmid-DNA mit Restriktionsenzymen gespalten, verbleiben an den 3'-Enden die Phosphatgruppen. Will man eine Religation dieser Enden vermeiden, muss der Phosphatrest entfernt werden. Hierzu wird die „Shrimp-Alkaline-Phosphatase“ (SAP) verwendet. Da dieses Enzym in den meisten der verwendeten Reaktionspuffer für die Restriktionsenzyme aktiv ist, wird 1 U im Anschluss an den Restriktionsverdau des Vektors zu dem Ansatz gegeben und für 30 min bei 37°C inkubiert. Nun werden die Fragmente gelelektrophoretisch aufgetrennt und aufgereinigt.

#### 5.1.5 Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten

Bei einer dieser Methode, ist die Konzentration der Gele von der Größe der zu trennenden Fragmente abhängig und variiert zwischen 0,8 und 1,2 % Agarose. Es gilt: je größer die Fragmente sind, desto niedriger wird die Konzentration der Agarose gewählt. Die Agarose wird in 1 x TBE-Puffer gegeben und durch Aufkochen gelöst. Damit die DNA-Fragmente sichtbar werden, fügt man der Agarose-Lösung Ethidiumbromid zu, das in die DNA interkaliert und durch die Anregung mit UV-Licht (366 nm) fluoresziert. Sobald die Agarose etwas abgekühlt ist (ca. 50 °C), wird sie in eine zuvor abgedichtete Gelkammer mit einem Probenkamm gegossen. Nachdem die Agarose ausgehärtet ist, wird der Probenkamm vorsichtig entfernt und die Kammer mit 1 x TBE-Puffer aufgefüllt. Die

Proben, die zuvor mit DNA-Auftragspuffer versehen worden sind, können nun in die Probenaschen pipettiert werden. Damit eine Größenabschätzung möglich ist, wird immer ein Größenstandard mit aufgetragen.

Die Spannung, die angelegt wird, richtet sich nach der Länge des Gels (10 V/ cm Gel). Die Dokumentation findet im GelDoc II statt.

#### 5.1.6 DNA-Isolierung aus Agarosegelen

Bestimmte DNA-Fragmente, die durch die Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt worden sind, können z.B. für Klonierungen aus Agarosegelen isoliert werden. Hierzu wird das entsprechende Fragment unter UV-Licht aus dem Gel herausgeschnitten und in das obere Gefäß einer Konstruktion aus zwei 1,5 ml Reaktionsgefäßen gegeben. Das obere Reaktionsgefäß ist mit Whatman-Papier 3MM ausgekleidet und hat ein kleines Loch im Boden. Das untere Reaktionsgefäß dient als Auffanggefäß. Die Konstruktion wird dann für 30 Sekunden bei 14.000 rpm zentrifugiert, wobei die wässrige DNA-Lösung durch das Loch im oberen Reaktionsgefäß in das untere fließen kann, die Agarose jedoch im Papier verweilt. Die DNA-Lösung wird dann einer PCIA-Extraktion mit anschließender Ethanolfällung unterzogen. und in einem angemessenen Volumen Bidest. aufgenommen. Alternativ wird die DNA-Lösung mit magnetischen Beads der Firma Invitrogen nach Herstellerangaben aufgereinigt. Die so aufgereinigten Fragmente müssen nun miteinander verbunden werden.

#### 5.1.7 Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligase-Reaktion dient der Verknüpfung zweier DNA-Fragmente. Hierbei verknüpft die T4-DNA-Ligase, die ATP als Coenzym und Energiequelle benötigt, die beiden Fragmente kovalent miteinander.

Da aus energetischen Gründen die Re-Ligation eines Vektors begünstigt ist, wird das Insert in 2-4fachem Überschuss zugegeben.

Reaktionsansatz:    x µl Vektor  
                          y µl Insert  
                          2 µl 10 x Ligationspuffer  
                          1 µl T4-DNA-Ligase  
                          ad 20 µl H<sub>2</sub>O

Der Ansatz wird mindestens für 4 h bei RT inkubiert. Anschließend wird die Ligase bei 65°C für 10 min inaktiviert und der gesamte Ansatz in E. coli transformiert.

## 5.2 Transformationstechniken

### 5.2.1 Transformationstechniken für *E. coli*

Herstellung kompetenter Zellen mit der Mehr-Ionen-Technik (33)

5 ml M9-Medium werden mit einem entsprechenden *E. coli* Stamm angeimpft und über Nacht bei 37°C unter Schütteln (230 rpm) inkubiert. Ausgehend von dieser Kultur werden 100 ml LB-Medium beimpft und so lange bei 37°C unter Schütteln inkubiert, bis eine OD<sub>550</sub> von 0,3 bis 0,5 erreicht ist. Die Zellen werden auf Eis gekühlt, geerntet (4000 rpm, 5 min, 4°C, Hettich Rotanta/R) und in 15 ml eiskaltem Tfb I-Puffer resuspendiert. Nach einer 15 minütigen Inkubation auf Eis wird noch einmal unter den o.g. Bedingungen zentrifugiert. Das Zellpellet wird dann in 5 ml gekühltem Tfb II-Puffer aufgenommen und erneut 15 min auf Eis inkubiert. Anschließend können die Zellen für die Transformation eingesetzt oder bis zu ihrer Verwendung in Aliquots von 200 µl in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -70°C gelagert werden.

Transformation kompetenter Zellen

Je nach Qualität der kompetenten Zellen werden pro Transformation 100-200 µl Zellsuspension eingesetzt. Die Zellsuspension wird langsam auf Eis aufgetaut und mit 10-100 ng des zu transferierenden Plasmids bzw. einem vollständigen Ligationsansatz 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 vorgewärmtem LB-Medium zur Zellsuspension. Es schließt sich eine einstündige Inkubation auf 37°C unter leichtem Schütteln an. 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 inkubiert. Nach erfolgreicher Transformation sind am nächsten Tag deutlich anwachsende Kolonien sichtbar.

### 5.2.2 Transformationstechniken für *Dictyostelium discoideum*

Elektroporation (36)

*D. discoideum* Zellen werden axenisch auf eine Dichte von 1-2 x 10<sup>6</sup> Zellen/ml angezogen. Pro Elektroporations-Ansatz werden 2 x 10<sup>7</sup> Zellen benötigt. Entsprechende Volumina werden der Flüssigkultur entnommen, in ein Falcon-Röhrchen überführt und 10 min auf Eis gestellt. Die Zellen werden daraufhin durch zehnminütige Zentrifugation bei 1.200 rpm und 4°C geerntet und danach erst in vorgekühltem Soerensen-

Phosphatpuffer, dann zweimal mit eiskaltem EP-Puffer gewaschen (jeweils 1.200 rpm, 10 min, 4°C). Nach erneuter Zentrifugation werden die Zellen eines Ansatzes in 600 µl EP-Puffer aufgenommen, mit 10 µg DNA versetzt und in vorgekühlte Elektroporationsküvetten (Elektrodenabstand 4 mm) überführt. Diese werden verschlossen und samt Inhalt zehn Minuten 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 Elektroporations-Ansatz wird nur einmal gepulst. Danach werden die Küvetten erneut für 10 min auf Eis gestellt.

In der Zwischenzeit werden Petrischalen (Ø 10 cm) durch Zugabe von jeweils 8 µl 100 mM CaCl<sub>2</sub> und 8 µl 100 mM MgCl<sub>2</sub> (beide Lösungen sterilfiltriert) vorbereitet und die Zellen in diese überführt, so dass sie sich mit den Salzlösungen vermischen. Nach 15-minütiger Inkubation bei RT werden 10 ml G<sub>0</sub>-Medium zugegeben und die Zellen durch Schwenken verteilt. Am nächsten Tag erfolgt der Austausch des Mediums gegen das entsprechende Selektionsmedium.

Alle zwei bis drei Tage wird das Medium mit den toten Zellen abgenommen und erneuert. Nach spätestens 2 Wochen sind bei erfolgreicher Transformation deutlich sichtbare Klone angewachsen.

#### Klassische Transformation (61)

1 x 10<sup>7</sup> einer Kultur von *D. discoideum* mit einer Zelldichte von 1-2 x 10<sup>6</sup> Zellen/ml werden auf eine Petrischale (Ø 10 cm) überführt und für 45 min stehen gelassen, damit die Zellen auf der Plastikoberfläche absitzen. Das HL5-Medium wird nun vorsichtig entnommen und durch MES-HL-5-Medium ersetzt. Während die Zellen adaptieren, wird die DNA-Präzipitation vorbereitet.

Hierfür werden 12 µg des zu transferierenden Plasmids in 600 µl 1 x HBS-Puffer gelöst und in ein steriles 5 ml Glasröhrchen überführt. Dem Ansatz wurden 38 µl 2 M CaCl<sub>2</sub> zugegeben, kräftig gevortext und für 25 min bei RT gefällt.

Das MES-HI-5-Medium wird nun vorsichtig von der Platte entfernt und das vorbereitete DNA-Präzipitat tropfenweise zu den Zellen gegeben und durch vorsichtiges Schwenken der Platte gleichmäßig verteilt. Der Ansatz wird für 25 min ruhig stehen gelassen. Ohne die DNA vorher zu entfernen erfolgt nun erneut die Zugabe von 10 ml MES-HL-5-Medium, diesmal zusammen mit Ampicillin (Endkonzentration: 40 µg/ml). Es folgt eine Inkubation für 3 h bei RT. Danach wird das Medium vollständig abgenommen und durch 2 ml 18% [v/v] Glycerin in 1 x HBS-Puffer ersetzt. Dabei wird die Petrischale bei der Zugabe auf einer Seite leicht angehoben, so dass sich die Lösung langsam und gleichmäßig auf den Zellen verteilt. Nach 5-7 min wird die Glycerin-Lösung so vollständig

wie möglich abgenommen und durch 10 ml G<sub>0</sub>-Medium ersetzt. Am nächsten Tag wird das G<sub>0</sub>-Medium gegen ein entsprechendes Selektionsmedium ausgetauscht. Alle 2-3 Tage wird das Medium mit den toten Zellen abgenommen und erneuert.

Nach spätestens 2 Wochen sind bei erfolgreicher Transformation sichtbare Klone in der Petrischale angewachsen.

## 5.3 Zellbiologische Methoden

### 5.3.1 Anzucht in Flüssigmedium

Im Gegensatz zum Freilandisolat kann der Laborstamm Ax2, bedingt durch Mutationen (14), in axenischem Medium (HL5-Medium) kultiviert werden (102). Ax2 und Transformanden werden von Petrischalen, Sporen oder von *Klebsiella aerogenes* (KA) bewachsenen SM-Platten in HL5-Medium angeimpft. Die Zell- bzw. Sporenzahl sollte dabei nicht unter  $1 \times 10^4$  Zellen/ml liegen. Um Kulturen von *Klebsiella aerogenes* zu befreien, werden die *D. discoideum*-Zellen in Penicillin/Streptomycin-haltiges Medium (100 U/ml) überführt (G<sub>0</sub>). Für die Kultivierung von Transformanden werden dem Medium entsprechende Mengen des jeweiligen Selektionsantibiotikums zugesetzt. Die Anzucht von adhärenierenden Zellen erfolgt in „24-Multi-Well-Platten“ oder Petrischalen (Ø 5 bzw. 10 cm). Suspendierte Zellen werden in 30 ml Medium bei 150 rpm geschüttelt (Lab-Shaker). Bei 22°C beträgt die Generationszeit von Ax2 in Schüttelkultur etwa acht bis zehn Stunden. Für alle zellbiologischen Untersuchungen werden die Zellen maximal bis zu einer Dichte von  $5 \times 10^6$  Zellen/ml angezogen.

### 5.3.2 Subklonierung von Transformanden

Um Klone einzelner Transformanden in Reinkultur zu erhalten, werden die Zellen subkloniert. Hierzu wird eine, mit *Klebsiella aerogenes* (KA) bewachsene, SM-Platte mit 5 ml Soerensen-Phosphatpuffer ab gespült. Die KA-Suspension wird derart mit ab gespülten *Dictyostelium*-Zellen einer Transformationsplatte beimpft, dass die Konzentration ca. 100 Zellen/100 µl Suspension beträgt. Hiervon werden 100 µl auf eine vorgetrocknete SM-Platte ausplattiert und diese bei RT inkubiert (47). Da *Klebsiella aerogenes* eine wesentlich kürzere Generationszeit besitzen als *Dictyostelium* wird zunächst ein Bakterienrasen sichtbar. Nach 3 Tagen sind in den meisten Fällen bereits deutliche, durch *Dictyostelium* Zellen verursachte, Fresshöfe („Plaques“) im Bakterienrasen zu sehen. Vom Rand dieser Fresshöfe werden mit einem sterilen Zahnstocher vegetative Zellen entnommen und auf eine „24-Multi-Well-Platten“ mit entsprechendem Selektionsmedium überführt.

### 5.3.3 Sporengewinnung und Konservierung

Dicht gewachsene Zellen aus Flüssigkultur werden bei 800 x g für 3 min geerntet und ein- bis zweimal mit kaltem Soerensen-Phosphatpuffer gewaschen. Die Zellen werden in 1 ml Soerensen-Phosphatpuffer aufgenommen und auf eine Phosphat-Agarplatte ausplattiert. Die Platten werden bei 22°C inkubiert. Innerhalb von zwei Tagen entwickeln sich die Zellen und bilden Fruchtkörper. Die Sporen und Stiele werden entweder mit 2 ml Soerensen-Phosphatpuffer pro Platte abgespült oder die Sporenköpfe werden mit einer Impföse angesammelt und in 2 mal 1 ml Soerensen-Phosphatpuffer in Einfrierröhrchen gegeben. Diese werden dann in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgt bei -70°C. Zum Animpfen einer neuen Kultur wird ein Aliquot bei Raumtemperatur angetaut und 100-200 µl in eine Petrischale mit G<sub>0</sub>-Medium gegeben. Die verbleibende Sporensuspension wird sofort wieder in flüssigem Stickstoff eingefroren und wieder bei -70°C gelagert.

### 5.3.4 Endozytose-Assays

Für diese Arbeit wurden verschiedene Endozytose-Assays durchgeführt. Das Prinzip ist jedoch allen Methoden gleich. Es wird eine Dictyostelium-Kultur definierter Zellzahl verwendet, die dann mit fluoreszierenden Reagenzien versetzt wird. Die extrazelluläre Fluoreszenz wird mit 100 µl Trypanblau-Lösung pro Probe im 1,5 ml Reaktionsgefäß gequantscht. Vermessen werden die Proben bei der, für den jeweiligen Fluoreszenzfarbstoff angegebenen Wellenlänge (vgl. 5.14). Die Probe hat ein Volumen von 1 ml und wird vom Zeitpunkt t= 0 bis zum Zeitpunkt t= 90 oder 120 in 15-minütigem Abstand entnommen.

Bei einem Phagozytose-Assay werden 10 ml einer axenisch gewachsenen Kultur ( $2 \times 10^6$  Zellen/ml) 120 µl TRITC markierte Hefen zugegeben. Nach der Probenentnahme werden die Zellen im 1,5 ml Reaktionsgefäß 3 Minuten auf dem Rüttler inkubiert und anschließend für 2 Minuten bei 3000 rpm abzentrifugiert. Das Pellet wird in 1 ml Soerensen-Phosphatpuffer aufgenommen. Die Messung erfolgt bei einer Spannung von ca. 500 V (abhängig von der Qualität der Hefen).

Ein Pinozytose-Assay unterscheidet sich nur an einigen Punkten von einem Phagozytose-Assay. Zu 10 ml einer axenisch gewachsenen Kultur ( $5 \times 10^6$ ) wird 1 ml TRITC-Dextran, das in axenischem Medium gelöst wurde (20 mg/ml), gegeben. Nach der Entnahme werden die Proben hier nur geschwenkt und sofort, wie oben beschrieben, zentrifugiert. Das Pellet wird mit 1 ml Soerensen-Phosphatpuffer gewaschen. Die Messung erfolgt ebenfalls in 1 ml Soerensen-Phosphatpuffer, hier jedoch bei einer Spannung von 600 V.

Der Transit-Assay stellt sich etwas komplexer dar. Hier werden 20 ml einer Kultur von  $5 \times 10^6$  Zellen/ml bei 1200 rpm 3 Minuten geerntet. Das Pellet wird in 10 ml Gemisch aus 4



mg/ml FITC-Dextran und 40 mg/ml TRITC-Dextran in HL5-Medium aufgenommen und für 20 Minuten auf dem Schüttler inkubiert. Die Zellen werden dann erneut zentrifugiert und in HL5-Medium resuspendiert. Die Proben werden entnommen und sofort wie in den anderen Assays zentrifugiert und vermessen. Die Messung erfolgt sowohl für den FITC-, als auch für den TRITC-Farbstoff bei den angegebenen Wellenlängen und einer Spannung von 700V.

FITC ist ein pH-sensitiver Farbstoff. Er fluoresziert umso stärker, je neutraler der pH-Wert ist. Aus diesem Grund kann man ein pH-Äquivalent berechnen, indem man den Quotienten aus FITC-Fluoreszenz und TRITC-Fluoreszenz bildet.

Ein Exozytose-Assay ähnelt dem Prinzip des Transit-Assays. Nach einem Pulse mit TRIC-Dextran wird die Abnahme der Fluoreszenz vermessen. Hier werden jedoch  $1,25 \times 10^8$  Zellen geerntet und in 10 ml HL5-Medium aufgenommen. Nun werden 2,5 ml TRITC-Dextran-Lösung (2 mg/ml Endkonzentration) zugegeben. Es folgt eine Inkubation für 3,5 h im Dunkeln. Anschließend werden die Zellen zentrifugiert, einmal in HL5-Medium gewaschen und in 10 ml HL5-Medium resuspendiert. Die Proben werden entnommen und sofort wie in den anderen Assays zentrifugiert und vermessen.

In einem Bodipy-Assay misst man die Aufnahme eines fluoreszenz-markierten Fettsäure-Analogons. Da dieses Analogon ein ähnliches Löslichkeits-Verhalten aufweist, wie eine „normale“ Fettsäure, muss sie an BSA gekoppelt werden, damit sie in wässrigen Lösungen löslich ist. 15  $\mu$ M C1-Bodipy-C12 werden zusammen mit 15  $\mu$ M BSA bei RT auf einem Rüttler inkubiert und anschließend auf 1 ml pro Probe mit  $G_0$ -Medium aufgefüllt. Dieser ml wird zum Zeitpunkt  $t=0$  zu 10 ml einer Kultur gegeben, die eine Konzentration von  $5 \times 10^6$  Zellen/ml haben soll. Anschließend wird wie im Pinozytose-Assay 1 ml Suspension abgenommen, 1-mal mit Soerensen-Phosphatpuffer gewaschen und im Fluorimeter bei einer Spannung von 450V vermessen.

#### Herstellung von TRITC-markierten Hefen für den Phagozytose-Assay

5 g Hefen werden in 50 ml PBS für 30 Minuten unter Rühren im Wasserbad gekocht. Die Hefen werden anschließend 5-mal mit PBS und 2-mal mit Soerensen-Phosphatpuffer für 5 Minuten bei 2500 rpm (Hettich/Rotina) gewaschen. Die Konzentration der Hefen wird auf  $1 \times 10^9$  Zellen/ml mit Phosphatpuffer eingestellt. So können sie auch bei  $-20$  °C gelagert werden.

Um die Hefen zu markieren, werden  $2 \times 10^{10}$  Zellen in 20 ml 50 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , pH 9,2 aufgenommen und 2 mg TRITC in 200  $\mu$ l DMSO gelöst zugegeben. Die Suspension wird für 30 Minuten bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Es folgt zweimaliges Waschen mit 50 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , pH 9,2 und viermaliges Waschen mit Soerensen-Phosphatpuffer bei 2500 rpm für je 5 Minuten.

Die Konzentration wird auf  $1 \times 10^9$  Zellen/ml eingestellt und die Suspension aliquotiert. Gelagert werden die TRITC-markierten Hefen bei  $-20\text{ }^\circ\text{C}$ .

#### Endozytose FITC-markierter Bakterien

10 ml einer axenisch gewaschenen Kultur ( $2 \times 10^6$  Zellen/ml) werden mit 500  $\mu\text{l}$  Bakteriensuspension versetzt. Sofort wird zum Zeitpunkt  $t=0$ , 1 ml des Dictyostelium/Bakterien-Gemisches abgenommen und zu 2 ml eiskaltem Soerensen-Phosphatpuffer gegeben, um die Phagozytose zu stoppen. Zu den Zeitpunkten  $t=15, 30, 45$  und 60 min wird ebenfalls 1 ml der Suspension mit 2 ml Soerensen-Phosphatpuffer versetzt. Die Suspensionen werden bis zum Ende des Assays auf Eis aufbewahrt. Die Proben werden dann über eine Säule aus 20 %igem PEG 8000 geschichtet und für 10 min bei  $1000 \times g$  zentrifugiert. Das Pellet wird anschließend 2mal mit Soerensen-Phosphatpuffer gewaschen ( $300 \times g$ , 3 min). Nun werden die Zellen in 1 ml Lysis-Puffer resuspendiert, wodurch der Farbstoff freigesetzt wird. Die Fluoreszenz wird im Fluorimeter bei 525V gemessen.

#### Phagosomale pH-Wert-Messung mit Hilfe FITC-markierter Bakterien

$5 \times 10^7$  axenisch gewachsene Dictyostelium-Zellen werden geerntet und in 10 ml frischem  $G_0$ -Medium resuspendiert. Nach 10-15 min Erholung wird 1 ml gelabelte Bakterien-Suspension zugegeben und für 10 min inkubiert. Anschließend werden die Zellen 1:2 mit eiskaltem Soerensen-Phosphatpuffer verdünnt und 3 min bei  $1000 \times g$  und  $4^\circ\text{C}$  zentrifugiert. Das Pellet wird 3mal mit Soerensen-Phosphatpuffer gewaschen und anschließend in 10 ml HL5-Medium (RT) resuspendiert. Sofort wird zum Zeitpunkt  $t=0$  1 ml der Suspension abgenommen und 2mal mit je 1 ml eiskaltem 50 mM MES-Puffer pH 6,5 gewaschen und dann in 1 ml MES-Puffer bei 600 V im Fluorimeter gemessen. Die Messung erfolgt bei einer Anregung von 495 bzw. 450 nm und einer Emission von 520 nm. Die Ratio aus 495/450 wird gegen die Zeit aufgetragen, um den intraphagosomalen pH-Wert zu ermitteln.

#### Herstellung FITC-markierter Bakterien

300 ml LB Medium werden mit E. coli B/r beimpft und ü.N. bei  $37\text{ }^\circ\text{C}$  inkubiert. Die Zellen werden dann 10 min bei  $5000 \times g$  zentrifugiert und 2mal mit Soerensen-Phosphatpuffer gewaschen. Anschließend wird eine Konzentration von  $1 \times 10^{10}$  Zellen/ml eingestellt (OD mit Photometer ermittelt:  $1\text{OD} = 1 \times 10^9$  Zellen/ml).

$5 \times 10^{11}$  Zellen werden nun zentrifugiert und in 50 ml Labeling-Buffer (enthält Endkonzentration 0,1 mg/ml FITC) resuspendiert und 2 Stunden bei  $37^\circ\text{C}$  rotiert. Es folgt viermaliges Waschen mit Soerensen-Phosphatpuffer. Die Konzentration wird mit Soerensen-Phosphatpuffer auf  $2 \times 10^{10}$  Zellen/ml eingestellt und Aliquots bei  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  eingefroren.

## 5.4 Mikroskopische Methoden

### 5.4.1 Fluoreszenzmikroskopie von lebenden Zellen

Zur Beobachtung von lebenden Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop wird auf einem Deckglas (50 mm x 50 mm) ein Plastikring, mit einem Innendurchmesser von 40 mm, mit Paraffin dicht befestigt, und 1 ml Zellen ( $5 \times 10^5$  bis  $1 \times 10^6$  Zellen/ml) in HL5-Medium auf das Deckglas pipettiert. Nach Absitzen der Zellen für 30 min wird das Medium gegen eines ausgetauscht, das fluoreszierende Substanzen beinhaltet (z.B. TRITC-Dextran oder Nile Red) und das Deckglas auf dem Tisch des inversen Fluoreszenzmikroskops befestigt und mikroskopiert. Mit dieser Methode ist es z.B. möglich die Ansäuerung und die Neutralisierung der Endosomen in lebenden Zellen zu beobachten.

### 5.5 Präparation von Zellen für die Immunfluoreszenz (37)

300  $\mu$ l einer Dictyostelium-Zellsuspension von  $1 \times 10^6$  Zellen/ml in HL5-Medium werden auf ein HCl-gereinigtes Deckglas ( $\varnothing$  18 mm) gebracht. Nach Absitzen der Zellen für 45 min wird das Medium abgesaugt und sofort 300  $\mu$ l Pikrinsäure/ Paraformaldehyd-Fixativ zugegeben. Die Zellen werden für 30 min in einer feuchten Kammer fixiert. Das Deckglas wird durch Eintauchen in 10 mM PIPES, pH 6,0 und anschließend PBS/Glycin gewaschen. Dann werden die Zellen nach erneutem Waschen mit 300  $\mu$ l PBS/Glycin (5 min), 10-15 min mit 70% [v/v] Ethanol nachfixiert. Es wird dann zweimal 5 min mit 300  $\mu$ l PBS/Glycin und zweimal 15 min mit 300  $\mu$ l PBG gewaschen. Danach wird mit einem Antikörper enthaltenden Hybridoma-Kulturüberstand (jeweiliger Primär-Antikörper) über Nacht bei Raumtemperatur in der abgedeckten, feuchten Kammer inkubiert.

Nach Entfernen des Primär-Antikörpers wird 6 x 5 min mit 300  $\mu$ l PBG gewaschen und anschließend 2 h bei Raumtemperatur mit einem sekundären Antikörper (Ziege-anti-Maus IgG konjugiert mit CY3) in einer 1:1.000 Verdünnung in PBG inkubiert. Nach Entfernen des Sekundär-Antikörpers wird 2 x 5 min mit PBG und 2 x 5 min mit PBS gewaschen. Die Zellen werden dann, nach kurzem Schwenken in H<sub>2</sub>O sofort auf einem Objektträger mit Gelvatol eingebettet, und das Präparat wird zum Aushärten bei 4°C dunkel und kühl gelagert.

Alle Antikörperlösungen werden vor Gebrauch 5 min bei 14.000 rpm in der Eppendorf-Tischzentrifuge zentrifugiert. Die Puffer werden vor Gebrauch sterilfiltriert.

Im CLSM wird FITC und Oregon Green über einen Ar-Laser (488 nm) und CY3 und TRITC über einen HeNe-Laser (543 nm) angeregt.

### Pikrinsäure/Paraformaldehyd-Fixativ

0,2 g Paraformaldehyd werden in 3,3 ml Wasser nach Zugabe von 3-4 Tropfen 2 M NaOH und Erwärmen auf 40°C gelöst. Anschließend werden 5 ml 20 mM PIPES, pH 6,0 und 1,5 ml gesättigte Pikrinsäure-Lösung zugegeben. Der pH-Wert des Fixativs wird auf 6,0 eingestellt (Überprüfung mit Indikatorstäbchen).

### Gelvatol

10 ml einer 0,1 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ -Lösung werden mit einer 0,1 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ -Lösung auf pH 7,2 eingestellt. Hiernach folgt eine 1:10-Verdünnung und der Zusatz von 20 g Polyvinylalkohol, der über Nacht durch Rühren gelöst wird. Nun gibt man 40 ml Glycerin zu und lässt die Lösung wieder über Nacht rühren. Nach 15 min Zentrifugation bei 12.000 rpm wird der Überstand entnommen und mit 25 µg/ml DABCO (Antibleichmittel) versetzt. Nach Aliquotieren in Spritzen lagert man diese bei -20°C.

#### 5.5.1 DAPI-Färbung

Bei Markierung der Zellkerne mit DAPI werden 500 µl dieses Farbstoffs 1:1.000 in PBS verdünnt (Stammlösung 1 mg/ml in 70% Ethanol). Diese Lösung wird anstatt des sekundären Antikörpers (s. 5.13) auf das Präparat gegeben und für 20 Minuten in der feuchten Kammer bei RT inkubiert. Anschließend wird je 2 x 5 min mit 300 µl PBS/Glycin und mit PBS gewaschen. Danach wird das Deckgläschen kurz mit  $\text{H}_2\text{O}$  gewaschen und in Gelvatol eingebettet.

DAPI-Präparate werden im inversen Fluoreszenzmikroskop über den UV-Filter der Quecksilberlampe angeregt.

## 5.6 Biochemische Methoden

Zur Größenauftrennung 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-Lösung gefärbt.

#### 5.6.1 Entnahme von Proteinproben

$3 \times 10^6$  Zellen einer Dictyostelium-Kultur werden bei 4°C abzentrifugiert und das Zell-Pellet in 60 µl SDS-Probenpuffer ( $5 \times 10^4$  Zellen/ µl) durch auf- und abpipettieren

resuspendiert. 20 µl einer solchen Probe werden dann in der SDS-PAGE eingesetzt. Alternativ können auch weniger Zellen geerntet und dann in dem entsprechend geringem Volumen SDS-Probenpuffer aufgenommen werden.

### 5.6.2 Membranassoziation nach (2)

$5 \times 10^7$  Zellen werden bei 800 x g für 3 min geerntet. Das Pellet wird in 1 ml Homogenisations-Puffer resuspendiert. Durch mehrere Passagen durch einen Cell-Cracker werden die Zellen aufgeschlossen, die Organellen bleiben intakt. Eine Zentrifugation für 30 min bei 1000 x g sedimentiert die Kerne. Der Überstand wird nun weiter verwendet. 125 µl des Überstandes werden mit je 125 µl Homogenisations-Puffer, 2 M NaCl-Lösung, 0,2M CaCO<sub>3</sub>-Lösung, pH 11 bzw. 2 % Triton vermischt und für 2 h auf Eis inkubiert.

Es schließt sich eine Zentrifugation für 30 min bei 100.000 x g an. Sowohl das Pellet, als auch der Überstand werden nun mit Lämmli-Puffer versetzt und 50 µl auf ein PAA-Gel geladen. Die Lokalisation des Ziel-Proteins wird mit einer sich anschließenden Western-Blot-Analyse überprüft.

### 5.6.3 Herstellung von diskontinuierlichen 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 ihre Position durch das Anbringen von Metallklammern fixiert. Der zwischen den Glasplatten entstandene Hohlraum wird innen mit aufgekochter 0,2%iger Agarose abgedichtet. In den Hohlraum werden nun nacheinander die beiden unterschiedlich konzentrierten Gele gegossen. Zuerst wird das noch unpolymerisierte Trenngel (10% PAA) eingefüllt und mit Isopropanol überschichtet (scharfe Trenngelkante). Nach Polymerisieren des Polyacrylamids wird der 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 werden folgende Komponenten in der angegebenen Reihenfolge in ein Becherglas gegeben und vermischt:

Trenngel (10% PAA)	12,8 ml	H <sub>2</sub> O
	8,1 ml	SDS-Trenngelpuffer
	11 ml	30%ig Acrylamid/Bisacrylamid Stammlsg.
	8,1 µl	TEMED
	480 µl	20 % APS

---

Sammelgel (3,4% PAA)	10,4 ml	H <sub>2</sub> O
	4 ml	SDS-Sammelgelpuffer
	1,8 ml	30%ige Acrylamid/Bisacrylamid Stammlsg.
	8 µl	TEMED
	240 µl	20 % APS

Die Polymerisation setzt dabei erst nach Zugabe von TEMED und APS allmählich ein.

Nach Aufbau der Gel-Apparatur 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. 190 V erhöht und bis zum Ende des Laufs, nach ca. 3-4 h, beibehalten. Das Trenngel wird nun vorsichtig entnommen und steht für weitere Anwendungen zur Verfügung.

#### 5.6.4 Western-Blot

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

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 verwendet man eine entsprechende Blotapparatur, 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 weitere Lagen von Whatman-Papier 3MM blasenfrei aufgelegt. Nach Aufsetzen des Deckels (obere Elektrode= Kathode) wird nun eine Stromstärke angelegt, die sich nach der Größe der Membran richtet; hierbei gilt 5 mA pro cm<sup>2</sup> Membran. Das im Puffer vorhandene Methanol erleichtert dabei das Herauslösen der Proteine aus dem Gel. Nach Beendigung des Transfers, nach einer halben Stunde, werden Membran und Gel entnommen. Das Gel wird nun mit Coomassie-Lösung gefärbt und die Membran für den immunologischen Nachweis bestimmter Proteine verwendet.

#### 5.6.5 Immundetektion von Proteinen

Zur Angleichung an neue Pufferbedingungen nach dem Elektrotransfer wäscht man die Nitrocellulose-Membran zunächst einmal in 1 x PBS. 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 jeweiligen Primär-Antikörpers in einer 1:5-

Verdünnung in frischer Blockierlösung. Die Inkubation erfolgt unter Schwenken über Nacht. Die AK-Lösung wird entnommen und die Membran zur Entfernung ungebundener Antikörper zweimal in 2 x PBS gewaschen. Anschließend erfolgt die Zugabe des sekundären Antikörpers (Kaninchen-anti-Maus IgG konjugiert mit alkalischer Phosphatase). Der Antikörper wird hier 1:5000 in Blockierlösung verdünnt. Nach 2 h Inkubation unter Schwenken bei Raumtemperatur wird der sekundäre Antikörper entfernt, die Membran zweimal 5 Minuten in 1 x PBS gewaschen und in Carbonatpuffer, pH 10,2, äquilibriert. Durch Zugabe von 30 ml frischem Carbonatpuffer zusammen mit 112,5 µl BCIP (50 mg/ ml DMF) als Substrat und 60 µl NBT (75 mg/ ml 70% DMF) wird nun die dem indirekten Proteinnachweis dienende Farbreaktion initiiert. Hierbei wird das Substrat an Orten der Antikörperbindung unter violetter Farbentwicklung enzymatisch gespalten und präzipitiert.

Die Reaktion wird durch Austausch des Puffers gegen Bidest. gestoppt, und die Membran zur Konservierung in Folie eingeschweißt.

#### 5.6.6 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 Inkubation in Bidest. bis ein nahezu farbfreier Gel-Hintergrund erscheint. Die Nachweisgrenze dieser Färbemethode liegt bei 1-2 µg Protein pro Bande.

#### 5.6.7 Aktivitätsbestimmung von LC-FACS-Proteinen

In diesem Fall soll die Aktivität einer peroxisomalen LC-FACS bestimmt werden. Um Peroxisomen von anderen Organellen zu trennen wird hier eine Dichtegradienten-Zentrifugation durchgeführt.

##### Dichtegradienten-Zentrifugation

$2 \times 10^9$  Zellen werden geerntet und in 5 ml 0,25 M STKM resuspendiert. Durch mehrere Passagen durch einen Cell-Cracker werden die Zellen aufgeschlossen. Durch eine Zentrifugation für 30 min bei 1000 x g werden die Kerne pelletiert. Der Überstand wird dann auf einen diskontinuierlichen Gradienten aufgetragen und für 2,5 h bei 180.000 x g zentrifugiert. Der Gradient setzt sich wie folgt zusammen: 1,3 ml 1,8M STKM, 1,3 ml 1,5M STKM, 1,3 ml 1,3M STKM, 1,3 ml 1,1M STKM, 1,3 ml 0,8M STKM, 1,3 ml 0,5M STKM. Die Fraktionen werden in 2-ml-Schritten abgenommen. Die 1,8M STKM-Fraktion wird für eine erneute Zentrifugation verwendet. Hierzu wird sie 1:7 verdünnt und

anschließend für 30 min bei 100.000 x g zentrifugiert. Das Pellet, das sich hieraus ergibt, wird in ca. 200 µl TKM resuspendiert. Mit den Fraktionen wird eine Proteinbestimmung nach Bradford (mit Roti-Quant nach Herstellerangaben) durchgeführt und die Zusammensetzung in einer Western-Blot-Analyse überprüft.

Messung der LC-FACS-Aktivität

Folgende Lösungen werden vermischt:

100 µl	1 M	Tris-HCl; pH 7,5	<u>Dole´s Medium</u>
100 µl	40 mM	MgCl <sub>2</sub>	4 ml Isopropanol
125 µl	10 mM	ATP	1 ml n-Heptan
25 µl	10 mM	EDTA	100 µl H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
10 µl	5%	Triton	
40 µl	100 µM	Palmitinsäure in Ethanol	
25 µl	40 mM	DTT	
100 µl		Probe in 1 x TKM (20 µg Protein)	
40 µl		Bidest.	

Die Reaktion wird durch die Zugabe von 5 µl <sup>3</sup>H-Palmitinsäure (unverdünnt) und 20 µl 10mM CoenzymA-Lösung gestartet. Es schließt sich eine Inkubation für 10 min bei 35 °C an. Durch die Zugabe von 0,5 ml Dole´s Medium wird die Reaktion gestoppt. Die Lösung wird 30 sec. bei max. Geschwindigkeit in einer Tischzentrifuge zentrifugiert und die obere Phase verworfen. Die untere Phase wird 6-mal mit 300 µl n-Heptan gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wird die untere Phase mit 2 ml QuickSafeA Scintillations-Medium versetzt und in einem Scintillations-Counter vermessen.

#### 5.6.8 Aktivitätsmessung der α-Mannosidase und saure Phosphatase

Es werden ca. 1 x 10<sup>5</sup> Zellen auf eine Petrischale gegeben. Nach 3 Tagen wird das Medium entfernt und die Zellen mit 1 ml 0,5%iger Triton-X-100-Lösung von der Platte gespült. Zur Bestimmung der Aktivität der sauren Phosphatase werden 20 µl des Mediums und der Zellsuspension in Triton-Lösung zu 480 µl Substratpuffer (16,4 mM PNPP in Enzymtestpuffer) gegeben. Für die Bestimmung der α-Mannosidase-Aktivität werden 200 µl Medium und Zell-Suspension zu 300 µl Substratpuffer (4,2 mM PNP-α-M in Enzymtestpuffer) gegeben. Die Lösungen werden für 30 min bei 35 °C inkubiert und die Reaktion durch die Zugabe von 500 µl einer 1M NaCO<sub>3</sub>-Lösung gestoppt. Bei der Reaktion entsteht p-Nitrophenol. Durch die Änderung des pH-Wertes liegt dies als Anion vor, das sich durch eine gelbe Farbe auszeichnet. Diese Farb-Änderung kann dann im Photometer bei 420 nm gemessen werden.



### 5.6.9 Isolation von Lipiden aus Dictyostelium discoideum (5)

Für die Isolation von Lipiden aus Dictyostelium wurden sowohl Zellen verwendet, die axenisch, als auch bakteriell kultiviert wurden. Es werden  $5 \times 10^7$  Zellen für 3 min bei 1200 rpm in der Hettich Zentrifuge geerntet. Das Pellet wird in 1,6 ml Soerensen-Phosphatpuffer resuspendiert. Durch Zugabe von 3,6 ml Chloroform-Methanol-Gemisch (1:2) und 100  $\mu$ l 6M HCl und 30 sec. vortexen, werden die Zellen lysiert. Die Lösung wird nun 1 h bei RT inkubiert, damit Proteine sedimentieren. Durch Zentrifugation für 10 min bei 5000 rpm in der Heraeus-Picofuge werden die Proteine vollständig abgetrennt. Der ÜS wird in ein frisches Zentrifugenglas überführt, mit 4 ml Chloroform und 4 ml Bidest. versetzt und erneut 30 sec. gevortext. Um die Phasen zu trennen schließt sich eine 5 minütige Zentrifugation bei 3000 x g an. Die untere chloroformhaltige Phase wird in ein frisches Zentrifugenglas überführt und die wässrige Phase erneut mit 2,5 ml Chloroform extrahiert wie oben. Die so erhaltene Chloroformphase wird mit der des ersten Extraktionsschrittes vereinigt und unter Schutzgas vollständig eingeeengt. Die Lipide werden in 100  $\mu$ l Chloroform resuspendiert.

### 5.6.10 Trennung von Lipid-Klassen durch Dünnschicht-Chromatografie

Die Lipide die aus Dictyostelium isoliert werden, werden in ihre Lipid-Klassen aufgetrennt. Dies geschieht durch verschiedene mobile Phasen einer Dünnschichtchromatographie. Hierzu werden jeweils eine Kieselgel beschichteten Glasplatte im unteren Bereich 1 cm vom Boden als Auftragslinie markiert. Dort werden jeweils 20  $\mu$ l der einzelnen Proben mit Hilfe einer Auftragskapillare punktförmig aufgetragen. Die Platte wird dann in eine Dünnschichtchromatographie-Kammer, in der sich bereits die mobile Phase befindet gestellt und solange in der geschlossenen Kammer inkubiert, bis die Lauffront sich kurz unterhalb des Endes der Glasplatte befindet. Die Platte wird dann luftgetrocknet und anschließend in Färbelösung getaucht. Durch die Inkubation bei 160 °C im Trockenschrank werden Banden sichtbar.

### 5.6.11 Quantifizierung der Menge an Neutral-Lipiden, LT-Sys<sup>®</sup>

Hierfür wird ein Assay der Firma Lehmann verwendet. Dieser Assay dient der Bestimmung von Triglyceriden; dem Hauptbestandteil von Lipidtröpfchen. Das Prinzip, das diesem Assay zugrunde liegt beruht auf einer Multienzym-Reaktion. Triglyceride, die in diesem Assay quantifiziert werden sollen, werden in einem ersten Schritt durch die Lipoprotein-Lipase in Glycerin und Fettsäuren gespalten. Anschließend wird das so produzierte Glycerin unter ATP-Verbrauch von der Glycerin-Kinase zu Glycerin-3-

Phosphat phosphoryliert. Dies reagiert dann mit Hilfe der Glycerolphosphatoxidase und unter Sauerstoffverbrauch zu Dihydroxyacetonphosphat und Wasserstoffperoxid. Der letzte Schritt beinhaltet die eigentliche Farbreaktion. Wasserstoffperoxid, Aminoantipyrin und 4-Chlorphenol werden durch eine Peroxidase zu Chinonimin, Salzsäure und Wasser. Die Reaktion wird 10 min bei 37 °C inkubiert und bei 500 nm im Photometer vermessen.

## 6 Abkürzungen

$\mu\text{F}$	Microfarad
$\mu\text{g}$	Microgramm
$\mu\text{m}$	Micrometer
$\mu\text{l}$	Microliter
$\mu\text{M}$	Micromolar
AK	Antikörper
Abb.	Abbildung
ADP	Adenodindiphosphat
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BCIP	5-Bromo-4-chloro-3-Indo-yl-Phosphat
Bidest.	Doppelt destilliertes Wasser
BSA	Rinderserumalbumin
$\text{Bs}^r$	Blastizidin-Resistenz
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
Cy3	Indocarbocyanin
DABCO	1,4-Diaminobenzidin
DAG	1,2-Diacylglycerol
DAPI	4,6-Diamidino-2-phenylindol
cDNA	copy DNA
CoA	Coenzym A
DMFO	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxiribonucleinsäure
dNTP	Desoxinucleotidtriphosphate
E.coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EP	Elektroporation
ER	Endoplasmatisches Retikulum
EtOH	Ethanol
F-Aktin	filamentöses Aktin
FITC-Dextran	Flourescein Isothiocynat-Dextran
for	„forward“, vorwärts gerichtet
g	Gramm

G-Aktin	Globuläres Aktin
GFP	Grün fluorszierendes Protein
GlcNAc-1-P	N-Acetylglucosamin-1-Phosphat
h	Stunden
H <sub>2</sub> O	Wasser
HBS	HEPES gepufferte Salzlösung
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethansulfonsäure
IgG	Immunglobulin G
IP3	Inositoltrisphosphat
KA	Klebsiella aerogenes
KAc	Kaliumacetat
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
kV	Kilovolt
l	Liter
LB (LB <sub>amp</sub> )	Luria Bertani-Medium (mit Ampicillin)
LC-FACS	Long chain-fatty acyl CoA Synthetase
LCFAS	long chain fatty acids, langkettige Fettsäuren
M	Molar
mA	Miliampere
mAk	monoklonaler Antikörper
Man-6-P	Manose-6-Phosphat
Mb	Megabasenpaar(e)
MCFAS	Medium chain fatty acids; mittelkettige Fettsäuren
min	Minute
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
mmol	Millimol
MOPS	3-Morpholinpropansulfonsäure
NaAc	Natriumacetat
NBT	p-Nitrotetrazoliumblauschwarz
ng	Nanogramm
OD	Optische Dichte
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese

PCIA	Phenol/Chlorophorm/Isoamylalkohol
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PIP <sub>2</sub>	Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphat
PIP <sub>3</sub>	Phosphatidylinositol 3,4,5-Trisphosphat
PIPES	Piperazin-N,N`-bis-(2-ethansulfonsäure)
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
PP	Phosphatpuffer
RNA	Ribonukleinsäure
Rnase	Ribonuclease
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
s	Sekunden
s.u.	siehe unten
SM	Standardmedium
Taq	<i>Thermophilus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA
TEMED	N-N-N`-N`-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris- (hydroxymethyl)aminomethan
TRITC	Tetramethylrhodamin Isothiocyanat)
Tween	Polyoxyethylensorbitanmonolaurat
U	Unit(s)
u.a.	unter anderem
ü.N.	über Nacht
usw.	und so weiter
UV	Ultraviolett(es Licht)
V	Volt
v/v	Volumen/ Volumen
Vac	Vacuolin
vgl.	vergleiche
VLCFAs	Very long chain fatty acids; sehr langkettige Fettsäuren
Vol.	Volumen
[v/v]	Volumenprozent
[w/v]	Gewichtsprozent
wt	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel

## 7 Literatur

1. Bass, N. M. 1988. The cellular fatty acid binding proteins: aspects of structure, regulation, and function. *Int Rev Cytol* 111:143-84.
2. Becker, M., M. Matzner, and G. Gerisch. 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.
3. Birnboim, H. C., and J. Doly. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7:1513-23.
4. Black, P. N., Q. Zhang, J. D. Weimar, and C. C. DiRusso. 1997. Mutational analysis of a fatty acyl-coenzyme A synthetase signature motif identifies seven amino acid residues that modulate fatty acid substrate specificity. *J Biol Chem* 272:4896-903.
5. Bligh, E. G., and W. J. Dyer. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* 37:911-7.
6. Brady, P. S., R. R. Ramsay, and L. J. Brady. 1993. Regulation of the long-chain carnitine acyltransferases. *Faseb J* 7:1039-44.
7. Brasaemle, D. L., B. Rubin, I. A. Harten, J. Gruia-Gray, A. R. Kimmel, and C. Londos. 2000. Perilipin A increases triacylglycerol storage by decreasing the rate of triacylglycerol hydrolysis. *J Biol Chem* 275:38486-93.
8. Brown, W. J., and J. A. Schmidt. 2005. Use of acyltransferase inhibitors to block vesicular traffic between the ER and Golgi complex. *Methods Enzymol* 404:115-25.
9. Buczynski, G., J. Bush, L. Zhang, J. Rodriguez-Paris, and J. Cardelli. 1997. 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.
10. Candresse, T., Le Gall, O., Maisonneuve, B., German-Retana, S., and Redondo, E. 2002. The use of Green Fluorescent Protein-tagged recombinant viruses to test Lettuce mosaic virus resistance in lettuce. *Phytopathology* 92:169-176.
11. Charette, S. J., and P. Cosson. 2004. Preparation of genomic DNA from *Dictyostelium discoideum* for PCR analysis. *Biotechniques* 36:574-5.
12. Chien, A., D. B. Edgar, and J. M. Trela. 1976. Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile *Thermus aquaticus*. *J Bacteriol* 127:1550-7.
13. Choi, J. Y., and C. E. Martin. 1999. The *Saccharomyces cerevisiae* FAT1 gene encodes an acyl-CoA synthetase that is required for maintenance of very long chain fatty acid levels. *J Biol Chem* 274:4671-83.
14. Clarke, M., and S. C. Kayman. 1987. The axenic mutations and endocytosis in *Dictyostelium*. *Methods Cell Biol* 28:157-76.
15. Clarke, M., J. Kohler, Q. Arana, T. Liu, J. Heuser, and G. Gerisch. 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.

16. Clarke, M., A. Muller-Taubenberger, K. I. Anderson, U. Engel, and G. Gerisch. 2006. Mechanically-induced Actin-mediated Rocketing of Phagosomes. *Mol Biol Cell*.
17. Coleman, R. A., and D. P. Lee. 2004. Enzymes of triacylglycerol synthesis and their regulation. *Prog Lipid Res* 43:134-76.
18. Comerford, J. G., and A. P. Dawson. 1993. Effects of CoA and acyl-CoAs on GTP-dependent Ca<sup>2+</sup> release and vesicle fusion in rat liver microsomal vesicles. *Biochem J* 289 ( Pt 2):561-7.
19. Cox, E. C., C. D. Vocke, S. Walter, K. Y. Gregg, and E. S. Bain. 1990. Electrophoretic karyotype for *Dictyostelium discoideum*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:8247-51.
20. Didichenko, S. A., B. Tilton, B. A. Hemmings, K. Ballmer-Hofer, and M. Thelen. 1996. Constitutive activation of protein kinase B and phosphorylation of p47phox by a membrane-targeted phosphoinositide 3-kinase. *Curr Biol* 6:1271-8.
21. Drengk, A., J. Fritsch, C. Schmauch, H. Ruhling, and M. Maniak. 2003. A coat of filamentous actin prevents clustering of late-endosomal vacuoles in vivo. *Curr Biol* 13:1814-9.
22. Eehalt, R., J. Fullekrug, J. Pohl, A. Ring, T. Herrmann, and W. Stremmel. 2006. Translocation of long chain fatty acids across the plasma membrane--lipid rafts and fatty acid transport proteins. *Mol Cell Biochem* 284:135-40.
23. Eichinger, L., J. A. Pachebat, G. Glockner, M. A. Rajandream, R. Sugang, M. Berriman, J. Song, R. Olsen, K. Szafranski, Q. Xu, B. Tunggal, S. Kummerfeld, M. Madera, B. A. Konfortov, F. Rivero, A. T. Bankier, R. Lehmann, N. Hamlin, R. Davies, P. Gaudet, P. Fey, K. Pilcher, G. Chen, D. Saunders, E. Sodergren, P. Davis, A. Kerhornou, X. Nie, N. Hall, C. Anjard, L. Hemphill, N. Bason, P. Farbrother, B. Desany, E. Just, T. Morio, R. Rost, C. Churcher, J. Cooper, S. Haydock, N. van Driessche, A. Cronin, I. Goodhead, D. Muzny, T. Mourier, A. Pain, M. Lu, D. Harper, R. Lindsay, H. Hauser, K. James, M. Quiles, M. Madan Babu, T. Saito, C. Buchrieser, A. Wardroper, M. Felder, M. Thangavelu, D. Johnson, A. Knights, H. Loulseged, K. Mungall, K. Oliver, C. Price, M. A. Quail, H. Urushihara, J. Hernandez, E. Rabinowitsch, D. Steffen, M. Sanders, J. Ma, Y. Kohara, S. Sharp, M. Simmonds, S. Spiegler, A. Tivey, S. Sugano, B. White, D. Walker, J. Woodward, T. Winckler, Y. Tanaka, G. Shaulsky, M. Schleicher, G. Weinstock, A. Rosenthal, E. C. Cox, R. L. Chisholm, R. Gibbs, W. F. Loomis, M. Platzer, R. R. Kay, J. Williams, P. H. Dear, A. A. Noegel, B. Barrell, and A. Kuspa. 2005. The genome of the social amoeba *Dictyostelium discoideum*. *Nature* 435:43-57.
24. Faergeman, N. J., and J. Knudsen. 1997. Role of long-chain fatty acyl-CoA esters in the regulation of metabolism and in cell signalling. *Biochem J* 323 ( Pt 1):1-12.
25. Fukui, Y., T. J. Lynch, H. Brzeska, and E. D. Korn. 1989. Myosin I is located at the leading edges of locomoting *Dictyostelium amoebae*. *Nature* 341:328-31.
26. German-Retana, S., T. Candresse, E. Alias, R. P. Delbos, and O. Le Gall. 2000. Effects of green fluorescent protein or beta-glucuronidase tagging on the accumulation and pathogenicity of a resistance-breaking Lettuce mosaic virus isolate in susceptible and resistant lettuce cultivars. *Mol Plant Microbe Interact* 13:316-24.

27. Geuze, H. J., J. L. Murk, A. K. Stroobants, J. M. Griffith, M. J. Kleijmeer, A. J. Koster, A. J. Verkleij, B. Distel, and H. F. Tabak. 2003. Involvement of the endoplasmic reticulum in peroxisome formation. *Mol Biol Cell* 14:2900-7.
28. Groot, P. H., H. R. Scholte, and W. C. Hulsmann. 1976. Fatty acid activation: specificity, localization, and function. *Adv Lipid Res* 14:75-126.
29. Haan, G. J., R. J. Baerends, A. M. Krikken, M. Otzen, M. Veenhuis, and I. J. van der Klei. 2006. Reassembly of peroxisomes in *Hansenula polymorpha* pex3 cells on reintroduction of Pex3p involves the nuclear envelope. *FEMS Yeast Res* 6:186-94.
30. Hacker, U., R. Albrecht, and M. Maniak. 1997. Fluid-phase uptake by macropinocytosis in *Dictyostelium*. *J Cell Sci* 110:105-12.
31. Halperin, M. L., B. H. Robinson, and I. B. Fritz. 1972. Effects of palmitoyl CoA on citrate and malate transport by rat liver mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 69:1003-7.
32. Hamilton, J. A., W. Guo, and F. Kamp. 2002. Mechanism of cellular uptake of long-chain fatty acids: Do we need cellular proteins? *Mol Cell Biochem* 239:17-23.
33. Hanahan, D. 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 166:557-80.
34. Hisanaga, Y., H. Ago, N. Nakagawa, K. Hamada, K. Ida, M. Yamamoto, T. Hori, Y. Arii, M. Sugahara, S. Kuramitsu, S. Yokoyama, and M. Miyano. 2004. Structural basis of the substrate-specific two-step catalysis of long chain fatty acyl-CoA synthetase dimer. *J Biol Chem* 279:31717-26.
35. Hoepfner, D., D. Schildknecht, I. Braakman, P. Philippsen, and H. F. Tabak. 2005. Contribution of the endoplasmic reticulum to peroxisome formation. *Cell* 122:85-95.
36. Howard, P. K., K. G. Ahern, and R. A. Firtel. 1988. Establishment of a transient expression system for *Dictyostelium discoideum*. *Nucleic Acids Res* 16:2613-23.
37. Humbel, B. M., and E. Biegelmann. 1992. A preparation protocol for postembedding electron microscopy of *Dictyostelium discoideum* cells with monoclonal antibodies. *Scanning Microsc.* 6:817-825.
38. Jenne, N., R. Rauchenberger, U. Hacker, T. Kast, and M. Maniak. 1998. Targeted gene disruption reveals a role for vacuolin B in the late endocytic pathway and exocytosis. *J Cell Sci* 111:61-70.
39. Juguelin, H., J. J. Bessoule, and C. Cassagne. 1991. Interaction of amphiphilic substrates (acyl-CoAs) and their metabolites (free fatty acids) with microsomes from mouse sciatic nerves. *Biochim Biophys Acta* 1068:41-51.
40. Knoche, H., T. W. Esders, K. Koths, and K. Bloch. 1973. Palmitoyl coenzyme A inhibition of fatty acid synthesis. Relief by bovine serum albumin and mycobacterial polysaccharides. *J Biol Chem* 248:2317-22.
41. Kuerschner, L., C. S. Ejsing, K. Ekroos, A. Shevchenko, K. I. Anderson, and C. Thiele. 2005. Polyene-lipids: a new tool to image lipids. *Nat Methods* 2:39-45.



42. Kunau, W. H., S. Buhne, M. de la Garza, C. Kionka, M. Mateblowski, U. Schultz-Borchard, and R. Thieringer. 1988. Comparative enzymology of beta-oxidation. *Biochem Soc Trans* 16:418-20.
43. Kunau, W. H., V. Dommès, and H. Schulz. 1995. beta-oxidation of fatty acids in mitochondria, peroxisomes, and bacteria: a century of continued progress. *Prog Lipid Res* 34:267-342.
44. Lalonde, S., A. Weise, R. P. Walsh, J. M. Ward, and W. B. Frommer. 2003. Fusion to GFP blocks intercellular trafficking of the sucrose transporter SUT1 leading to accumulation in companion cells. *BMC Plant Biol* 3:8.
45. Lazarow, P. B. 2003. Peroxisome biogenesis: advances and conundrums. *Curr Opin Cell Biol* 15:489-97.
46. Lee, E., and D. A. Knecht. 2002. Visualization of actin dynamics during macropinocytosis and exocytosis. *Traffic* 3:186-92.
47. Loomis, W. F. 1975. *Dictyostelium discoideum*. A developmental system. Academic Press, New York.
48. Lu, X., J. Gruia-Gray, N. G. Copeland, D. J. Gilbert, N. A. Jenkins, C. Londos, and A. R. Kimmel. 2001. The murine perilipin gene: the lipid droplet-associated perilipins derive from tissue-specific, mRNA splice variants and define a gene family of ancient origin. *Mamm Genome* 12:741-9.
49. Malchow, D., O. Luderitz, B. Kickhofen, O. Westphal, and G. Gerisch. 1969. Polysaccharides in vegetative and aggregation-competent amoebae of *Dictyostelium discoideum*. 2. Purification and characterization of amoeba-degraded bacterial polysaccharides. *Eur J Biochem* 7:239-46.
50. Malchow, D., B. Nagele, H. Schwarz, and G. Gerisch. 1972. Membrane-bound cyclic AMP phosphodiesterase in chemotactically responding cells of *Dictyostelium discoideum*. *Eur J Biochem* 28:136-42.
51. Maniak, M. 2002. Conserved features of endocytosis in *Dictyostelium*. *Int Rev Cytol* 221:257-87.
52. Maniak, M. 1999. Green fluorescent protein in the visualization of particle uptake and fluid-phase endocytosis. *Methods Enzymol* 302:43-50.
53. Maniak, M., R. Rauchenberger, R. Albrecht, J. Murphy, and G. Gerisch. 1995. Coronin involved in phagocytosis: dynamics of particle-induced relocalization visualized by a green fluorescent protein Tag. *Cell* 83:915-24.
54. Martinez-Botas, J., J. B. Anderson, D. Tessier, A. Lapillonne, B. H. Chang, M. J. Quast, D. Gorenstein, K. H. Chen, and L. Chan. 2000. Absence of perilipin results in leanness and reverses obesity in *Lepr(db/db)* mice. *Nat Genet* 26:474-9.
55. Matsuoka, S., T. Saito, H. Kuwayama, N. Morita, H. Ochiai, and M. Maeda. 2003. MFE1, a member of the peroxisomal hydroxyacyl coenzyme A dehydrogenase family, affects fatty acid metabolism necessary for morphogenesis in *Dictyostelium* spp. *Eukaryot Cell* 2:638-45.
56. Miura, S., J. W. Gan, J. Brzostowski, M. J. Parisi, C. J. Schultz, C. Londos, B. Oliver, and A. R. Kimmel. 2002. Functional conservation for lipid storage droplet

- association among Perilipin, ADRP, and TIP47 (PAT)-related proteins in mammals, *Drosophila*, and *Dictyostelium*. *J Biol Chem* 277:32253-7.
57. Monnat, J., U. Hacker, H. Geissler, R. Rauchenberger, E. M. Neuhaus, M. Maniak, and T. Soldati. 1997. *Dictyostelium discoideum* protein disulfide isomerase, an endoplasmic reticulum resident enzyme lacking a KDEL-type retrieval signal. *FEBS Lett* 418:357-62.
  58. Moore, K. H., D. M. Dandurand, and F. L. Kiechle. 1992. Fasting induced alterations in mitochondrial palmitoyl-CoA metabolism may inhibit adipocyte pyruvate dehydrogenase activity. *Int J Biochem* 24:809-14.
  59. Munro, S., and H. R. Pelham. 1987. A C-terminal signal prevents secretion of luminal ER proteins. *Cell* 48:899-907.
  60. Murphy, D. J. 2001. The biogenesis and functions of lipid bodies in animals, plants and microorganisms. *Prog Lipid Res* 40:325-438.
  61. Nellen, W., C. Silan, and R. A. Firtel. 1984. DNA-mediated transformation in *Dictyostelium discoideum*: regulated expression of an actin gene fusion. *Mol Cell Biol* 4:2890-8.
  62. Neuhaus, E. M., W. Almers, and T. Soldati. 2002. Morphology and dynamics of the endocytic pathway in *Dictyostelium discoideum*. *Mol Biol Cell* 13:1390-407.
  63. Neuhaus, J. M., and J. C. Rogers. 1998. Sorting of proteins to vacuoles in plant cells. *Plant Mol Biol* 38:127-44.
  64. Nolta, K. V., J. M. Rodriguez-Paris, and T. L. Steck. 1994. Analysis of successive endocytic compartments isolated from *Dictyostelium discoideum* by magnetic fractionation. *Biochim Biophys Acta* 1224:237-46.
  65. Normann, P. T., and T. Flatmark. 1978. Long-chain acyl-CoA synthetase and "outer" carnitine long-chain acyltransferase activities of intact brown adipose tissue mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 530:461-73.
  66. Padh, H., J. Ha, M. Lavasa, and T. L. Steck. 1993. A post-lysosomal compartment in *Dictyostelium discoideum*. *J Biol Chem* 268:6742-7.
  67. Pfanner, N., B. S. Glick, S. R. Arden, and J. E. Rothman. 1990. Fatty acylation promotes fusion of transport vesicles with Golgi cisternae. *J Cell Biol* 110:955-61.
  68. Pfanner, N., L. Orci, B. S. Glick, M. Amherdt, S. R. Arden, V. Malhotra, and J. E. Rothman. 1989. Fatty acyl-coenzyme A is required for budding of transport vesicles from Golgi cisternae. *Cell* 59:95-102.
  69. Pintsch, T., M. Satre, G. Klein, J. B. Martin, and S. C. Schuster. 2001. Cytosolic acidification as a signal mediating hyperosmotic stress responses in *Dictyostelium discoideum*. *BMC Cell Biol* 2:9.
  70. Raper, K. B. 1935. *Dictyostelium discoideum*, a new species of slime mold from decaying forest leaves. *J. Agric.Res.* 50:135-147.
  71. Raper, K. B., and N. R. Smith. 1939. The Growth of *Dictyostelium discoideum* upon Pathogenic Bacteria. *J Bacteriol* 38:431-45.

72. Rasmussen, J. T., J. Rosendal, and J. Knudsen. 1993. Interaction of acyl-CoA binding protein (ACBP) on processes for which acyl-CoA is a substrate, product or inhibitor. *Biochem J* 292 ( Pt 3):907-13.
73. Rauchenberger, R., U. Hacker, J. Murphy, J. Niewohner, and M. Maniak. 1997. Coronin and vacuolin identify consecutive stages of a late, actin-coated endocytic compartment in *Dictyostelium*. *Curr Biol* 7:215-8.
74. Resh, M. D. 1999. Fatty acylation of proteins: new insights into membrane targeting of myristoylated and palmitoylated proteins. *Biochim Biophys Acta* 1451:1-16.
75. Richards, M. R., J. D. Harp, D. S. Ory, and J. E. Schaffer. 2006. Fatty acid transport protein 1 and long-chain acyl coenzyme A synthetase 1 interact in adipocytes. *J Lipid Res* 47:665-72.
76. Rosendal, J., P. Ertbjerg, and J. Knudsen. 1993. Characterization of ligand binding to acyl-CoA-binding protein. *Biochem J* 290 ( Pt 2):321-6.
77. Rupper, A., and J. Cardelli. 2001. Regulation of phagocytosis and endo-phagosomal trafficking pathways in *Dictyostelium discoideum*. *Biochim Biophys Acta* 1525:205-16.
78. Saiki, R. K., S. Scharf, F. Faloona, K. B. Mullis, G. T. Horn, H. A. Erlich, and N. Arnheim. 1985. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230:1350-4.
79. Salomons, F. A., I. J. van der Klei, A. M. Kram, W. Harder, and M. Veenhuis. 1997. Brefeldin A interferes with peroxisomal protein sorting in the yeast *Hansenula polymorpha*. *FEBS Lett* 411:133-9.
80. Shani, N., and D. Valle. 1996. A *Saccharomyces cerevisiae* homolog of the human adrenoleukodystrophy transporter is a heterodimer of two half ATP-binding cassette transporters. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:11901-6.
81. Shindo, Y., and T. Hashimoto. 1978. Acyl-Coenzyme A synthetase and fatty acid oxidation in rat liver peroxisomes. *J Biochem (Tokyo)* 84:1177-81.
82. Shrago, E., A. Shug, C. Elson, T. Spennetta, and C. Crosby. 1974. Regulation of metabolic transport in rat and guinea pig liver mitochondria by long chain fatty acyl coenzyme A esters. *J Biol Chem* 249:5269-74.
83. Simpson, P. A., J. A. Spudich, and P. Parham. 1984. Monoclonal antibodies prepared against *Dictyostelium* actin: characterization and interactions with actin. *J Cell Biol* 99:287-95.
84. Sleeman, M. W., N. P. Donegan, R. Heller-Harrison, W. S. Lane, and M. P. Czech. 1998. Association of acyl-CoA synthetase-1 with GLUT4-containing vesicles. *J Biol Chem* 273:3132-5.
85. Snyers, L., E. Umlauf, and R. Prohaska. 1999. Association of stomatin with lipid-protein complexes in the plasma membrane and the endocytic compartment. *Eur J Cell Biol* 78:802-12.
86. Snyers, L., E. Umlauf, and R. Prohaska. 1999. Cysteine 29 is the major palmitoylation site on stomatin. *FEBS Lett* 449:101-4.

87. South, S. T., K. A. Sacksteder, X. Li, Y. Liu, and S. J. Gould. 2000. Inhibitors of COPI and COPII do not block PEX3-mediated peroxisome synthesis. *J Cell Biol* 149:1345-60.
88. Souza, G. M., D. P. Mehta, M. Lammertz, J. Rodriguez-Paris, R. Wu, J. A. Cardelli, and H. H. Freeze. 1997. Dictyostelium lysosomal proteins with different sugar modifications sort to functionally distinct compartments. *J Cell Sci* 110 ( Pt 18):2239-48.
89. Tansey, J. T., C. Sztalryd, J. Gruia-Gray, D. L. Roush, J. V. Zee, O. Gavrilova, M. L. Reitman, C. X. Deng, C. Li, A. R. Kimmel, and C. Londos. 2001. Perilipin ablation results in a lean mouse with aberrant adipocyte lipolysis, enhanced leptin production, and resistance to diet-induced obesity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:6494-9.
90. Tauchi-Sato, K., S. Ozeki, T. Houjou, R. Taguchi, and T. Fujimoto. 2002. The surface of lipid droplets is a phospholipid monolayer with a unique Fatty Acid composition. *J Biol Chem* 277:44507-12.
91. Teixeira, L., C. Rabouille, P. Rorth, A. Ephrussi, and N. F. Vanzo. 2003. Drosophila Perilipin/ADRP homologue Lsd2 regulates lipid metabolism. *Mech Dev* 120:1071-81.
92. Temesvari, L. A., J. M. Bush, M. D. Peterson, K. D. Novak, M. A. Titus, and J. A. Cardelli. 1996. Examination of the endosomal and lysosomal pathways in Dictyostelium discoideum myosin I mutants. *J Cell Sci* 109 ( Pt 3):663-73.
93. Titorenko, V. I., and R. A. Rachubinski. 1998. Mutants of the yeast Yarrowia lipolytica defective in protein exit from the endoplasmic reticulum are also defective in peroxisome biogenesis. *Mol Cell Biol* 18:2789-803.
94. Troll, H., D. Malchow, A. Muller-Taubenberger, B. Humbel, F. Lottspeich, M. Ecke, G. Gerisch, A. Schmid, and R. Benz. 1992. Purification, functional characterization, and cDNA sequencing of mitochondrial porin from Dictyostelium discoideum. *J Biol Chem* 267:21072-9.
95. Umlauf, E., E. Csaszar, M. Moertelmaier, G. J. Schuetz, R. G. Parton, and R. Prohaska. 2004. Association of stomatin with lipid bodies. *J Biol Chem* 279:23699-709.
96. van Roermund, C. W., H. F. Tabak, M. van Den Berg, R. J. Wanders, and E. H. Hetteema. 2000. Pex11p plays a primary role in medium-chain fatty acid oxidation, a process that affects peroxisome number and size in Saccharomyces cerevisiae. *J Cell Biol* 150:489-98.
97. Vanhove, G. F., P. P. Van Veldhoven, M. Fransen, S. Denis, H. J. Eyssen, R. J. Wanders, and G. P. Mannaerts. 1993. The CoA esters of 2-methyl-branched chain fatty acids and of the bile acid intermediates di- and trihydroxycoprostanic acids are oxidized by one single peroxisomal branched chain acyl-CoA oxidase in human liver and kidney. *J Biol Chem* 268:10335-44.
98. von Löhneysen, K. 2003. Funktionelle Analyse der LC-FACS in Dictyostelium discoideum. Dissertation.
99. von Löhneysen, K., N. Pawolleck, H. Rühling, and M. Maniak. 2003. A Dictyostelium long chain fatty acyl coenzyme A-synthetase mediates fatty acid retrieval from endosomes. *Eur J Cell Biol* 82:505-14.

100. Wanders, R. J., P. Vreken, S. Ferdinandusse, G. A. Jansen, H. R. Waterham, C. W. van Roermund, and E. G. Van Grunsven. 2001. Peroxisomal fatty acid alpha- and beta-oxidation in humans: enzymology, peroxisomal metabolite transporters and peroxisomal diseases. *Biochem Soc Trans* 29:250-67.
101. Watkins, P. A., J. F. Lu, S. J. Steinberg, S. J. Gould, K. D. Smith, and L. T. Braiterman. 1998. Disruption of the *Saccharomyces cerevisiae* FAT1 gene decreases very long-chain fatty acyl-CoA synthetase activity and elevates intracellular very long-chain fatty acid concentrations. *J Biol Chem* 273:18210-9.
102. Watts, D. J., and J. M. Ashworth. 1970. Growth of myxameobae of the cellular slime mould *Dictyostelium discoideum* in axenic culture. *Biochem J* 119:171-4.
103. Wienke, D., A. Drengk, C. Schmauch, N. Jenne, and M. Maniak. 2006. Vacuolin, a flotillin/reggie-related protein from *Dictyostelium* oligomerizes for endosome association. *Eur J Cell Biol* 85:991-1000.
104. Wienke, D. C., M. L. Knetsch, E. M. Neuhaus, M. C. Reedy, and D. J. Manstein. 1999. Disruption of a dynamin homologue affects endocytosis, organelle morphology, and cytokinesis in *Dictyostelium discoideum*. *Mol Biol Cell* 10:225-43.
105. Zou, Z., C. C. DiRusso, V. Ctrnacta, and P. N. Black. 2002. Fatty acid transport in *Saccharomyces cerevisiae*. Directed mutagenesis of FAT1 distinguishes the biochemical activities associated with Fat1p. *J Biol Chem* 277:31062-71.
106. Zou, Z., F. Tong, N. J. Faergeman, C. Borsting, P. N. Black, and C. C. DiRusso. 2003. Vectorial acylation in *Saccharomyces cerevisiae*. Fat1p and fatty acyl-CoA synthetase are interacting components of a fatty acid import complex. *J Biol Chem* 278:16414-22.

## Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Markus Maniak. Für die Möglichkeit, meine Promotion in der Abteilung Zellbiologie anzufertigen und für die vielen Diskussionen und Ratschläge. Außerdem danke ich ihm dafür, dass er mich auch in meinen anstrengenden Phasen unterstützt hat.

Wolfgang Nellen danke ich für die Übernahme des Ko-Referats. Er musste schon während meines Studiums meine bohrenden Fragen ertragen. Dies hat sich in den letzten 3 ½ Jahren nicht geändert. Danke dafür.

Christian Schmauch und Iris Müller danke ich für 3 ½ Jahre während Super-Zusammenarbeit. Diskussionen, mahnende Worte, und hilfreiche Ideen und feucht fröhliche Feste habe ich gern mit Euch erlebt.

Ralf Rethmeier danke ich für die Durchführung des radioaktiven Assays in letzter Minute.

Harald Rühling danke ich für die zahlreichen Hilfestellungen; die sowohl technische als auch bürokratische Unterstützung war nötig.

Heike, Kerstin und den Mitarbeitern, die uns bereits verlassen haben danke ich für die bestmögliche Zusammenarbeit, die man sich wünschen kann.

Gleiches gilt auch für die Mitarbeiter der Abteilungen Genetik und Entwicklungsbiologie. Den einen für Unterhaltung im Kulturraum und geistige und materielle Unterstützung. Den anderen für heiße Diskussionen am Mittagstisch, die nicht immer ganz so wissenschaftlich waren.

Last but not least möchte ich meiner Familie danken. Allen voran Pawo, der mich in allen Lebenslagen erträgt. Auch der Rest meiner Familie hat mich immer unterstützt und an mich geglaubt. Danke dafür. Mein besonderer Dank gilt hier meiner Schwiegermutter Karin Pawolleck, die meine Arbeit Korrektur gelesen hat.