

**Charakterisierung der endosomalen Membranproteine
DdLmp B/C aus *Dictyostelium discoideum* und biochemische
Analyse der Stimulierung der bakteriellen Kinase YopO
aus *Yersinia enterocolitica* durch Aktin**

**Dissertation
der Fakultät für Biologie der
Ludwig-Maximilians-Universität
München**

vorgelegt von

Rene Rost

aus

Waren/Müritz

Ehrenwörtliche Versicherung

Diese Dissertation wurde selbstständig und ohne unerlaubte Hilfsmittel angefertigt.

München, Juli 2003

Rene Rost

Dissertation eingereicht:

15. Juli 2003

Erstgutachter:

Prof. Dr. H. MacWilliams

Zweitgutachter:

Prof. Dr. C. David

Sondergutachter:

Prof. Dr. M. Schleicher

Tag der mündlichen Prüfung:

03. Februar 2004

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Janssen, K.P., **Rost, R.** und Schleicher, M. (2001). Characterization of CD36/LIMP2 homologues in *Dictyostelium discoideum*. *Supplement to Mol. Biol. Cell* **11**:141a abstract 733

Janssen, K.P., **Rost, R.**, Eichinger, L., und Schleicher, M. (2001). Characterization of CD36/LIMP2 homologues in *Dictyostelium discoideum*. *J. Biol. Chem.* **42**:38899-38910.

Rost, R., Yueksekdogan, G., Vogel, A., Aepfelbacher, M. und Schleicher, M. (2003). Biochemical characterisation of the interaction between Yersinia YopO kinase and eukaryotic cytoskeletal proteins. *Supplement to Eur. J. Cell Biol.* **53**:77

Rost, R., Yueksekdogan, G., Vogel, A., Aepfelbacher, M. und Schleicher, M. Biochemical characterisation of the interaction between Yersinia YopO kinase and actin. (Manuskript in Arbeit).

Der experimentelle Teil der vorliegenden Arbeit wurde von Januar 2000 bis Oktober 2002 an der Ludwig-Maximilians-Universität München, Adolf-Butenandt-Institut für Zellbiologie, unter der Anleitung von Prof. Dr. M. Schleicher angefertigt. Die Betreuung der Arbeit erfolgte durch Prof. Dr. H. MacWilliams, Zoologisches Institut der Ludwig-Maximilians-Universität München.

Inhaltsverzeichnis	I
Zusammenfassung	VI
Summary	VIII
1 Einleitung	1
1.1 Das Aktin-Zytoskelett	1
1.2 <i>Dictyostelium discoideum</i> als Modellorganismus	1
1.3. Endozytose in <i>D. discoideum</i>	3
1.4. Die CD36/LIMPII-Familie	4
1.4.1. Die LIMPII-Subgruppe in <i>D. discoideum</i>	5
1.5. Das Pathogen <i>Yersinia</i>	6
1.5.1. Der Sekretions- und Translokationsapparat	7
1.5.2. Die Yop-Effektorproteine	8
1.5.3. YpkA/YopO	9
1.6. Aufgabenstellung	10
2 Material & Methoden	12
2.1 Material	12
2.1.1 Enzyme, Antikörper, Inhibitoren und Antibiotika	12
2.1.1.1 <i>Enzyme für die Molekularbiologie</i>	12
2.1.1.2 <i>Enzyme für die Protein-Biochemie</i>	12
2.1.1.3 <i>Antikörper</i>	12
2.1.1.4 <i>Inhibitoren</i>	13
2.1.1.5 <i>Antibiotika</i>	13
2.1.2 Reagenzien	13
2.1.3 Medien	14
2.1.3.1 <i>Medien für die <i>D. discoideum</i>-Kultur</i>	14
2.1.3.2 <i>Medien für die <i>E. coli</i>-Kultur</i>	15
2.1.4 Puffer und andere Lösungen	15
2.1.5 Bakterienstämme	16
2.1.6 <i>Dictyostelium discoideum</i>-Stämme	16

2.1.7 Vektoren	16
2.1.8 Geräte	17
2.1.9 Sonstige Materialien	17
2.1.10 Zentrifugen und Rotoren	18
2.1.11 Computerprogramme	18
2.2 Kultur von <i>D. discoideum</i>	19
2.2.1 Anzucht in Flüssigmedium (Claviez et al., 1982)	19
2.2.2 Anzucht auf Agarplatten	19
2.2.3 Entwicklung von <i>D. discoideum</i>	19
2.2.4 Sporenkonservierung	19
2.2.5 Einfrieren von <i>D. discoideum</i>-Zellen	20
2.3 Molekularbiologische Methoden	20
2.3.1 Präparation von Plasmid-DNA	20
2.3.1.1 <i>Präparation von Plasmid-DNA nach Holmes und Quigley (1981)</i>	20
2.3.1.2 <i>Präparation von Plasmid-DNA nach der Qiagen-Methode</i>	21
2.3.2 Präparation chromosomaler DNA aus <i>D. discoideum</i>	21
2.3.2.1 <i>Isolierung qualitativ hochwertiger chromosomaler DNA nach Noegel et al. (1985)</i>	21
2.3.2.2 <i>Isolierung chromosomaler DNA für "knock-out"-screening mittels PCR</i>	22
2.3.3 Verdau mit Restriktionsenzymen	22
2.3.4 Elektrophorese von DNA in Agarosegelen (Sambrook et al., 1989)	23
2.3.5 Fragment-Isolierung aus DNA-Gelen mit dem QIAquick Gel Extraction Kit	23
2.3.6 "Southern-Blotting"	23
2.3.7 Radioaktive Markierung von DNA-Proben	24
2.3.8 Hybridisierung mit radioaktiv markierten Proben	24
2.3.9 Amplifizierung von Nukleinsäuresequenzen	25
2.3.9.1 <i>Oligonukleotide</i>	25
2.3.9.2 <i>Polymerase-Kettenreaktion (PCR)</i>	26
2.3.10 Phosphatase-Behandlung (Sambrook et al., 1989)	27
2.3.11 Überführung überstehender Enden in glatte Enden (Sambrook et al., 1989)	27
2.3.12 DNA-Ligase-Reaktion	27
2.3.13 Transformation von <i>E. coli</i>	28
2.3.13.1 <i>Präparation kompetenter Zellen</i>	28
2.3.13.2 <i>Transformation von <i>E. coli</i></i>	28

2.3.14 <i>E. coli</i> -Dauerkulturen	29
2.3.15 Transformation von <i>D. discoideum</i>	29
2.3.16 Klonierung der Transformanten von <i>D. discoideum</i>	29
2.3.17 Konstrukte zur Gendisruption von <i>DdlmpB</i> und <i>DdlmpC</i>	30
2.4 Proteinchemische und immunologische Methoden	31
2.4.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	31
2.4.2 Coomassie-Blau-Färbung von Proteinen	32
2.4.3 Immunoblot ("Western-Blot") – Nachweis der Antigene durch Chemilumineszenz	32
2.4.4 Proteinbestimmung	33
2.4.4.1 Proteinbestimmung nach Bradford	33
2.4.4.2 Proteinbestimmung nach Lowry	33
2.4.5 Aufreinigung und Markierung von Aktin	34
2.4.5.1 Präparation von Aktin aus Kaninchenmuskel	34
2.4.5.2 Pyren-Markierung von Aktin	35
2.4.6 Nachweis der Aktinbindung	36
2.4.6.1 Fluoreszenzspektroskopie	36
2.4.6.2 Nachweis der Actinbindung durch Kosedimentation mit F-Aktin	36
2.4.7 Kinase-Assay	37
2.4.8 Induktion und Reinigung von rekombinantem his-DdLmpC aus <i>E. coli</i>	37
2.4.9 Induktion und Reinigung von GST-Rac1, GST-RhoA und GST-CDC42	39
2.4.10 Analytischer Protease-Verdau	39
2.4.11 Zellfraktionierung	40
2.4.12 Messung von Enzymaktivitäten in subzellulären Fraktionen	40
2.4.13 Herstellung von polyklonalen Antiseren aus Kaninchen	41
2.4.14 Affinitätsreinigung von polyklonalem Antikörper	41
2.5 Zellbiologische Methoden	42
2.5.1 Indirekte Immunfluoreszenz	42
2.5.2 Nachweis von Makropinosomen und Endosomen	43
2.5.3 Konfokale Mikroskopie	43
3 Ergebnisse	44
3.1 Biochemische und zellbiologische Charakterisierung von DdLmpB und DdLmpC	44

3.1.1 Expression eines C-terminalen <i>DdlmpC</i>-Fragmentes in <i>E. coli</i>	44
3.1.2 Spezifität der Antiseren 7654, 7655, 7656 und 7657	47
3.1.3 Expression von DdLmpB und DdLmpC in RB2-Zellen	49
3.1.4 Nachweis der Topologie durch analytische Protease-Behandlung	49
3.1.5 Intrazelluläre Lokalisation von DdLmpB und DdLmpC in <i>D. discoideum</i>	51
3.1.5.1 Zellfraktionierung	51
3.1.5.2 Immunfluoreszenz-Untersuchungen	53
3.1.6 Wachstumsabhängige Expression von DdLmpA, DdlmpB und DdLmpC	55
3.2 Molekularbiologische Charakterisierung von <i>DdlmpB</i> und <i>DdlmpC</i>	56
3.2.1 <i>DdlmpB</i> - und <i>DdlmpC</i> -Konstrukte für die Gendisruption	56
3.2.2 Southern-Blot verschiedener DdLmpB-negativer Klone	56
3.3 Biochemische Charakterisierung der Interaktion der Yersinia YopO-Kinase mit eukaryontischen Zytoskelettproteinen	59
3.3.1 Kosedimentation von YopO und YopO K269A mit Aktin	59
3.3.2 YopO als GST-Fusionsprotein	61
3.3.3 Kinase-Assays	61
3.3.3.1 Aktivierung der Autophosphorylierung von YopO durch G-Aktin	61
3.3.3.2 Untersuchung des Einflusses einiger aktinbindender Proteine oder aktin-modifizierender Substanzen auf die Aktivierung der Autophosphorylierung von YopO durch Aktin	61
3.3.3.3 MBP ("myelin basic protein"), Histon-TypIII und Casein als künstliche Substrate von GST-YopO	65
3.3.3.4 Vergleich von Muskel- und Nichtmuskelaktin als Aktivator der Autophosphorylierung von YopO	69
3.3.3.5 Untersuchungen zum Einfluß verschiedener GTPasen auf die Aktivierung von YopO	70
3.3.3.6 Untersuchungen zur Oligomerisierung von YopO	72
3.3.4 Untersuchungen zum Einfluß verschiedener YopO-Konstrukte auf die Polymerisierung von Aktin mittels Fluoreszenzspektroskopie	74
4 Diskussion	76
4.1 DdLmpB und DdLmpC	76
4.1.1 Die Membran-Topologie der DdLmp-Homologen	76

4.1.2 Intrazelluläre Lokalisation von DdLmpB und DdLmpC	77
<i>4.1.2.1 Die Sortierungssignale der DdLmp-Proteine</i>	78
<i>4.1.2.2 Die DdLmp-Proteine und die Makropinozytose</i>	79
<i>4.1.2.3 Die Rolle von PI(4,5)P₂ und PI(3,4,5)P₃ bei der Macropinozytose</i>	80
<i>4.1.2.4 Die DdLmp-Proteine und die Endosomenreifung</i>	81
4.1.3 Die Entwicklungsregulation der DdLmp-Proteine	82
4.2 Biochemische Charakterisierung der Interaktion zwischen YopO und Aktin	83
4.2.1 Bindung und Aktivierung der Kinase YopO durch Aktin	83
4.2.2 Der Einfluß von YopO auf die Aktin-Polymerisierung	85
4.2.3 Der Einfluß aktinbindender Proteine und Substanzen auf die Aktivierung der Kinase YopO durch Aktin	86
4.2.4 YopO, Aktin und die basischen Substrate	87
4.2.5 YopO, Aktin und die GTPasen	88
5 Literaturverzeichnis	89
Abbildungsverzeichnis	98
ABKÜRZUNGEN	100
Lebenslauf	103
Danksagung	104

Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit hatte zum Ziel, (i) die regulatorische Funktion bestimmter integraler Membranproteine im *Dictyostelium* Zytoskelett und (ii) die biochemische Interaktion einer Kinase eines infektiösen Bakteriums mit Aktin aus der Wirtszelle genauer zu analysieren.

(i) Die ubiquitären Mitglieder der CD36/LIMP-II-Familie sind integrale Membranproteine, die als Lipidrezeptoren und Zelladhäsionsproteine in der Plasmamembran oder - mit bisher unbekannter Funktion - in Membranen endosomaler Vesikel vorkommen. In *Dictyostelium discoideum* führte die Inaktivierung eines lysosomalen Membranproteins aus dieser Gruppe zur Suppression des Phänotyps einer Profilin-minus Mutante. Im Zuge der vollständigen Sequenzierung des *D. discoideum*-Genoms konnte festgestellt werden, daß es neben diesem DdLmpA noch die beiden weiteren homologen Proteine DdLmpB und DdLmpC gibt. Da der Mechanismus der Suppression des Profilin-minus Phänotyps ungeklärt ist, wurden die beiden Isoformen im Rahmen der vorliegenden Arbeit genauer charakterisiert.

Sowohl für DdLmpB wie auch für DdLmpC konnte die familientypische Membran-Topologie einer Haarnadelstruktur nachgewiesen werden. Dabei weist die zentrale, lumenale Domäne beider Proteine zahlreiche Glykosylierungen auf. Durch Immunofluoreszenz und Saccharosegradienten wurde die Lokalisation der drei Isoformen an endolysosomalen Vesikeln nachgewiesen. Es stellte sich dabei heraus, daß die drei DdLmp-Proteine in unterschiedlichen Vesikelpopulationen auftraten. Auch "pulse-chase"-Experimente mit TRITC-Dextran und nachfolgender Markierung der Vesikel mit DdLmp-spezifischen Antikörpern ergaben unterscheidbare Zeitmuster für die Rekrutierung der Membranproteine in Vesikeln. Die für DdLmpA oft beobachtete Kolo-kalisation mit Makropinosomen konnte z.B. für DdLmpB und DdLmpC nur selten festgestellt werden. Nach zahlreichen Versuchen und der Konstruktion von verschiedenen Vektoren konnte am Ende der praktischen Arbeiten eine DdLmpB-minus Mutante im Wildtyp-Hintergrund isoliert werden.

(ii) Im zweiten Teil der Arbeit wurde die in der Literatur beschriebene Interaktion zwischen Aktin und der Kinase YopO, die durch *Yersinia enterocolitica* als Effektorprotein in die Wirtszelle transloziert wird, biochemisch genauer untersucht. Es konnte festgestellt werden, daß G-Aktin und nicht F-Aktin für die Aktivierung der YopO-Kinase verantwortlich ist. Dabei tritt Nichtmuskel-Aktin im Vergleich zum Muskel-Aktin als ein deutlich besserer Aktivator

von YopO auf. Obwohl die aktivierte Kinase *in vivo* das Aktin-Zytoskelett beeinflusst, ist Aktin offensichtlich kein Substrat von YopO. Mittels Fluoreszenzspektroskopie konnte gezeigt werden, daß sowohl die native Kinase YopO als auch das durch Punktmutation inaktivierte YopO K269A die Polymerisierungskinetik von Aktin behindern. Für eine mutmaßliche Aktin-Binderegion von 20 Aminosäuren aus dem C-terminalen Ende konnte hingegen kein Effekt beobachtet werden. Der Einfluß von aktinbindenden Proteinen, aktinmodifizierenden Substanzen und YopO-bindenden GTPasen auf die Aktivierung der Kinase durch Aktin deutet darauf hin, dass die Aktivität der Kinase in der Wirtszelle nicht nur durch Aktin alleine, sondern auch durch weitere Zytoskelett-Komponenten reguliert wird.

Summary

The thesis aimed at the analysis of (i) the regulatory function of selected integral membrane proteins during dynamical rearrangements of the *Dictyostelium* cytoskeleton, and (ii) the biochemical interaction between a kinase of an infectious bacterium and actin from the host cell.

(i) The ubiquitous members of the CD36/LIMPII superfamily are integral membrane proteins, which have been described as fatty acid transporters and cell adhesion proteins in the plasma membrane, or - with so far unknown function - in the membrane of endosomal vesicles. In *Dictyostelium discoideum* inactivation of a lysosomal membrane protein of this group (DdLmpA) suppressed the aberrant phenotype of profilin-minus cells. In the course of complete sequencing of the *D. discoideum* genome the two additional homologous proteins DdLmpB and DdLmpC have been identified. Since the mechanism of the suppression of the profilin-minus phenotype by the disruption of the DdLmpA gene is still unsettled, the two isoforms were characterized in more detail in the context of the thesis.

Both for DdLmpB as well as for DdLmpC the typical membrane topology of a hairpin structure could be proven. The central, luminal domain of both proteins is heavily glycosylated. The localization of the three isoforms was analyzed by immunofluorescence and differential centrifugation on sucrose gradients and the membrane proteins found to be characteristic constituents of distinguishable endolysosomal vesicle populations. Pulse/chase experiments with TRITC-dextrane and labelling of the vesicles with DdLmp-specific antibodies confirmed these results. Colocalization with macropinosomes was not as often observed for DdLmpB and DdLmpC than for DdLmpA. Despite of numerous attempts and the construction of different vectors, a DdLmpB-minus mutant in the background of wild type cells could be isolated only at the end of the practical work. Therefore, the originally intended isolation and analysis of *DdLmpB* and *DdLmpC* gene disruptions in the profilin-minus mutant could not be accomplished.

(ii) In the second part of the work the interaction between actin and the bacterial kinase YopO which is translocated by *Yersinia enterocolitica* as effector protein into the eukaryotic host cell, was examined at the biochemical level. It could be shown that globular actin and not actin filaments were responsible for the activation of YopO kinase. In comparison, non-muscle actin was a better activator of YopO kinase activity than muscle actin. Although the

activated kinase affects *in vivo* the actin cytoskeleton, actin itself is not phosphorylated. By means of fluorescence spectroscopy it could be shown that both the native kinase YopO and the kinase-dead mutant YopO K269A inhibited polymerization kinetics of actin. However, no effect could be observed for a putative actin binding region of 20 amino acids from the very C-terminal end. The influence of actin-binding proteins, actin-modifying substances and YopO-binding GTPases on the actin-dependent stimulation of the kinase suggests that the activity of the kinase in the host cell is being regulated not only by actin alone, but also by other cytoskeletal components.

1 Einleitung

1.1 Das Aktin-Zytoskelett

Das Zytoskelett in Zellen höherer Organismen besteht aus Mikrofilamenten (\varnothing ca. 6-10 nm), Intermediärfilamenten (\varnothing 10 nm) und Mikrotubuli (\varnothing 24 nm). Die Mikrofilamente bestehen aus Aktin, das abundant in einer eukaryontischen Zelle vorliegt und im Verlauf der Evolution hochkonserviert erhalten geblieben ist. Das Aktinfilament (F-Aktin) entsteht durch Polymerisierung der globulären, monomeren Moleküle (G-Aktin). Beim Entstehen dieser Makromoleküle unterscheidet man ein schnell wachsendes Plus-Ende und ein langsam wachsendes Minus-Ende. Voraussetzung für die Polymerisation ist das Erreichen einer "kritischen" Aktinkonzentration, die *in vitro* für das Plus-Ende bei 0,8 $\mu\text{Mol/l}$ und für das langsam wachsende Ende bei 0,1 $\mu\text{Mol/l}$ liegt.

Die Dynamik im Nichtmuskel-Aktin-Zytoskelett wird durch eine Vielzahl Aktin-bindender Proteine gewährleistet. Zum einen sind G-Aktin-bindende Proteine wie z.B. Profilin zu erwähnen. Durch die Bildung des Profilaktin-Komplexes ist das G-Aktin nicht mehr frei verfügbar und verschiebt das Gleichgewicht vom polymeren zum monomeren Aktin. Andere Proteine wie z.B. Cortexillin binden an F-Aktin und vernetzen die Filamente zu Bündeln. Membranassoziierte Proteine wie Talin stellen einen Kontakt zwischen dem Zytoskelett und bestimmten Membranstrukturen her. Myosine als Motormoleküle gleiten auf dem Aktinstrang entlang und sind in der Lage, chemische Energie in eine gerichtete mechanische Kraft umzuwandeln. Aktinfilamente können in vielen Nichtmuskel-Zellen in hochorganisierten, dynamischen Strukturen wie Stressfasern (Aktinfilamentbündel), Filopodien (fingerförmige Zellfortsätze), Lamellipodien (dünne, blattähnliche Zellausläufer) oder "crowns" (kronenförmige Ausstülpungen an der Zelloberfläche, die z.B. der Phagozytose vorangehen) angeordnet werden. (Kreis und Vale, 1999)

1.2 *Dictyostelium discoideum* als Modellorganismus

D. discoideum, 1935 erstmals von K. Raper beschrieben, wird derzeit der Klasse der Myxomyceten zugeordnet. Der Organismus weist etliche Eigenschaften auf, die dazu führten, daß *D. discoideum* als Modellsystem im Labor etabliert wurde. Die hochbeweglichen Zellen sind gut für die Untersuchung des Zytoskeletts und seiner zellulären Funktionen geeignet, da sie die Fähigkeit zur Chemotaxis, Pseudopodienbildung und Endozytose besitzen. Ihr

haploider Chromosomensatz und ihre leichte Anzucht im Labor erleichtern zudem die zellbiologischen und biochemischen Arbeiten.

In den letzten Jahren etablierte sich *Dictyostelium* auch als Modellsystem für die intrazellulären humanpathogenen *Legionellen* und *Pseudomonaden* (Skriwan et al., 2002; Cosson et al., 2002). Durch die gezielte Ausschaltung von Genen des Wirtes bzw. des Parasiten kann man deren Einfluß auf die Pathogenität der Mikroorganismen studieren. Gleichzeitig erlaubt es aber auch, einen Einblick in verschiedene intrazelluläre Mechanismen der Wirtszelle zu gewinnen. Dies betrifft z.B. den Mechanismus der Phagozytose und andere Prozesse, in denen das Zytoskelett eine Rolle spielt.

Die Amöbe ist weiterhin auch unter entwicklungsbiologischen Gesichtspunkten interessant, da der einzellige Organismus unter Nahrungsmangel einen asexuellen Entwicklungszyklus durchführt. Dabei produzieren die Zellen cAMP, ein Signalmolekül, welches unter diesen Umständen nach Außen sezerniert wird und eine Aggregation von ungefähr 10^5 Zellen zur Folge hat. Häufig entsteht aus den Aggregaten ein vielzelliges, wurmförmiges Pseudoplasmodium ("slug"), welches sich kriechend fortbewegen kann und nach weiteren Differenzierungen einen Fruchtkörper ausbildet, der aus Sporen- und Stielzellen besteht. Aus den Sporen schlüpfen dann unter günstigen Nahrungsbedingungen wieder Amöben (Loomis, 1996).

Für die genetische Manipulation von *Dictyostelium* ist ein leicht und schnell durchführbares Transformationsprotokoll entwickelt worden (Nellen et al., 1984). Dabei erlaubt das Vorhandensein verschiedener Selektionsmarker z.B. Neomycin (Nellen et al., 1984), Hygromycin (Egelhoff et al., 1989), Phleomycin (Leiting und Noegel, 1991) und Blasticidin (Adachi et al., 1994) das Isolieren von Einfach- und Mehrfachmutanten. Für die Generierung dieser Mutanten sind verschiedene Ansätze verfügbar: (a) die gezielte Gendisruption (DeLozanne und Spudich, 1987; Witke et al., 1987), (b) das "gene replacement" (Manstein et al., 1989), (c) eine durch "antisense"-RNA vermittelte Geninaktivierung (Knecht und Loomis, 1987), (d) die "restriction-enzyme-mediated-integration" (REMI) (Kuspa und Loomis, 1992), (e) die Expression einer "ochre"-Suppressormutante einer tRNA ($tRNA^{Glu}II(UUA)$), negative Selektion, Morrison et al., 1997) und (f) ein bisher unveröffentlichtes *cre/lox*-System (mündliche Mitteilung von Alan Kimmel) ein. Zudem steht das *Dictyostelium*-Genom vor seiner vollständigen Sequenzierung, die vermutlich im Jahre 2003 beendet sein wird. Die Sequenzdaten des Chromosoms 2 liegen schon jetzt in Datenbanken vor (Glöckner et al., 2002).

1.3. Endozytose in *D. discoideum*

Unter natürlichen Bedingungen kommt *D. discoideum* im Waldboden vor, wo er sich von Bakterien und Hefen ernährt. Dabei erfolgt die Aufnahme dieser Mikroorganismen und anderer Partikel mit Hilfe der Phagozytose. Da axenische Laborstämme eine 2- bis 10-fach höhere Pinozytoserate im Vergleich zu Makrophagen oder Neutrophilen aufweisen, eignet sich *D. discoideum* generell sehr gut für die Untersuchung der Endozytose (Thilo, 1985). Studien, die sich mit dem molekularen Mechanismus der Vesikelentstehung an der Plasmamembran beschäftigen, zeigten große Ähnlichkeiten zu höheren eukaryontischen Zellen. Die hauptsächliche Flüssigkeitsaufnahme erfolgt durch Makropinozytose, einem Prozess, der abhängig ist von Aktin, Coronin und anderen Aktin-bindenden Proteinen (Maniak, 2001). Dabei spielen Rac-GTPasen und Phosphatidylinositol-3-Kinasen wichtige regulatorische Rollen (Rupper und Cardelli, 2001). Die normale Pinozytose scheint ein alternativer Weg zu sein, da im Gegensatz zur Makropinozytose ein "knock-out" der schweren Kette von Clathrin eine 80%-ige Reduzierung der Pinozytose zur Folge hatte (O'Halloran und Anderson, 1992; Ruscetti et al., 1994). Nach der vollständigen Vesikelbildung und der Befreiung von der nicht mehr gebrauchten Hülle wird der Vesikelinhalt durch Protonenpumpen rasch angesäuert und durch zahlreiche lysosomale Enzyme (z.B. CathepsinD), die Mannose-6-sulfat- oder GlcNAc-1-phosphat-Modifikationen aufweisen, verdaut (Souza et al., 1997). Diese lysosomalen Enzyme stammen von Transportvesikeln, die nun fortlaufend mit dem Endosom fusionieren. Hierbei scheinen verschiedene Rab-GTPasen, Clathrin und Dynamin wichtige Rollen zu spielen. Vermutlich sind sie auch für eine Verbindung zwischen dem kontraktile Vakuolensystem und den Endolysosomen entscheidend (Maniak, 2001; Neuhaus und Soldati, 1999). Andere Transportvesikel schnüren sich vom Endosom ab und bringen Membranmaterial zurück zur Zelloberfläche (Neuhaus und Soldati, 2000). Nach einer Zeit von ungefähr 30 min wird der pH-Wert wieder auf einen neutralen Level erhöht und andere lysosomale Proteine (z.B. α -Mannosidase), die Man-6-P-O-CH₃-Modifikationen aufweisen, werden zu Endolysosomen transportiert (Souza et al., 1997). Diese neutralisierten Vakuolen werden dann wieder von F-Aktin umgeben, wobei hier Coronin und Vacuolin eine Rolle spielen, und zur Exozytose an die Zellmembran geleitet (Rauchenberger et al., 1997; Neuhaus et al., 2002).

1.4. Die CD36/LIMPII-Familie

Bei der Suche nach einer Suppressormutante von Profilin-minus-Zellen konnte ein Gen isoliert werden, dessen Genprodukt (DdLIMP) zur CD36/LIMPII-Superfamilie (CD: "cluster of differentiation"; LIMP: "lysosomal integral membrane protein") gehörte (Karakesisoglou et al., 1999). Vertreter dieser Protein-Familie sind bisher unter anderem auch in Mensch, Maus und Drosophila gefunden worden. Alle weisen eine typische Haarnadel-Struktur auf. Sowohl am N-Terminus wie auch am C-Terminus befindet sich ein stark hydrophober Bereich, der als Transmembran-Domäne dient. Während beide Enden ins Zytosol reichen, ist der stark glykosylierte, zentrale Abschnitt entweder ins Lumen der Vesikel gerichtet oder an der Zelloberfläche nachweisbar. Deshalb unterteilt man diese Familie auch in zwei Gruppen, die die endolysosomalen LIMPII-Homologen und die CD36-Homologen an der Plasmamembran zusammenfassen.

Der wohl prominenteste Vertreter der Superfamilie ist das humane CD36. Dieses 88 kDa große Protein ist ein Rezeptor für eine Vielzahl von negativ geladenen Makromolekülen, wie z.B. langkettigen Fettsäuren, anionischen Phospholipiden und oxidiertem LDL ("low density"-Lipoprotein) (Uittenbogaard et al., 2000; Lee et al., 2001). Weiterhin wurde beschrieben, daß COS-Zellen, die mit CD36 cDNA transfektiert worden waren, apoptotische Zellen erkennen und phagozytieren konnten (Navazo et al., 1996). Diese Eigenschaft wurde auch für das in Drosophila vorhandene CD36-homologe Protein "croquemort" beschrieben (Febbraio et al., 2001).

Ein anderes Mitglied der CD36-Gruppe ist SR-B1 ("class B scavenger receptor"). Dieses Membranprotein wurde in einem "knock-out"-Ansatz als der lang gesuchte HDL-Rezeptor ("high density"-Lipoprotein) in Mäusen identifiziert (Rigotti et al., 1997). Für das menschliche Homolog CLA-I (CD36-, LIMPII-Analog) wird eine ähnliche physiologische Rolle vermutet und ist deshalb für die Atheroskleroseforschung vom großem Interesse (Murao et al., 1997).

Im Gegensatz zu diesen recht gut charakterisierten Proteinen an der Plasmamembran weiß man von der endolysosomalen Subgruppe sehr wenig. In allen bisher getesteten Zelltypen konnte LIMPII im Endosomen nachgewiesen werden (Vega et al., 1991). Durch ein C-terminales lysosomales Sortierungssignal wird das Protein infolge einer Interaktion mit dem Adaptorkomplex 3 in die Lysosomen transportiert (Hoening et al., 1998). Über die Funktion des Proteins gibt es bisher nur Vermutungen. Man geht davon aus, daß es an der Aufnahme von hydrolytischen Produkten aus den Lysosomen in das Zytoplasma beteiligt ist (Vega et al., 1991). Auch über die physiologische Bindungspartner von LIMPII ist bisher wenig bekannt.

Lediglich in einem *in vitro*-Versuch konnte an einer zwischen CD36 und LIMPII konservierten Stelle gezeigt werden, daß die Matrixkomponente Thrombospondin-1 bindet (Crombie und Silverstein, 1998).

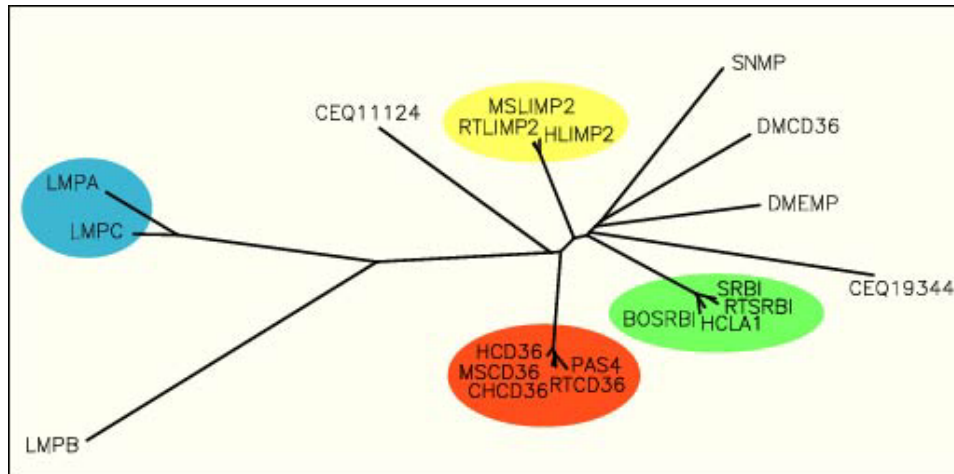


Abb. 1: Phylogenetische Analyse der CD36/LIMPII-Superfamilie

Der phylogenetische Baum wurde mit dem PHYLIP-Programm mit einer Kombination der "least squares" und "Fitch-Margoliash" Algorithmen errechnet. Die verwendeten Sequenzen und ihre GenBankTM-Zugriffsnummern: SRBI, "Chinese Hamster Scavenger Receptor BI" (A53920); HCLA-1, CD36/LIMPII-Analog aus *Homo sapiens* (A48528); RTSRBI, "scavenger receptor class B type I" aus *Rattus norvegicus* (BAA74541); BOSRBI, "scavenger receptor class B type I" aus *Bos taurus* (AAB70920); MSCD36, CD36 aus *Mus musculus* (L23108); RTCD36, Fettsäuretransporter (FAT) aus *R. norvegicus* (A47402); HCD36, CD36 aus *H. sapiens* (A54870); CHCD36, CD36 aus *Mesocricetus auratus* (AAB18646) PAS4, Teilsequenz aus *B. taurus* (D45364); RTLIMP2, "lysosomal integral membrane protein II" aus *R. norvegicus* (JH0241); HLIMP2, "lysosomal integral membrane protein II" aus *H. sapiens* (A56525); MSLIMP2, "lysosomal integral membrane protein II" aus *M. musculus* (BAA23372) DMEMP, epitheliales Membranprotein aus *Drosophila melanogaster* (S38957); DMCD36, "croquemort" aus *D. melanogaster* (Q27367); SNMP, sensorisches neuronales Membranprotein-1 aus *Antheraea polyphemus* (AAC47540); CEQ11124, CD36-homologes Protein aus *Caenorhabditis elegans* (Q11124); CEQ19344, CD36-homologes Protein aus *C. elegans* (Q19344); LMPA, "lysosomal integral membrane protein A" aus *Dictyostelium discoideum* (AF124329); LMPB, "lysosomal integral membrane protein B" aus *D. discoideum* (AF238324); LmpC, "lysosomal integral membrane protein C" aus *D. discoideum* (AF238325).

(Diese Abbildung ist der Veröffentlichung Janssen et al. (2001) entnommen.)

1.4.1. Die LIMPII-Subgruppe in *D. discoideum*

Kurz vor Beginn dieser Doktorarbeit ergab eine Datenbankrecherche, daß es neben dem bereits beschriebenen DdLIMP mindestens 2 weitere endolysosomale Proteine gibt, die eine hohe Homologie zu LIMPII aufweisen, so daß eine Änderung der Nomenklatur in DdLmpA (ehemals DdLIMP), DdLmpB und DdLmpC notwendig wurde. Alle drei Proteine weisen die familientypische "hairpin"-Topologie auf und sind in ihrer zentralen Region stark N-glykosyliert. Auffällig ist der deutliche Größenunterschied zu den homologen Proteinen

höherer Eukaryonten. Während die DdLmp-Isomere im Größenbereich zwischen 750 und 780 Aminosäuren liegen, weisen die anderen nur eine durchschnittliche Länge von 470 bis 550 Aminosäuren auf. Einen Hinweis auf eine unterschiedliche lysosomal-vesikuläre Lokalisation gibt die Divergenz der Sortierungssignale von DdLmpA/DdLmpC (GYXXI-Motiv) und DdLmpB (II-Motiv) wieder. Die phylogenetisch enge Verwandtschaft zwischen DdLmpA und DdLmpC ist auch in Abb. 1 sehr gut zu erkennen. Interessanterweise konnte am C-Terminus von DdLmpA eine PIP₂-Bindestelle beschrieben und mittels Gelfiltration bewiesen werden. Da bisher keine direkte Interaktion zwischen DdLmpA und Profilin gezeigt werden konnte, wird für DdLmpA eine Funktion im Phosphatidylinositol-Weg postuliert, dem Hauptregulator von Profilin (Karakesisoglou et al., 1999). In Immunfluoreszenz-Experimenten wurde deutlich, daß DdLmpA tatsächlich an vesikulären sowie an ringartigen Strukturen nahe der Zelloberfläche lokalisiert ist. Eine *lmpA*-Mutante weist Defekte in der Makropinozytose und in der Sekretion auf. Einen Effekt auf die Phagozytose konnte dagegen nicht beobachtet werden (Temesvari et al., 2000).

1.5. Das Pathogen *Yersinia*

Die Gruppe der *Yersinien* enthält drei pathogene Spezies: *Y. pestis*, *Y. enterocolitica* und *Y. pseudotuberculosis*. *Y. pestis* ist der Verursacher der Beulenpest, die vor allem im Mittelalter, aufgrund der schlechten hygienischen Lebensumstände viele Menschenleben kostete, so daß ganze Landstriche verödeten und sie den Beinamen „Schwarzer Tod“ erhielt. *Y. pestis* und *Y. pseudotuberculosis* rufen Enterokolitis, Sepsis und immunpathologische Folgeerkrankungen hervor. Obwohl der Infektionsweg und der Grad der Erkrankung verschieden sind, weisen alle drei Spezies einen Tropismus für das lymphatische Gewebe und eine bemerkenswerte Resistenz gegenüber der ersten Immunantwort des Wirtes auf. *Yersinien* sind extrazelluläre Parasiten, wobei sie mit Hilfe eines Sekretionssystems Effektorproteine in das Zytosol der Wirtszelle schleusen, die dann ihrerseits auf verschiedenen Wegen die Wirtszelle beeinflussen. Dieses dafür kodierende Yop-Virulon ist ein Archetyp eines Typ-III Sekretionssystems (TTS), welches bisher in mehr als einem Dutzend pflanzen- und tierpathogener Mikroorganismen beschrieben wurde (Buttner und Bonas, 2002). Einige dieser Erreger, wie z.B. *Salmonella enterica*, besitzen sogar zwei TTS, die zu verschiedenen Zeitpunkten der Infektion eine Rolle spielen (Galan, 2001). Lange Zeit ging man bei allen drei *Yersinien*-Spezies von nur einem TTS aus, welches auf einem 70 Kb-Plasmid (pYV) lokalisiert ist (Cornelis und Wolf-Watz, 1997). Erst die Sequenzierung des Genoms von *Y. pestis* ergab, daß auch hier zwei TTS vorliegen (Parkhill, 2001). Auch bei den meisten virulenten Biogruppen

von *Y. enterocolitica* sind in den neuesten Studien zwei TTS beschrieben (Haller, 2000). Allerdings ist die Rolle dieser chromosomal kodierten Sekretions- und Translokationssysteme bisher wenig verstanden.

Die auf dem Plasmid kodierenden Gene des TTS werden in 4 Gruppen unterteilt: (a) Gene für das Sekretions- und Translokationssystem Typ-III; (b) das Gen für das Adhäsionsprotein YadA; (c) die Gene für die Effektorproteine und (d) die Gene für die Regulatoren der Genexpression und der Sekretion bzw. Translokation. Jedoch sind nicht alle für die Pathogenität wichtigen Gene extrachromosomal kodiert. Hierfür ist das Gen *inv* ein Beispiel. Das Genprodukt Invasin ist ein hochaffiner Ligand für den $\beta 1$ Integrin-Rezeptor (Isberg und Tran Van Nhieu, 1994). Der Bindung des Invasins am Rezeptor, der an M-Zellen lokalisiert ist, folgt die Internalisierung der *Yersinien*, ohne daß sie phagozytiert werden. Aus diesem Grund können sich die *Yersinien* durch die M-Zellen schleusen und gelangen so zu den Peyer'schen Plaques. Dort verbleiben sie dann extrazellulär. Mit Hilfe des Adhäsionsproteins YadA und des Ysc-Yop-Typ-III Sekretionsapparates (Ysc steht für Yop secretion; Yop für Yersinia outer proteins) werden dann bestimmte Effektorproteine in das Zytosol der Wirtszelle transloziert. Diese Yop-Effektoren beeinflussen oft die Dynamik des Aktin-Zytoskeletts und blockieren den Phagozytosemechanismus der Makrophagen und polymorphonukleären Leukozyten. Weiterhin behindern sie die Produktion proinflammatorischer Zytokine, Chemokine und Adhäsionsmoleküle (Denecker et. al., 2002). Durch diese Modifikationen sichert sich das Pathogen das Überleben und die Vermehrung im extrazellulären Raum.

1.5.1. Der Sekretions- und Translokationsapparat

Der Translokation der Effektorproteine geht ein recht gut verstandener Andockmechanismus an die Wirtszelle voraus. Zum einen stellt das Adhäsion YadA unter anderem durch eine Bindung an verschiedene extrazelluläre Matrixproteine einen engen Kontakt des Bakteriums zur Wirtszelle her und erlaubt so erst die Translokation der Yop-Effektoren (Eitel und Dersch, 2002). Das TTS kann man untergliedern in einen Ysc-Injektions- und einen Yop-Translokationsapparat. Der Injektionsapparat besteht aus insgesamt 27 verschiedenen Proteinen, die den Basalkörper, der sowohl die Peptidoglykanschicht als auch die beiden bakteriellen Membranen der Bakterienzelle durchspannt, und eine nadelartige Struktur, die der Verankerung an der Wirtszelle dient, bilden (Hoiczyk und Blobel, 2001). Einen wesentlichen Bestandteil des Basalkörpers macht die Protonenpumpe aus, die man sich als einen großen Zylinder mit einer membranständigen Ringstruktur vorstellt. Hierbei spielt das Protein YscN eine essentielle Rolle (Woestyn et al., 1994), welches stark an die β -

katalytische Untereinheit der F_0F_1 -Protonen-Translokase erinnert. Der Injektionsapparat endet mit einer Nadel, die 60-80 nm lang und 6-7 nm breit ist, und durch eine Polymerisierung des 6 kDa großen Proteins YscF entsteht (Hoiczyk und Blobel, 2001). Diese Nadel ist innen hohl und dient dem Export der Yop-Effektorproteine durch die beiden bakteriellen Membranen einschließlich der Peptidoglykanschicht. Allerdings scheint die Injektion der Yop-Effektoren strikt davon abzuhängen, ob das Bakterium einen engen Kontakt zu einer Wirtszelle hat (Pettersson et al., 1996). Eine Notwendigkeit des Sekretionsapparates für die Translokation der Effektorproteine in die Wirtszelle scheint allerdings nicht vorzuliegen. Hierfür wird der Translokationsapparat verantwortlich gemacht, der aus den Proteinen YopB, YopD und LcrV aufgebaut ist. Auf Grund der Größe dieser Moleküle kann man davon ausgehen, daß diese Proteine in der Membran der Wirtszelle eine Pore mit einem Durchmesser von 1,6-2,3 nm bilden (Neyt und Cornelis, 1999). Allerdings konnte diese Pore elektronenmikroskopisch bisher nicht beobachtet werden, und auch die Stöchiometrie sowie die genaue Anordnung der Moleküle bleiben zu klären. Für YopD und LcrV sind desweiteren aber auch regulatorische Funktionen beschrieben worden (Francis et al., 2001). Die entscheidenden Proteine für die Regulation der Translokation scheinen jedoch YopN und TyeA zu sein (Iriarte et al., 1998). Eine sehr gute und genaue Beschreibung des TTS ist in einem Übersichtsartikel von Cornelis (2002) zu finden.

1.5.2. Die Yop-Effektorproteine

Bisher sind 6 Yop-Effektorproteine beschrieben worden: YopE, YopH, YopM, YopO/YpkA, YopP/JopJ und YopT (Aepfelbacher und Heesemann, 2001; Cornelis, 2002). YopH gehört zu den stärksten der bisher bekannten Phosphotyrosin-Phosphatasen (PTPase). Studien konnten zeigen, dass YopH nach der Transfektion in J774-Makrophagen in der Lage ist, $p130^{Cas}$ zu dephosphorylieren und "focal adhesions" zu unterbrechen (Hamid et al., 1999). YopH schützt *Yersinia* auch gegen Phagozytose durch polymorphonukleären Leukozyten. Derzeit wird angenommen, daß der Effektor innerhalb von Sekunden die Kalzium-Signalkaskade unterbricht. Neueste Beobachtungen weisen YopH auch eine Rolle in der Herunterregulierung der inflammatorischen Antwort zu, indem es die Synthese von bestimmten Chemokinen hemmt. Auch YopJ (YopP in *Y. enterocolitica*) werden verschiedene Funktionen in der Blockade des Immunsystems zugeschrieben. Es reduziert z.B. die Freisetzung von $TNF-\alpha$ bei Makrophagen und IL-8 bei Endothel- und Epithelzellen. Beides ist eine Folge der Hemmung der Aktivierung des Transkriptionsfaktors $NF-\kappa B$, indem die Translokation des Faktors zum Kern verhindert wird. Auch ein hemmender Einfluß auf die MAPK-Signalkaskade wurde festgestellt.

Die Rolle von YopM ist gänzlich unverstanden. Da man dieses Protein im Zellkern der Wirtszelle lokalisieren konnte, geht man von einer Rolle bei der Transkription bestimmter Gene aus.

YopE, YopT und YpkA/YopO beeinflussen die Phagozytose und das Zytoskelett, indem sie mit monomeren GTPasen der Rho-Familie interagieren. Von den GTPasen dieser Familie ist bekannt, daß sie die Dynamik des Zytoskeletts kontrollieren. YopE agiert als ein GTPase-aktivierendes Protein (GAP) an RhoA, Rac1 und CDC42. Dadurch erfolgt eine Beschleunigung der GTP-Hydrolyse und somit eine Inaktivierung der GTPasen (Black und Bliska, 2000). Die Mitglieder der Rho-Familie sind an der inneren Seite der Plasmamembran durch eine Prenyl-Gruppe an ihrem C-Terminus verankert. Diese Verankerung ist essentiell für die Funktion. YopT spaltet als Cystein-Protease Rho, Rac und CDC42 nahe an ihrem C-Terminus und löst die GTPasen somit von ihrer Membranverankerung (Shao et al., 2002).

Auf YpkA/YopO wird im nächsten Kapitel genauer eingegangen.

1.5.3. YpkA/YopO

YpkA (*Yersinia* protein kinase A), in *Y. enterocolitica* als YopO bezeichnet, ist eine 82 kDa große autophosphorylierende Serin/Threonin-Kinase. Sie weist am N-Terminus Homologien zu Proteinkinasen auf, die aus Säugerzellen stammen. Im Gegensatz zu YpkA, welches aus *Yersinia*-sezernierten Proteinen immunpräzipitiert wurde, konnte beim rekombinanten YpkA/YopO in *E. coli* keine Autophosphorylierung im Kinase-Assay beobachtet werden. Erst die Zugabe von HeLa-Zellen Lysat oder fötalem Rinderserum in den Kinase-Assay erlaubte sowohl die Autophosphorylierung wie auch die Phosphorylierung basischer Substrate, wie Histon Typ-III oder MBP (myelin basic protein) (Barz et al., 2000; Dukuzumuremyi et al., 2000; Juris et al., 2000). Dies führte zur Identifikation von Aktin als eukaryontischen Aktivator der Autophosphorylierung von YopO. Die Entfernung von 21 C-terminalen Aminosäuren hob die induzierte Autophosphorylierung wieder auf. Diese letzten 21 Aminosäuren weisen eine Coronin-homologe Region auf und werden für die Aktinbindung verantwortlich gemacht (Juris et al., 2000). Weiterhin wird stromaufwärts dieser 21 Aminosäuren eine GTPase-Bindestelle für Rac1 und RhoA beschrieben, und der N-terminalen Region wird die beobachtete Lokalisation des YopO an der Plasmamembran der Wirtszelle zugeschrieben (Dukuzumuremyi et al., 2000). Eine Überexpression von YpkA in HeLa- (siehe Abb. 2) und anderen eukaryontischen Zellen führt zu einem Zusammenbruch des Zytoskeletts, wobei aber lange fingerartige Auswüchse der Zelle zu beobachten sind (Hakansson, 1996; Juris et al., 2000).

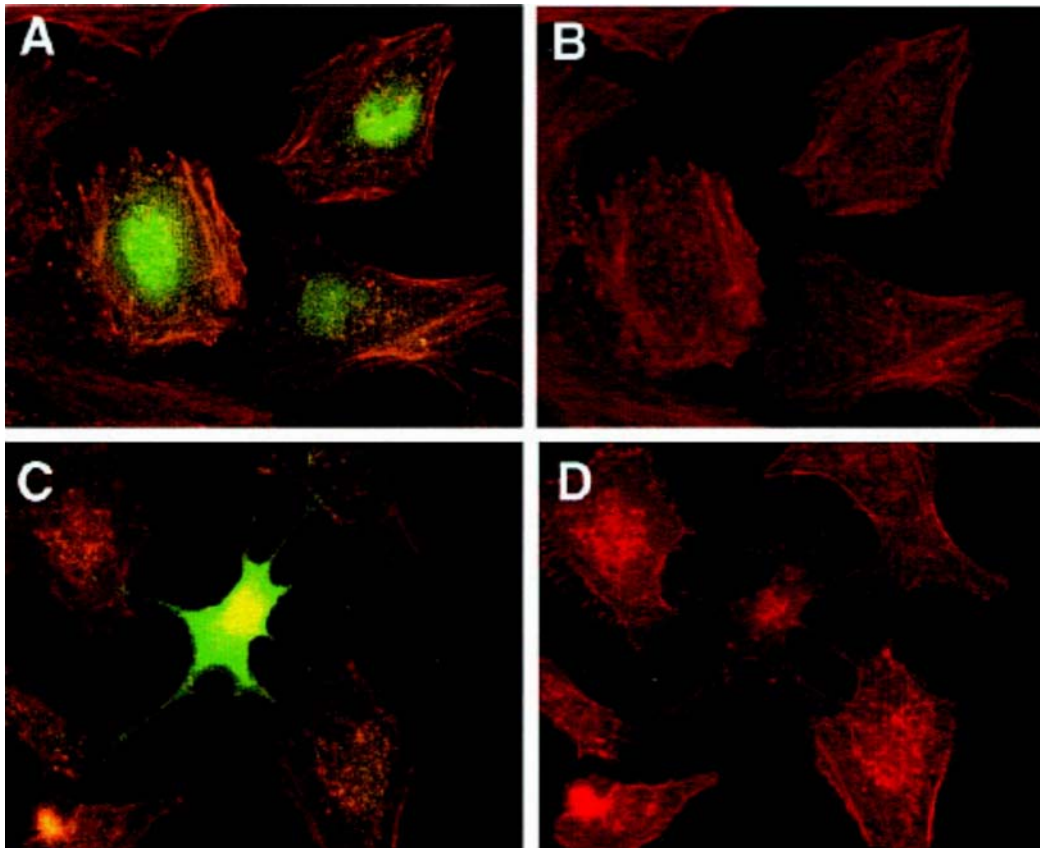


Abb. 2: YpkA-Überexpression führt zum Zusammenbruch des Aktin-Zytoskeletts. HeLa-Zellen wurden mit dem vektorkodierten Fluoreszenzfarbstoff EGFP und einem Kontroll-Vektor (Bild A) bzw. einem YpkA-kodierenden Vektor (Bild C) kotransfiziert. Die Aktin-Filamente wurden durch Rhodamin-Phalloidin (Bild B und D) angefärbt. (Diese Abbildung ist der Veröffentlichung von Juris et al. (2000) entnommen.)

1.6. Aufgabenstellung

Während unser Wissensstand über die zellmembranständigen Mitglieder der CD36/LIMPII-Familie recht groß ist, ist bisher nur sehr wenig über die verwandten lysosomalen Proteine bekannt. Die als Modellsystem gut etablierte Amöbe *D. discoideum* bietet sich an, diese Wissenslücke zu füllen, auch gerade wegen der erstmalig beschriebenen Existenz von drei Mitgliedern dieser LIMPII-Subgruppe in einem Organismus. Für DdLmpA konnte eine PIP₂-Bindestelle nachgewiesen werden. Dies und die Beschreibung des *lmpA*-"knock-outs" als eine Suppressormutation von Profilin-minus-Zellen weist auf eine indirekte Verknüpfung zum Aktin-Zytoskelett hin (Karakesisoglou et al., 1999). Daher lag zum einen das Ziel dieser Arbeit darin, eine genauere Charakterisierung der in den Datenbanken gefundenen endolysosomalen Proteinen DdLmpB und DdLmpC mit Hilfe zellbiologischer und biochemischer Methoden vorzunehmen.

Zum anderen war der Einfluß der verschiedenen Yop-Effektoren auf das Aktin-Zytosklett von Interesse. Insbesondere die aktivierende Wirkung von Aktin auf die Kinaseaktivität von YopO sollte auf molekularer Ebene genauer untersucht werden.

2 Material & Methoden

2.1 Material

2.1.1 Enzyme, Antikörper, Inhibitoren und Antibiotika

2.1.1.1 Enzyme für die Molekularbiologie

Alkalische Phosphatase aus Kälberdarm	Roche
DNA-Polymerase I, Klenow-Fragment	Roche
Lysozym	Sigma
"Prime-it"-Kit	Stratagene
ProteinaseK	Roche
Restriktionsendonukleasen	Roche, Biosciences, Gibco-BRL, New England Biolabs, Promega, Eurogentec
RNase A	Sigma
T4 DNA Ligase	Gibco-BRL
Taq Polymerase	Biosciences
TOPO Cloning	Invitrogen

2.1.1.2 Enzyme für die Protein-Biochemie

Trypsin	Sigma
α -Chymotrypsin	Sigma

2.1.1.3 Antikörper

Anti-DdLmpA (pAk SA3416)	(Karakesisoglou et al., 1999)
Anti-DdLmpB (pAk SA7656 und SA7657)	(vorliegende Arbeit)
Anti-DdLmpC (pAk SA7654 und SA7655)	(vorliegende Arbeit)
Anti-Golvesin (mAk 275-392-5)	(Schneider et al., 2000)
Anti-"His-tag" (mAk)	Qiagen
Anti-ProfilinI (mAk 153-246-10)	(Haugwitz et al., 1991)
Anti-ProfilinII (mAk 174-380-3)	(Haugwitz et al., 1991)
Ziege-anti-Maus IgG Antikörper, gekoppelt an Peroxidase	Dianova
Ziege-anti-Kaninchen IgG Antikörper, gekoppelt an Peroxidase	Dianova

Ziege-anti-Kaninchen IgG Antikörper, Dianova
(gekoppelt an Cy3, Alexa-488 oder TRITC)

2.1.1.4 Inhibitoren

Benzamidin Sigma
Diethylpyrocarbonat (DEP) Sigma
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) Roth
Proteaseinhibitorcocktail (#P2714) Sigma

2.1.1.5 Antibiotika

Blasticidin S ICN Biomedicals
Geneticin (G418) Sigma
Streptomycin Sigma
Ampicillin Roth
Kanamycin Sigma

2.1.2 Reagenzien

Soweit nicht anders erwähnt, stammten die verwendeten Laborchemikalien von Biomol, Fluka, Merck, Roth, Serva oder Sigma und hatten den Reinheitsgrad "p.a."

α -³²P-dATP (10 mCi/ml) ICN
Acrylamid (30%ige Stammlösung mit 0,8%
Bisacrylamid im Verhältnis 37,5:1) Roth
Agar-Agar, Typ RG Euler
Agarose (SeaKem LE) BMA
Ammoniumperoxodisulfat (APS) Roth
Bacto-Pepton/-Trypton Oxoid/BD
BCIP (5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat-
p-toluidinsalz) Gerbu
 β -Glycerophosphat Sigma
Coomassie Brilliant Blau R 250, G 250 Roth, Sigma
Dinatriumpyrophosphat Sigma
DMSO (Dimethylsulfoxid) Serva
DTT (1,4-Dithio-D,L-threitol) Gerbu
EDTA (Ethyldinitrilotetraessigsäure) Biomol

EGTA (Ethylen-glycol-bis[2-amino-ethylether]- N,N,N',N'-tetraessigsäure)	Sigma
Ethidiumbromid	Sigma
γ - ³² P-ATP (10 mCi/ml)	ICN
Glutathion(red.)/Glutathion-"Beads"	Sigma
Glutaraldehyd	Serva
HEPES (N-2-Hydroxyethylpiperazid-N'- ethansulfonsäure)	Roth
Hefeextrakt	Oxoid
IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid)	Gerbu
β -Mercaptoethanol	Roth
Nickel-NTA Agarose	Qiagen
NP-40 (Nonylphenylpolyethylenglycol)	Roche
Nukleotide	New England Biolabs
Proteose-Pepton	Oxoid
Phenol	Appligene
Roti-Phenol/Chloroform	Roth
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Roth
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin)	Sigma
Triton X-100 ("surfact amps")	Pierce

2.1.3 Medien

Alle verwendeten Medien und Puffer wurden mit deionisiertem Wasser angesetzt, das über eine Ionenaustauschanlage (Millipore) gefiltert worden war. Medien wurden bei 120°C autoklaviert. Platten wurden nach Abkühlen des Mediums auf etwa 50°C mit Hilfe eines Dispensers gegossen. Antibiotika wurden nach dem Abkühlen steril zugegeben.

2.1.3.1 Medien für die *D. discoideum*-Kultur

<u>AX-Medium (pH 6,7)</u>	<u>SM-Agarplatten (pH 6,5)</u>
(Watts und Ashworth, 1970)	9 g Agar
14,3 g Pepton	10 g Pepton
7,15 g Hefeextrakt	50 mM Glukose
50 mM Glukose	1 g Hefeextrakt
3,5 mM Na ₂ HPO ₄	4 mM MgSO ₄
3,5 mM KH ₂ PO ₄	16 mM KH ₂ PO ₄

mit bid. H₂O auf 1 l auffüllen

5,7 mM K₂HPO₄

mit bid. H₂O auf 1 l auffüllen

Soerensen-Phosphatpuffer (pH 6,0)

(Malchow et al., 1972)

14,6 mM KH₂PO₄

2 mM Na₂HPO₄

Phosphat-Agarplatten (pH 6,0)

15 g Bacto-Agar

mit Soerensen-Puffer auf 1 l auffüllen

HL5-Medium

10 g Hefeextrakt

20 g Proteose Pepton

50 mM Glukose

8,5 mM KH₂PO₄

1,25 mM Na₂HPO₄

mit bid. H₂O auf 2 l auffüllen

2.1.3.2 Medien für die E. coli-Kultur

LB-Medium (pH 7,4)

(Sambrook et al., 1989)

10 g Bacto-Trypton

5 g Hefeextrakt

86 mM NaCl

ad 1 l mit bid. H₂O

Der pH-Wert von 7,4 wurde mit NaOH-Lösung eingestellt. Für Agarplatten wurden dem Medium 1,5% (^w/_v) Agar zugesetzt. Bei Bedarf wurden 50 mg/l Ampicillin (sterile 1000 × Lösung) zugefügt.

2.1.4 Puffer und andere Lösungen

Puffer und Lösungen, die hier nicht aufgeführt sind, finden sich im jeweiligen Methodenteil.

100 x Denhardts Reagenz

2% Ficoll 400

2% Polyvinylpyrrolidon

2% Rinderserumalbumin

20 x SSC

3 M NaCl

300 mM NaCitrat

10 × Tris/Borat-Puffer (TBE; pH 8,3)

890 mM Tris
 890 mM Borsäure
 20 mM EDTA
 autoklavieren

TE-Puffer (pH 8,0)

10 mM Tris/HCl
 2 mM EDTA, pH 8,0
 autoklavieren

10 x PBS (pH 7,3)

1,37 M NaCl
 27 mM KCl
 81 mM Na₂HPO₄
 15 mM KH₂PO₄

10 x NCP-Puffer (pH 8,0)

100 mM Tris/HCl
 1,5 M NaCl
 5 ml Tween-20
 0,2% NaN₃
 mit bid. H₂O auf 1 l auffüllen

2.1.5 Bakterienstämme*E. coli* DH5α

(Sambrook et al., 1989)

E. coli M15

(Qiagen)

E. coli XL1 blue

(Sambrook et al., 1989)

Klebsiella aerogenes

(Williams und Newell, 1976)

2.1.6 Dictyostelium discoideum-Stämme

AX2-214

Axenisch und auf Bakterien wachsender Ab-
 kömmling des Freilandisolates NC4
 (Raper, 1935)

pII/Ia2

Axenisch wachsende AX2-Mutante, bei der die
 Profilin Isoformen I und II fehlen
 (Haugwitz et al., 1994)

RB2

REMI-Mutante: Profilin I/II-minus, *lmpA*-minus
 (Karakesisoglou et al., 1999)

lmpB⁻

Axenisch wachsende AX2-Mutante, *lmpB*-minus
 (vorliegende Arbeit)

2.1.7 Vektoren

pCR2.1

(Invitrogen)

pDEXRH

(Faix et al., 1992)

pGEX

(Pharmacia Biotech)

pQE30/32	(Qiagen)
pUC19	(Yanisch-Perron et al., 1985)
pUCBsr Δ BHI	(Adachi et al., 1994)

2.1.8 Geräte

Axiovert 25	Zeiss
Diavert Mikroskop (inverse Anordnung)	Leitz
Eagle Eye II	Stratagene
Elektroporationsgerät	BioRad
Entwicklermaschine Curix 60	Agfa
Fluoreszenzmikroskop Axiophot	Zeiss
Fraktionenkollektor RediFrac	Pharmacia
Hybridisierungsofen	Biometra
Konfokale Mikroskopie DM IRBE (invers)	Leica
Lumineszenz-Spektrometer (FA-260-E1)	Aminco Bowman
Nuclepore-Filter	Costar, Whatman
PCR-Thermocycler Uno	Biometra
Peristaltische Pumpe P-1	Pharmacia
pH-Meter pH526	WTW
Photometer Ultrospec III	Pharmacia
Quarzküvetten Infrasil	Hellma
Flachbettscanner ScanJet 4c/ScanJet 5470c	Hewlett Packard
Servogor 124	Goerz
Smart-System	Pharmacia
Ultraschallbad Transsonic 820/H	Elma
UV-Aufflichtilluminator IL-200-M	Bachofer

2.1.9 Sonstige Materialien

Zellulosenitrat-Röhrchen für Rotor SW 40	Beckman
Dialyse-Membranen	Biomol
Gel-Blotting-Papier GB002	Whatman
Gewebekulturschalen, \varnothing 90 mm \times 20 mm	Greiner
Gewebekulturplatten, 24 Wells	Nunc
Mikrokonzentratoren Centrikon-/Centriprep-10	Amicon
Nitrozellulose BA85	Schleicher & Schüll

Petrischalen, Ø 92 mm × 16 mm	Sarstedt
Polyallomer-Röhrchen 1,5 ml	Beckman
Röntgenfilm X-OMAT	Kodak
Spritzen	Braun Melsungen
Stahlkugeln, Ø 0,0025 inch, 440-C	New England Miniature Ball Company
Sterilfilter, 0,22 µm Millex GV	Millipore

2.1.10 Zentrifugen und Rotoren

Zentrifugen

Optima LE-80K Ultrazentrifuge	Beckman
Optima TL Ultrazentrifuge	Beckman
GS-6KR Zentrifuge	Beckman
J2-21M/E Zentrifuge	Beckman
J6-HC Zentrifuge	Beckman
Tischzentrifuge 5415c	Eppendorf

Rotoren

JA-14.1, JA-20, SW 40	
Ti 20.1, Ti 45, Ti 70, TLA 100.3	Beckman

2.1.11 Computerprogramme

Windows / Macintosh

CorelDRAW 9	Corel
Illustrator 8.0	Adobe
NIH Image 1.62	National Institutes of Health
Photoshop 5.5	Adobe
Sigma Plot 2000	Jandel Scientific
Office 2000	Microsoft

WWW

NCBI	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/
HUSAR	http://www.genius.embnet.dkfz-heidelberg.de

2.2 Kultur von *D. discoideum*

2.2.1 Anzucht in Flüssigmedium (Claviez et al., 1982)

Der Wildtyp-Stamm AX2 und die Mutanten wurden entsprechend aus Sporen, Dauerkulturen, Vorkulturen oder von SM-Platten in AX- oder HL5-Medium angeimpft. Um die Kulturen von *K. aerogenes* zu befreien, wurden die Zellen in Medium überführt, welches 10 µg/ml Streptomycin enthält. Die Generationszeit des Wildtyps AX2 in Schüttelkultur betrug bei 21°C und 150 UpM etwa 10 h. Die Anzucht der Mutanten erfolgte in Costar Wells, in Gewebekulturflaschen oder -schalen, ebenfalls bei 21°C. Für zellbiologische Untersuchungen wurden die Zellen bis max. 5×10^6 Zellen/ml angezogen, um ein Übergehen in die stationäre Phase zu vermeiden.

2.2.2 Anzucht auf Agarplatten

Zum Klonieren von Transformanten wurden SM-Agarplatten verwendet. Nachdem jeweils 0,1 ml einer dichten *K. aerogenes*-Suspension (in TE-Puffer) auf SM-Platten ausgestrichen worden waren, wurden die *D. discoideum*-Zellen ausgebracht und die Platten etwa 2 Tage bei 21°C inkubiert. Die Generationszeit betrug hierbei 3-4 h. *D. discoideum*-Kolonien zeigten sich als klare Freßhöfe ("plaques") auf dem Bakterienrasen.

2.2.3 Entwicklung von *D. discoideum*

AX2-Zellen wurden axenisch bis zu einer Dichte von $3-5 \times 10^6$ Zellen/ml ("log phase") kultiviert, geerntet (1.000 x g, 5 min, 4°C), mehrmals mit kaltem Soerensen-Phosphatpuffer (pH 6,0) gewaschen und auf eine Dichte von 1×10^8 Zellen/ml mit Phosphatpuffer eingestellt. Auf frisch gegossenen Phosphat-Agarplatten (Ø 90 mm, 17 mm) wurden dann 1×10^8 Zellen/Platte ausgebracht. Die Platten wurden dann bei 21°C inkubiert und zu den jeweiligen Entwicklungszeitpunkten mit kaltem Soerensen-Phosphatpuffer abgespült. Alternativ zur Entwicklung auf Phosphat-Agarplatten konnten die Zellen auch in Phosphatpuffer-Schüttelkultur (150 UpM) bis zu 8 h entwickelt werden.

2.2.4 Sporenkonservierung

Axenisch gewachsene Zellen wurden durch 10 minütiges Abzentrifugieren bei 1.000 UpM geerntet, zweimal mit kaltem Soerensen-Puffer gewaschen und auf eine Dichte von 2×10^8 Zellen/ml resuspendiert. Je 500 µl dieser Suspension wurden dann auf Phosphat-Agarplatten ausgebracht. Innerhalb von 2-3 Tagen hatten sich die Zellen entwickelt und Fruchtkörper ausgebildet. Die Sporen jeder Agarplatte wurden durch kräftiges Abklopfen in den Deckel der

Petrischale geerntet und in 10 ml kaltem Soerensen-Puffer aufgenommen. 1ml-Aliquots wurden schließlich in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C gelagert. Zum Animpfen wurde ein Aliquot bei RT aufgetaut und in AX-Medium gegeben. Nach 3 Tagen bei 21°C und 150 UpM hatte diese Vorkultur eine Dichte von ca. 5×10^6 Zellen/ml.

2.2.5 Einfrieren von *D. discoideum*-Zellen

Zur Konservierung der Amöben wurden axenisch gewachsene Zellen geerntet und mit einer Dichte von 1×10^8 Zellen/ml in eiskaltem Einfriermedium (AX- oder HL5-Medium + 5% (v/v) DMSO) aufgenommen. Die Zellsuspension wurde auf 1ml-Aliquots verteilt, die dann zunächst auf Eis aufbewahrt wurden. Ein $10 \times 9 \times 5$ cm großer Messingblock (3,25 kg) mit passenden Bohrungen, der auf 4°C vorgekühlt worden war, wurde mit den Ampullen beschickt und dann für mind. 15 h bei -70°C aufbewahrt. Die Ampullen wurden anschließend in flüssigem Stickstoff oder bei -70°C gelagert. Zur Revitalisierung eingefrorener Zellen wurde ein Aliquot unter fließendem, kaltem Wasser schnell aufgetaut, die Zellen direkt einmal mit 20 ml kaltem AX-Medium gewaschen und schließlich in 10 ml AX-Medium resuspendiert und in eine Petrischale überführt. Bei Transformanten wurde nach 24 h das Medium gewechselt und das geeignete Selektionsmittel zugegeben.

2.3 Molekularbiologische Methoden

2.3.1 Präparation von Plasmid-DNA

2.3.1.1 Präparation von Plasmid-DNA nach Holmes und Quigley (1981)

Diese Methode eignet sich besonders zur schnellen Analyse kleinerer rekombinanter Plasmide (< 6 kB). Dazu wurde Zellmaterial aus einer ÜN-Kultur in Flüssigmedium oder auch auf Festmedium gewachsene Kolonien eingesetzt. Das Zellpellet wurde in 200 μl STET-Puffer resuspendiert und durch Zugabe von Lysozym (1mg/ml) aufgeschlossen. Die Suspension wurde dann für 1 min bei 95°C inkubiert. Danach wurden die unlöslichen Bestandteile durch Zentrifugation sedimentiert (12.500 UpM, 10 min, RT, Eppendorf-Tischzentrifuge) und das Pellet mit einem sterilen Zahnstocher entfernt. Die Nukleinsäuren im Überstand wurden nach Zugabe von 200 μl 2-Propanol 5 min bei RT gefällt und in der Eppendorf-Zentrifuge abzentrifugiert (11.000 UpM, 20 min, RT). Das DNA-Präzipitat wurde mit Ethanol (70%) gewaschen, abermals abzentrifugiert (14.000 UpM, 10 min, RT, Eppendorf-Tischzentrifuge), bei 37°C getrocknet und schließlich in 20 μl H_2O (bid., autokl.) oder TE-Puffer aufgenommen.

Diese Plasmidpräparation eignet sich hauptsächlich nur für Restriktionsspaltungen, da sie noch einen hohen Anteil an RNA und Proteinen besitzt.

STET/Lysozym-Puffer (pH 8,0)

50 mM Tris/HCl

50 mM EDTA

0.5% Triton X-100

8% Saccharose

2.3.1.2 Präparation von Plasmid-DNA nach der Qiagen-Methode

Für die Isolation von DNA-Fragmenten zur weiteren Subklonierung, für die DNA-Sequenzierung und für die Transformation in *Dictyostelium*-Zellen ist der Einsatz hochreiner Plasmid-DNA in konzentrierter Form unbedingt notwendig. Deshalb erfolgte die Gewinnung dieser Plasmid-DNA mit Hilfe chromatographischer Methoden. Dafür wurde eine Matrix verwendet, die eine hohe Bindungsaffinität zur DNA besitzt. Diese Matrix war in einer Schleudersäule fixiert und ermöglichte so die schnelle und einfache Reinigung der an sie gebundenen DNA. Dazu wurden die Zellen zuerst durch alkalische Lyse aufgebrochen und der klare Überstand auf die Schleudersäule gegeben. Ein im Puffer enthaltenes chaotropes Salz führte zur reversiblen Zerstörung der Hydrathülle der Nukleinsäuren. Dadurch wurde die Adsorption der Plasmid-DNA an die Matrix begünstigt. Dem Waschvorgang folgte die Elution der DNA mit H₂O (bid., autokl.) oder mit TE-Puffer.

Hierfür wurde der Qiagen-Mini-Kit für kleinere Volumina (3-5 ml) und der Qiagen-Maxi-Kit für große Volumina (300 ml) verwendet.

2.3.2 Präparation chromosomaler DNA aus *D. discoideum*

2.3.2.1 Isolierung qualitativ hochwertiger chromosomaler DNA nach Noegel et al. (1985)

Da *D. discoideum* einen hohen Gehalt an Kohlenhydraten und RNA besitzt, die bei der Reinigung die chromosomale DNA begleiten, wird die DNA aus angereicherten Zellkernen isoliert. Um Scherkräfte zu vermindern, die eine physikalische Schädigung der DNA hervorrufen können, wurde im Verlauf der Präparation durch vorsichtiges Invertieren (nicht vortexen) gemischt. Ferner wurden die Spitzen der Pipetten abgeschnitten, um die Öffnung zu vergrößern.

1-2 x 10⁸ Zellen einer axenisch gewachsenen Kultur wurden zweimal mit eiskaltem Wasser gewaschen und das Zellsediment in 50 ml Kernlyse-Puffer resuspendiert. Durch diese Be-

handlung lysieren die Zellen, die Zellkerne bleiben jedoch intakt und werden abzentrifugiert (JA20, 7.500 UpM, 10 min, 4°C). Das weißliche Zellkernpellet wurde in 500 µl SDS-Lysispuffer aufgenommen, mit 100 µl ProteinaseK-Lösung versetzt und 2-3 h bei 60°C inkubiert. Das Lysat wurde anschließend 2-3 mal mit je einem Volumen Phenol/Chloroform durch vorsichtiges Mischen extrahiert. Durch Zugabe von 1/10 Vol. 2 M Na-Acetat (pH 5,2) und 2 Vol. Ethanol zur wäßrigen Phase wurde die DNA präzipitiert und konnte mit einem Glashaaken ausgedreht werden. Die DNA wurde in Ethanol gewaschen, kurz an der Luft getrocknet und in etwa 500 µl 1/10 TE-Puffer gelöst. Photometrische Konzentrationsbestimmung (OD_{260} von 1,0 = 50 µg DNA; $OD_{260}/OD_{280} = 1,8$ bis 2,0).

<u>Kernlyse-Puffer</u>	<u>SDS-Lysispuffer</u>	<u>ProteinaseK</u>
10 mM Mg-Acetat	0,7% SDS in TE-Puffer	14,7 mg/ml, vor Gebrauch
10 mM NaCl		30 min bei 37°C inkubieren
30 mM HEPES (pH 7,5)		
10% Saccharose		
2% Nonidet P40		

2.3.2.2 Isolierung chromosomaler DNA für "knock-out"-screening mittels PCR

Für das Suchen nach Mutanten mittels PCR ist das Vorhandensein qualitativ hochwertiger, gereinigter chromosomaler DNA nicht nötig. Hiefür bot sich eine alternative Methode an. $1-2 \times 10^6$ Zellen wurden kurz abzentrifugiert und 2 x in je 500 µl H₂O (bid.) gewaschen. Das Pellet wurde dann in 100 µl 1 x PCR-Puffer resuspendiert und mit MgCl₂ zu einer Endkonzentration von 1,5 mM versetzt. Weiterhin wurde NP-40 (10%) zu einer Endkonzentration von 0,5% dazupipettiert. Anschließend erfolgte für 45 min bei 56°C eine ProteinaseK-Behandlung (Endkonzentration 0,05 mg/ml). Nach einer 10 minütigen Inaktivierung der ProteinaseK bei 95°C stand die Probe für die PCR zur Verfügung.

2.3.3 Verdau mit Restriktionsenzymen

Der Verdau von DNA mit Restriktionsenzymen erfolgte jeweils in dem vom Hersteller empfohlenen Puffersystem und unter den angegebenen Temperaturbedingungen. In der Regel wurden pro µg DNA 2-10 Enzymeinheiten (U) eingesetzt. Chromosomale DNA wurde in einem 100-200 µl Ansatz über Nacht verdaut.

2.3.4 Elektrophorese von DNA in Agarosegelen (Sambrook et al., 1989)

Die elektrophoretische Auftrennung von DNA-Molekülen erfolgte in 0,7 bis 1,2% igen (^{w/v}) Agarosegelen, die in 1 × Tris/Boratpuffer angesetzt wurden. Laufpuffer und Gelpuffer waren identisch. Die Gele wurden in Flachbett-Gelapparaturen verschiedener Größen (4 × 7 cm, 8 × 7 cm, 12 × 13,5 cm, Eigenbau) gegossen. Die zu trennende DNA wurde mit ¹/₉ Vol. DNA-Probenpuffer versetzt und geladen. Die Trennung erfolgte bei 1-5 V/cm. Nach dem Lauf wurden die Gele in einer wäßrigen Ethidiumbromid-Lösung kurz gefärbt und anschließend in Wasser entfärbt. Die Gele wurden unter UV-Licht bei 312 nm betrachtet und mit Hilfe des EagleEye-Systems fotografiert und ausgewertet.

DNA-Probenpuffer

40% Saccharose

0,5% SDS

0,25% Bromphenolblau

in TE-Puffer aufnehmen

2.3.5 Fragment-Isolierung aus DNA-Gelen mit dem QIAquick Gel Extraction Kit

Zum Eluieren von DNA aus Agarosegelen wird die entsprechende Bande aus dem Gel ausgeschnitten und in ein steriles Eppendorfgefäß überführt. Die anschließende Fragmentisolierung erfolgte nach dem angegebenen Protokoll und das isolierte Fragment wurde in einem Volumen von 30 µl eluiert. Zur Kontrolle wurde anschließend eine Probe auf das Gel geladen.

2.3.6 "Southern-Blotting"

Die als "Southern-Blotting" (Southern, 1975) bezeichnete Technik dient dazu, die in Agarosegelen nach Größe getrennte DNA auf Nitrozellulose zu immobilisieren. Durch Hybridisierung mit einer markierten DNA-Probe können dann spezifische Fragmente identifiziert werden. Das gefärbte und gemeinsam mit einem angelegten Lineal bei 312 nm fotografierte Gel wurde zunächst 20-30 min in 0,5 M NaOH denaturiert, kurz mit Wasser gespült und 30 min in 1 M Tris/HCl (pH 8,0) neutralisiert. Anschließend wurde das Gel für 20 min in 20 x SSC äquilibriert.

Kapillarblot

Der Transfer der DNA auf Nitrozellulose erfolgte in 20 x SSC für 18 h aufgrund von Kapillarkräften. Das Agarosegel lag auf Whatman 3MM-Papier mit Kontakt zu einem 20 x SSC-Reservoir und wurde mit Nitrozellulose-Filter, Whatman 3MM-Papier und einem ca. 5 cm dicken Stapel von Saugpapier belegt und beschwert (ca. 1 kg). Nach dem Transfer wurden die Filter 10 min in 6 x SSC gewaschen, zwischen Saugpapier kurz getrocknet und zur Fixierung der Nukleinsäuren auf den Filtern 2h bei 80°C im Vakuum gebacken.

2.3.7 Radioaktive Markierung von DNA-Proben

DNA-Proben zur Hybridisierung von "Southern-Blots" wurden nach der "prime-it" Methode hergestellt. Hierbei werden Zufalls-Oligonukleotidprimer an die zu markierende Einzelstrang-DNA-Sonde hybridisiert, mit Hilfe des Klenow-Enzyms erfolgt die Neusynthese des komplementären Stranges unter Einbau des radioaktiven Isotops. 25 ng DNA wurden in ein steriles Eppendorfgefäß gegeben und mit autoklaviertem Wasser auf 24 µl aufgefüllt. Nach Zugabe von 10 µl "random oligonucleotide primer" wurde die Probe 5 min im Heizblock bei 92°C denaturiert und anschließend kurz bei RT abzentrifugiert. Nach Zugabe von 10 µl 5 x "dATP primer buffer", 5 µl α -³²P-dATP, 1 µl Klenow-Enzym und sorgfältigem Mischen wurde der Ansatz 2-10 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion durch Zupipettieren von 2 µl "stop-mix" beendet, und die nicht eingebauten Nukleotide wurden durch Zentrifugation (2.000 UpM, 2 min) über eine 1 ml Sephadex-G50 Säule in TE-Puffer abgetrennt. Die markierte Probe wurde 5 min bei 100°C denaturiert und in etwa 10 ml Hybridisierungspuffer aufgenommen.

2.3.8 Hybridisierung mit radioaktiv markierten Proben

Die Hybridisierungsbedingungen entsprachen denen von Mehdy et al. (1983). Der Nitrozellulosefilter mit der immobilisierten DNA wurde in einem Hybridisierungsröhrchen für 1 h bei 37°C mit Hybridisierungspuffer vorhybridisiert. Die Prä-Hybridisierungslösung wurde entfernt, die DNA-Sonde in Hybridisierungspuffer zugegeben und bei 37°C für mehr als 15 h inkubiert. Die radioaktive Lösung wurde abgenommen und der Filter zunächst bei RT zweimal 10 min in 2 x SSC + 0,1% SDS und dann 1 h bei 37°C in Hybridisierungswaschpuffer gewaschen. Der Filter wurde anschließend in eine Klarsichtfolie eingepackt, überschüssige Flüssigkeit mit Whatman-Filterpapier abgesaugt und auf einem Röntgenfilm (X-omat AR-5) mit Verstärkerfolie bei -70°C exponiert.

Hybridisierungspuffer

50% Formamid

1% Na-Laurylsarcosinat

0,1% SDS

4 mM EDTA (pH 7,2)

0,12 M Na-Phosphatpuffer (pH 6,8)

2 x SSC

4 x Denhardts Reagenz

Der Hybridisierungswaschpuffer hatte die gleiche Zusammensetzung, wurde jedoch ohne Denhardts Reagenz angesetzt. Für die Hybridisierung unter geringer Stringenz wurden Puffer mit 30% anstelle von 50% Formamid verwendet. Die Waschschriffe erfolgten wie oben beschrieben.

2.3.9 Amplifizierung von Nukleinsäuresequenzen

2.3.9.1 Oligonukleotide

Die für die Sequenzierung und Polymerase-Kettenreaktion (PCR) eingesetzten Oligonukleotide wurden in der Regel durch die Firmen MWG-Biotech oder ThermoHybaid (Interactiva) hergestellt und lyophilisiert geliefert. Die festen Oligonukleotide wurden in Wasser (bid., autokl.) aufgenommen und auf 20 pmol/µl verdünnt.

Oligonukleotide für die Sequenzierung

<i>YopO1.rev</i>	5' - AAG CCT CCA GTT CTG CGA ACA - 3'
<i>YopO2.uni</i>	5' - TTG CCG AGG GCG AAA GCC ATA - 3'
<i>YopO3.uni</i>	5' - ACA CTC TCG TTC AGG GGA ACA - 3'
<i>YopO4.uni</i>	5' - TTG CTT AGG ACG CAT TTG AGT - 3'
<i>YopO5.uni</i>	5' - ATC GTT CAG GTT CTT GGG CCG - 3'
<i>YopT1.rev</i>	5' - CGC CCG CCA ACA TAG AGC TGG - 3'
<i>YopT2.uni</i>	5' - TGA GGC TTT ATG TGC ACA TTG - 3'
<i>YopT3.rev</i>	5' - CGA CAA CCG CCG TGG AAT CAA - 3'

Soweit nicht anders angegeben, wurden für die Sequenzierung Standard-Primer der Firma TopLab verwendet.

Oligonukleotide für die Polymerase-Kettenreaktion

<i>1B101001.uni</i>	5'- ATG <u>AAT TCA</u> TGA AAC ATA TTG GTA GAA TTG - 3'
<i>1B101001.rev</i>	5'- ATG <u>GAT CCG</u> CAG TAA CTG TTG GTG CAG CAG - 3'
<i>1BXba1bsr.uni</i>	5'- CGC <u>TCT AGA</u> CGG ATG GAT CAA TTT AAC ATT - 3'
<i>1CXba1bsr.uni</i>	5'- CGC <u>TCT AGA</u> CGA TGG ATC AAT TTA ACA TT - 3'
<i>1Xho1bsr.rev</i>	5'- GGC <u>CTC GAG</u> CCG TTA ATT TCG GGT ATA TTT - 3'
<i>2B101001.uni</i>	5'- ATA <u>AGC TTA</u> TGA ATT TGC AAG ATC ACT TTC - 3'
<i>2B031201.rev</i>	5'- ATG <u>GCG CCT</u> TAC AAA TCG ATT ATT TTA TC - 3'
<i>2C091001.uni</i>	5'- ATG <u>AAT TCA</u> TGG TTG CAA ACA CTA AAG - 3'
<i>2C091001.rev</i>	5'- ATG <u>GAT CCT</u> AAA TAA GCT GGA TTA AAA - 3'
<i>3C091001.uni</i>	5'- ATA <u>AGC TTA</u> CTG GTC TTT TTA ATG GTG - 3'
<i>3C031201.rev</i>	5'- ATG <u>GCG CCG</u> CCA TTA CTA AAC CAG CAA - 3'
<i>bsr060701.rev</i>	5'- CAG TTA CTC GTC CTA TAT ACG - 3'
<i>C091001.uni</i>	5'- ATG <u>GAT CCG</u> CTG GTT TAC TTT TAT CAG TG - 3'
<i>C091001.rev</i>	5'- GCT <u>CTA GAA</u> TAA GAT ATC AAC ATA TTA TC - 3'
<i>C240102.rev</i>	5'- GTA AAC TTA TAC CAC TTG GTG - 3'
<i>lmpC-2uni</i>	5'- CGC <u>GGA TCC</u> ACA AGA ACT GCA AAT GAA TGG - 3'
<i>lmpC-3rev</i>	5'- CGC <u>TCT AGA</u> TGG AAC ACC ATT AAA AAG ACC - 3'
<i>lmpB-1uni</i>	5'- CGC <u>GGA TCC</u> GGA GAT CCA AAC AAT GTT AGA ACC - 3'
<i>lmpB-2rev</i>	5'- CGC <u>TCT AGA</u> CTG GGT CAT TAC CAG CTG CAG - 3'

2.3.9.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion wurde angewendet, um genomische DNA-Abschnitte des *lmpB*- oder des *lmpC*-Genes zu amplifizieren, um Restriktionsstellen an DNA-Fragmenten anzuhängen oder zur Überprüfung von *lmpB*- und *lmpC*-Mutanten. Das Volumen eines PCR-Ansatzes betrug 50 µl; durch die Verwendung eines Thermoblocks (Biometra UNO) mit beheizbarem Deckel entfiel die Übersichtung mit Mineralöl. Die Hybridisierungstemperatur T_m (°C) eines Oligonukleotids wurde anhand seiner Basenzusammensetzung wie folgt abgeschätzt (Suggs et al., 1981):

$$T_m (\text{°C}) \cong 4 \times (N_G + N_C) + 2 \times (N_A + N_T) - 10$$

Mit N = Anzahl der Adenine (A), Thyminidine (T), Guanidine (G) oder Cytosine (C) im Oligonukleotid.

Reaktionsansatz (50 µl):

0,5 µg Plasmid-DNA bzw. genom. DNA
 10 pmol 5'-Oligonukleotid
 10 pmol 3'-Oligonukleotid
 dNTP-Mix (jeweils 10 mM)
 75 mM MgCl₂
 5 µl 10 x PCR-Puffer
 1,25-2,5 U Taq-DNA Polymerase
 ad 50 µl mit H₂O (bid., autokl.)

Reaktionsbedingungen:

Denaturierung: 94°C, 60 s
 Hybridisierung: 50-68°C, 60-90 s
 Verlängerung: 68-72°C, 60-90 s
 Zyklenzahl: 25-30

10 x PCR-Puffer

100 mM Tris/HCl (pH 8,3)
 500 mM KCl
 15 mM MgCl₂
 0,1% (^w/_v) Gelatine

2.3.10 Phosphatase-Behandlung (Sambrook et al., 1989)

Um die Religation eines linearisierten Vektors zu verhindern, wurden die Phosphatgruppen am 5'-Ende mit alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm entfernt. Dazu wurden im Zuge der Restriktion 1-2 U alkalischer Phosphatase zu der bereits linearisierten Vektor-DNA gegeben und weitere 30 min bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch anschließende Fällung der DNA gestoppt.

2.3.11 Überführung überstehender Enden in glatte Enden (Sambrook et al., 1989)

Viele Restriktionsenzyme erzeugen kohäsive Enden mit einem 5'- oder 3'- überstehenden Ende. 5'- Überhänge können mit dem Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I (1U) und Nucleotiden aufgefüllt werden; im Gegensatz dazu werden beim 3'- Überhang in Gegenwart des Klenow-Fragmentes (1U) die überhängenden Nucleotide abgespalten. Die Reaktion fand für 30 min bei 37°C statt, die anschließende Inaktivierung erfolgte für 30 min bei 75°C.

2.3.12 DNA-Ligase-Reaktion

DNA-Fragmente wurden mit T4 DNA Ligase verknüpft. Dabei wurde stets ein molares Vektor/Insert-Verhältnis von 1:5 bis 1:10 gewählt und von 100-200 ng Vektor-DNA ausgegangen. Die Ligationsreaktion wurde 14-16 h bei 16°C in einem Volumen von 20 µl inkubiert.

Reaktionsansatz:

5 x Ligationspuffer (pH 7,6)

linearisierte Vektor-DNA (100-200 ng)	100 mM Tris/HCl
DNA-Fragment	25 mM MgCl ₂
¹ / ₅ Vol 5 × Ligationspuffer	25 mM DTT
1 U T4 DNA Ligase	2,5 mM ATP
ad 10 oder 15 µl mit H ₂ O (bid., autokl.)	250 µg/ml BSA

2.3.13 Transformation von *E. coli*

2.3.13.1 Präparation kompetenter Zellen

Die Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen stellt ein wichtiges Kriterium für die Effizienz der Transformation rekombinanter Plasmide dar. Da es in *E. coli* nicht möglich ist, natürliche Kompetenz zu induzieren, wurde die Methode von Hanahan (1983) verwendet, um durch die Behandlung der Zellen mit CaCl₂/RbCl eine artifizielle Kompetenz zu erzeugen.

Der entsprechende *E. coli*-Stamm wurde ÜN im SOB-Medium angezogen und morgens 1:100 in 50 ml frisches Medium überimpft. Wenn die Kultur eine optische Dichte (OD₆₀₀) von 0,5 bis 0,6 erreicht hatte, wurde sie gekühlt und für 10 min bei 6.000 UpM bei 4°C abzentrifugiert. Das Pellet wurde anschließend in 20 ml kaltem Transformationspuffer 1 aufgenommen und 15 min auf Eis inkubiert. Nach dem erneuten Abzentrifugieren wurden die Zellen in 3 ml Transformationspuffer 2 aufgenommen und zu 200 µl in 1,5 ml Eppendorfgefäße portioniert. Durch die Lagerung der Zellen bei -70°C läßt sich die artifiziell erzeugte Kompetenz über eine längere Zeit aufrechterhalten.

<u>Transformationspuffer 1</u>	<u>Transformationspuffer 2</u>	<u>SOB-Medium (1 l)</u>
10 mM RbCl	10 mM RbCl	20 g Trypton
100 mM CaCl ₂ x 2H ₂ O	50 mM CaCl ₂ x 2H ₂ O	5 g Hefeextrakt
	15% (^w / _v) Glycerin	10 mM NaCl
		2,5 mM KCl
		10 mM MgCl ₂
		10 mM MgSO ₄

2.3.13.2 Transformation von *E. coli*

100 µl der kompetenten Zellen wurden zu dem Ligationsansatz pipettiert und für 15 min auf Eis inkubiert. Durch einen nachfolgenden Hitzeschock für 5 min bei 37°C wurde die Aufnahme der DNA erreicht. Es folgte eine kurze Abkühlung für 1 min auf Eis. Danach wurde 1

ml SOB-Medium zum Ansatz zugegeben und die Zellsuspension für 45 bis 60 Minuten bei 37°C geschüttelt. Anschließend erfolgte das Ausplattieren auf selektives Agarmedium.

2.3.14 *E. coli*-Dauerkulturen

Wichtige Transformanten wurden als Dauerkulturen konserviert. Zu diesem Zweck wurden 800 µl einer ÜN-Kultur mit 200 µl Glycerin gemischt, Schock gefroren und bei -70°C gelagert.

2.3.15 Transformation von *D. discoideum*

Dictyostelium-Zellen wurden bis zu einer Dichte von 4×10^6 Zellen/ml kultiviert, geerntet und einmal in kaltem Soerensen-Puffer, sowie zweimal in eiskaltem Elektroporationspuffer gewaschen. Die Zellen wurden dann mit einer Dichte von 1×10^8 Zellen/ml in eiskaltem Elektroporationspuffer suspendiert. 1 ml dieser Zellsuspension wurden zusammen mit 15-30 µg des zu transformierenden Vektors in eine Elektroporationsküvette (4 mm Elektroden-abstand) pipettiert. In der Elektroporationsapparatur (Gene Pulser, Biorad) wurden die Zellen bei einer Kondensatorkapazität von 3 µF einer Spannung von 1,2 kV ausgesetzt. Danach wurden die Zellen sofort in eine Petrischale überführt und 10 min bei RT inkubiert. Dann wurden CaCl₂ und MgCl₂ in einer Endkonzentration von je 1 mM zugegeben, durch Schwenken verteilt, und die Zellen 15 min bei 21°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in HL5-Medium auf 1×10^6 Zellen/ml verdünnt und zur Regeneration 24 h bei 21°C aufbewahrt, bevor Selektionsdruck ausgeübt wurde.

Elektroporationspuffer (pH 6,1)

50 mM Saccharose

10 mM KH₂PO₄

Der pH wurde mit KOH eingestellt und der Puffer anschließend steril filtriert.

2.3.16 Klonierung der Transformanten von *D. discoideum*

Zur Klonierung wurden die Zellen nach 10-15 Tagen im Selektionsmedium von den Platten ab gespült, verdünnt und zusammen mit einer dichten Suspension von *K. aerogenes* in TE-Puffer auf SM-Platten ausgebracht ("spreadly dilution"), so daß man mit etwa 50-100 Zellen pro Platte rechnen konnte. Nach 2-3 Tagen konnten einzelne Kolonien mit einem Zahnstocher im Duplikat auf SM-*K. aerogenes*-Platten überführt bzw. auf Costar-Platten axenisch kultiviert werden.

Alternativ wurden die Zellen direkt nach der Transformation auf Mikrotiterplatten (200 µl/Well) verteilt ("single cell"-Klonierung). Hierbei wurden die transformierten Zellen vorher mit HL5-Medium auf ein Verhältnis von 2,5 Zellen/ml Medium eingestellt.

2.3.17 Konstrukte zur Gendisruption von *DdImpB* und *DdImpC*

Um *DdImpB* bzw. *DdImpC* in AX2- oder in pII/Ia2-Zellen zu inaktivieren, wurden verschiedene Konstrukte verwendet. Als Grundgerüst diente der Vektor pUCBsrDBam. Dieser Vektor enthält eine Resistenz-Kassette (*bsr*-Kassette), die für eine Deaminase kodiert und eine Resistenz gegenüber Blasticidin S ermöglicht. Weiterhin ist eine *Amp^r*-Kassette vorhanden.

pUCBsrDBam-*nImpB*: Direkt vor der *bsr*-Kassette wurde ein ein N-terminales Fragment von *ImpB* kloniert. Das 460 Bp große *ImpB*-Fragment wurde mit den Primern *ImpB-1uni* und *ImpB-2rev* in der PCR amplifiziert und in die Schnittstellen BamHI/XbaI kloniert. Die *Dictyostelium*-Zellen wurden dann mit dem ungeschnittenen oder mit dem linearisierten (XhoI bzw. ScaI) Konstrukt transformiert.

pUCBsrDBam-*ImpB*: Ein 600 Bp großes N-terminales *ImpB*-Fragment wurde mit den Primern *1B101001.uni* und *1B101001.rev* amplifiziert und in die Schnittstellen EcoRI/BamHI "upstream" der *bsr*-Kassette kloniert. Ein weiteres 600 Bp großes C-terminales *ImpB*-Fragment (Primer *2B101001.uni* und *2B031201.rev*) wurde "downstream" von der *bsr*-Kassette in die HindIII/NarI-Schnittstellen kloniert. Die *Dictyostelium*-Zellen wurden dann mit den EcoRI/NarI-Fragmenten transformiert.

pUCBsrDBam-*clmpC*: Direkt vor der *bsr*-Kassette wurde ein ein C-terminales Fragment von *ImpC* kloniert. Das 480 Bp große BamHI/SalI(blunt)-Fragment aus pQE32-*ImpC* (siehe 2.4.8) wurde in die BamHI/SmaI-Schnittstellen kloniert. Die *Dictyostelium*-Zellen wurden dann mit dem ungeschnittenen oder mit dem linearisierten (XhoI bzw. ScaI) Konstrukt transformiert.

pUCBsrDBam-*clmpCbsr*: In diesem Konstrukt liegt das *bsr*-Gen im Leserahmen eines C-terminalen *ImpC*-Fragmentes. Dabei wurde das 475 Bp große BamHI/XbaI-Fragment aus pQE32-*ImpC* (siehe 2.4.8) in die BamHI/XbaI-Schnittstellen kloniert. Das *bsr*-Gen wurde mit Hilfe der Primer *1BXbaIbsr.uni* und *1XhoIbsr.rev* amplifiziert. Zuvor wurde die *bsr*-Kassette mittels XbaI/XhoI-Spaltung ent-

fernt. Die *Dictyostelium*-Zellen wurden dann mit den BamHI/XhoI-Fragmenten transformiert.

pUCBsrDBam-*nImpCbsr*: In diesem Konstrukt liegt das *bsr*-Gen im Leserahmen eines N-terminalen *ImpC*-Fragmentes. Das 950 Bp große *ImpC*-Fragment wurde mit den Primern C091001.uni und C091001.rev amplifiziert und in die BamHI/XbaI-Schnittstellen kloniert. Das *bsr*-Gen wurde mit Hilfe der Primer *1BXba1bsr.uni* und *1Xho1bsr.rev* amplifiziert. Zuvor wurde die *bsr*-Kassette mittels XbaI/XhoI-Spaltung entfernt. Die *Dictyostelium*-Zellen wurden dann mit den BamHI/XhoI-Fragmenten transformiert.

pUCBsrDBam-*ImpC*: Ein 660 Bp großes N-terminales *ImpC*-Fragment wurde mit den Primern *2C091001.uni* und *2C091001.rev* amplifiziert und in die Schnittstellen EcoRI/BamHI "upstream" der *bsr*-Kassette kloniert. Ein 400 Bp großes C-terminales *ImpC*-Fragment, mit den Primern *3C091001.uni* und *3C031201.rev* in der PCR amplifiziert, wurde "downstream" von der *bsr*-Kassette in die HindIII/NarI-Schnittstellen kloniert. Die *Dictyostelium*-Zellen wurden dann mit den EcoRI/NarI-Fragmenten transformiert.

2.4 Proteinchemische und immunologische Methoden

2.4.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Für die diskontinuierliche SDS-PAGE (Lämmli, 1970) wurden in der Regel 7,5%, 10%, 12% oder 15% ige Trenngele und 3% ige Sammelgele verwendet (7,5 × 10 × 0,05 cm).

<u>Trenngel (15%)</u>	<u>Sammelgel (3%)</u>
380 mM Tris/Glycin (pH 8,8)	125 mM Tris/Glycin (pH 6,8)
0,1 % SDS	0,1 % SDS
15 % Acrylamid (38:1 Bisacrylamid)	3,3 % Acrylamid (38:1 Bisacrylamid)
pro 42 ml:	pro 16 ml:
480 µl 20% iges APS	240 µl 20 % iges APS
12 µl TEMED	8 µl TEMED

Zu der aufzutrennenden Proteinlösung wurde $\frac{1}{2}$ Vol 3 × SDS-Probenpuffer gegeben und die Lösung für 3-5 min gekocht. Die Auftrennung der Proteine erfolgte bei 140-180 V konstanter

Spannung im unten beschriebenen Elektrophorese-Puffer. Als Standards wurden Gemische von Proteinen definierter Molekülmassen verwendet (s.u.).

<u>3 × SDS-Probenpuffer</u>	<u>Elektrophoresepuffer</u>
65 mM Tris/HCl (pH 6,8)	25 mM Tris
10% Glycerol	192 mM Glycin
3% (w/v) SDS	0,1 % (w/v) SDS
5% β-Mercaptoethanol	
Bromphenolblau <i>ad lib.</i>	

LMW ("low molecular weight", Biorad)

92,5 kDa, 68 kDa, 45 kDa, 33 kDa, 20 kDa, 14 kDa

"See Blue" (Novex, Invitrogen)

250 kDa, 98 kDa, 64 kDa, 50 kDa, 36 kDa, 30 kDa, 16 kDa, 6 kDa, 4 kDa

2.4.2 Coomassie-Blau-Färbung von Proteinen

SDS-PAGE-Gele wurden für 15-30 min in Färbelösung geschüttelt. Nicht gebundener Farbstoff wurde anschließend durch Schütteln in einer Entfärbelösung ausgewaschen.

<u>SDS-PAGE-Gelfärbelösung</u>	<u>Entfärbelösung</u>
0,1% Coomassie-Brilliant-Blau R 250	10% Ethanol
50% Methanol	7% Essigsäure
12% Essigsäure	
filtrieren	

2.4.3 Immunoblot ("Western-Blot") – Nachweis der Antigene durch Chemilumineszenz

Nach der Auftrennung der Proteinproben mittels SDS-PAGE wurden die Proteine nach der modifizierten Methode von Towbin et al. (1979) auf Nitrozellulose (Schleicher & Schuell BA85) transferiert. Dies erfolgte in der Regel mit einer "semi-dry" Elektrophorese-Apparatur (BioRad Trans-Blot SD) zwischen in Transferpuffer getränktem Whatman-Filterpapier bei 12 V für 60 min.

Transferpuffer

25 mM Tris/HCl (pH 8,5)

190 mM Glycin

20% Methanol

0,02% SDS

Nach dem Transfer der Proteine auf Nitrozellulose wurde diese $\ddot{U}N$ (oder mindestens 1 h) mit 5% Milchpulver in NCP-Puffer abgesättigt. Anschließend wurde die Nitrozellulose 3 \times mit NCP-Puffer (jew. 5-10 min) gewaschen und mit dem ersten Antikörper (1:2.000 bis 1:40.000 in NCP-Puffer mit 0,5% BSA) für 1 h inkubiert. Danach wurde wieder mehrfach gewaschen. Der Nitrozellulosefilter wurde anschließend mit 1 ml Nachweisreagens für Chemilumineszenz (ECL: *enhanced chemiluminescence*, Biosciences) überschichtet; die Lumineszenzreaktion wurde mit Hilfe eines Röntgenfilmes (X-omat AR 5, Kodak) nachgewiesen.

Chemilumineszenz-Reagens

200 μ l Luminol (250 mM in DMSO; Luminol: 3-Amino-phthalhydrazid)

89 μ l p-Cumarsäure (90 mM in DMSO)

2 ml Tris/HCl (1 M, pH 8,5)

ad 20 ml mit bid. H₂O (im Dunkeln aufbewahren!)

vor Gebrauch H₂O₂ (30%, 1 μ l auf 3 ml Reagenslösung) zugeben

2.4.4 Proteinbestimmung

2.4.4.1 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Bestimmung der Proteinkonzentration wurde nach der Methode von Bradford (1976) durchgeführt. Diese beruht auf der Bindung von Coomassie Blau G-250 durch Proteine, wobei das Absorptionsmaximum des Farbstoffes von 465 nm nach 595 nm verschoben wird. Zur Erstellung der Eichkurve wurde Rinderserumalbumin als Standard verwendet. SDS stört die Reaktion stark, weshalb für SDS-haltige Proben die Methode nach Lowry verwendet wurde.

2.4.4.2 Proteinbestimmung nach Lowry

Die Methode von Lowry et al. (1951) basiert auf der Reaktion des Folin-Ciocalteus-Phenol-Reagens (Phosphor-Wolfram/Molybdänsäurekomplex) mit Proteinen, wobei sich durch die Reaktion mit Tyrosin-Resten ein blaue Verfärbung ergibt. Die Extinktion verhält sich direkt proportional zu der Proteinmenge und kann photometrisch bei 750 nm bestimmt werden. Die Reaktion wird durch DTT beeinträchtigt. Bei der Messung SDS-haltiger Proben wurde für die Kalibrierung SDS in der gleichen Konzentration zugesetzt.

2.4.5 Aufreinigung und Markierung von Aktin

2.4.5.1 Präparation von Aktin aus Kaninchenmuskel

Die Präparation von Aktin aus Kaninchenmuskel folgte im wesentlichen den von Spudich und Watt (1971) sowie Pardee und Spudich (1982) beschriebenen Methoden. Bis zur Aufnahme des Sediments in Aceton (s.u.) wurde dabei stets bei 4°C gearbeitet. Begonnen wurde damit, frisches Muskelfleisch aus Kaninchenschenkel oder -rücken (vom Viktualienmarkt München, möglichst schlachtfrisch und nicht abgehangen) in einem Fleischwolf zu zerkleinern und 10 min mit eiskaltem Hochsalzextraktionspuffer unter Rühren zu extrahieren.

Das Gemisch wurde bei 4.000 x g (10 min, 4°C) abzentrifugiert und der Extraktionsschritt wiederholt. Dabei wurde hauptsächlich Myosin extrahiert. Als nächstes wurde das Sediment in eiskaltem Wasser aufgenommen und der pH-Wert durch Zugabe einer 1 M Na₂CO₃-Lösung auf 8,2 bis 8,5 eingestellt. Nach erneuter Zentrifugation (4.000 x g, 10 min, 4°C) wurde der Überstand verworfen und der Vorgang mehrfach wiederholt, bis ein Anschwellen des Sediments zu beobachten war. Dieses wurde dann unter Rühren mit kaltem Aceton versetzt und etwa 1 h lang stehen gelassen, wobei mehrere Male umgerührt wurde. Anschließend wurde das Aceton gewechselt, die Inkubation wiederholt und danach der Ansatz durch ein Netzfilter filtriert. Das so erhaltene Acetonpulver wurde dann auf Abreibrollenpapier gelegt, mit dem Netzfilter abgedeckt und ÜN bei RT im Abzug getrocknet. Danach konnte es bei -20°C trocken gelagert werden.

10 g des Acetonpulvers wurden in 200 ml G-Puffer für 30 min bei 0°C extrahiert und anschließend über mehrere Lagen Nylonfilter filtriert. Der Rückstand wurde nochmals auf gleiche Weise extrahiert. Die Filtrate wurden dann vereinigt und zentrifugiert (30.000 x g, 30 min, 0°C). Um eine Polymerisation des Aktins zu erreichen, wurde der erhaltene Überstand auf 50 mM KCl, 2 mM MgCl₂ und 1 mM ATP eingestellt und für 2 h bei 4°C inkubiert. Die Polymerisation des Aktins war an der Zunahme der Viskosität der Lösung zu erkennen. Durch langsame Zugabe von festem KCl wurde die KCl-Konzentration der Lösung auf 0,8 M erhöht. Dieser Schritt diente zur Entfernung von Tropomyosin. Die Aktin-Filamente konnten dann durch Zentrifugation (150.000 x g, 3 h) sedimentiert werden. Das F-Aktin-Sediment wurde in G-Puffer aufgenommen und zur Depolymerisation unter mehrfachem Pufferwechsel gegen G-Puffer dialysiert. Zur Abtrennung kurzer Aktin-Oligomere und noch vorhandener Verunreinigungen wurde das Dialysat nochmals zentrifugiert (100.000 x g, 3 h) und die oberen ²/₃ des Überstands über eine in G-Puffer äquilibrierte Sephacryl S300 (Pharmacia) Gel-filtrationssäule (2,5 x 45 cm) gereinigt. Das so erhaltene G-Aktin wurde bei 0°C gelagert.

Aufgrund der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 290 nm konnte die G-Aktin-Konzentration (mg/ml) durch das Verhältnis $OD_{290}/0,65$ berechnet werden. Der molare Extinktionskoeffizient von Aktin bei 290 nm beträgt $26.600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Wegner, 1976).

Extraktionspuffer (pH 6,5)

0,5 M KCl

0,1 M K_2HPO_4

G-Puffer (pH 8,0)

2 mM Tris/HCl

0,2 mM CaCl_2

0,2 mM ATP

0,02% NaN_3

0,5 mM DTT

2.4.5.2 Pyren-Markierung von Aktin

Die Markierung von Aktin mit N-(1-pyrenyl)iodoacetamid (Pyren) wurde nach Kouyama und Mihashi (1981) durchgeführt. Das gereinigte G-Aktin wurde dazu dreimal gegen je 1 l P-Puffer dialysiert. Durch die anschließende Zugabe von KCl und MgCl_2 (150 mM bzw. 2 mM Endkonzentration) wurde die Aktin-Polymerisation gestartet und unmittelbar danach Pyren (in DMSO) im 3-5 fachen molaren Überschuß tropfenweise unter Rühren zugegeben. Da Pyren lichtempfindlich ist, wurden alle folgenden Schritte bei leichter Abdunklung durchgeführt. Das Aktin-Pyren-Gemisch wurde zunächst 60 min bei RT und dann ÜN bei 4°C geschüttelt. Anschließend wurden die Aktinfilamente durch Zentrifugation ($150.000 \times g$, 3 h, 4°C) sedimentiert. Das F-Aktin-Sediment wurde in G-Puffer homogenisiert und dreimal gegen G-Puffer dialysiert, um die Depolymerisation des Aktins zu ermöglichen. Nach erneuter Ultrazentrifugation ($150.000 \times g$, 3 h, 4°C) wurde das Pyren-markierte G-Aktin mittels Gelfiltration weiter aufgereinigt und schließlich bei -70°C gelagert. Der Anteil Pyren-markierten Aktins wurde über die molaren Extinktionskoeffizienten von Aktin ($\epsilon_{290} = 26600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), Pyren-Aktin ($\epsilon_{290} = 29400 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) und Pyren ($\epsilon_{344} = 22.000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) nach folgender Formel berechnet (Cooper et al., 1983):

$$\text{Aktinkonzentration: } c_{\text{Aktin}} = (\text{OD}_{290} - (0,127 \times \text{OD}_{344})) / \epsilon_{\text{Aktin}}$$

$$\text{Anteil Pyren-markierten Aktins: Pyren-Aktin (\%)} = c_{\text{Pyren}} \times 100 / c_{\text{Aktin}}$$

Die Effizienz der durchgeführten Markierungen von Aktin mit Pyren nach der beschriebenen Methode lag bei 70-90%.

P-Puffer (pH 7,6)1 mM NaHCO₃0,1 mM CaCl₂

0,2 mM ATP

2.4.6 Nachweis der Aktinbindung2.4.6.1 Fluoreszenzspektroskopie

Während der Polymerisation von Pyren-markiertem Aktin erhöht sich die Fluoreszenz der gebundenen Pyrenmoleküle um etwa das 10-20-fache. Die Messungen erfolgten mit einem Lumineszenz-Spektrometer (Aminco Bowman) in 1 ml Polystyren-Küvetten (Sigma, #C-5416). Anregungs- und Emissionswellenlänge betragen dabei 365 bzw. 386 nm. Die Polymerisation von Aktin, die bei RT nach gut 1 h vollständig war, wurde in Gegenwart unterschiedlicher Konzentrationen verschiedener YopO-Konstrukte gemessen. Das Gesamtvolumen des Versuchsansatzes betrug 800 µl.

Es wurden im allgemeinen 3 µM G-Aktin und 0,3 µM Pyren-G-Aktin (Endkonzentration) mit dem zu untersuchenden Protein in der Küvette gemischt und die Polymerisation durch Zugabe von 80 µl 10 × Polymerisationspuffer (mit Ca²⁺ oder EGTA) und Wasser (*ad* 800 µl) gestartet. Die unterschiedlichen Fluoreszenzwerte zum Startzeitpunkt, die auf der direkten G-Aktin-Protein-Interaktion beruhten, wurden jeweils gleich Null gesetzt.

10 × Polymerisationspuffer (pH 7,2)

100 mM Imidazol

20 mM MgCl₂

10 mM ATP

2 mM CaCl₂2.4.6.2 Nachweis der Actinbindung durch Kosedimentation mit F-Aktin

Aktinfilamente ab einer Länge von etwa zehn Monomeren können bei 50.000 UpM sedimentiert werden. Proteine, die mit F-Aktin assoziiert sind, befinden sich dann ebenfalls im Aktin-Sediment. Dieser als "spin-down assay" bezeichnete Versuch erlaubt daher die Untersuchung der Bindung oder Assoziation eines Proteins an Aktinfilamente.

Das hierbei eingesetzte Aktin, YopO bzw. K269A wurde zuvor bei 50.000 UpM vorzentrifugiert (10 min, 4°C, Optima TL Ultrazentrifuge, Beckman). Das Gesamtvolumen der Ansätze betrug jeweils 50 µl. 5 µM Aktin und 2,5 µM YopO-Konstrukt wurden in 1 × Polymerisa-

tionspuffer (mit Ca^{2+}) gemischt und nach gut einstündiger Inkubation bei 50.000 UpM (30 min, 4°C, Optima TL Ultrazentrifuge, Beckman) abzentrifugiert. Die Überstände wurden dann mit 25 μl 3 \times SDS-Probenpuffer versetzt. Die Sedimente wurden jeweils vorsichtig, aber gründlich von den Überständen befreit, gut getrocknet und schließlich quantitativ in 50 μl 1 \times SDS-Probenpuffer resuspendiert. Die Sediment-Suspensionen und Überstände wurden dann mittels SDS-PAGE aufgetrennt und durch Coomassie-Blau-Färbung analysiert.

2.4.7 Kinase-Assay

Die für den Kinase-Assay notwendigen YopO-Konstrukte wurden mir freundlicherweise von Guelnihal Yueksekdag zur Verfügung gestellt.

Die Kinase-Assays wurden in einem Volumen von 50 μl durchgeführt. Zuvor wurde Aktin und die YopO-Konstrukte für 10 min bei 50.000 UpM abzentrifugiert, um die vorhandenen Aggregate zu sedimentieren. Im Kinaseansatz selbst variierte die Konzentration von Aktin und den YopO-Konstrukten. Es wurde aber darauf geachtet, daß die gleiche Menge an kaltem ATP eingesetzt wurde. Zum Teil wurden Aktin-bindende Proteine, GTPasen, künstliche Substrate und Reagenzien in angegebenen Konzentrationen zum Ansatz hinzugegeben, um ihren Einfluß auf die Kinasereaktion zu studieren. Vom $\gamma\text{-}^{32}\text{P}\text{-ATP}$ (10 mCi/ml) wurden pro Reaktionsansatz 2 μl dazu pipettiert. Die Reaktion fand im 1 \times Kinasepuffer (plus 5 mM β -Glycerolphosphat und 5 mM Na-Pyrophosphat) für ca. 1 h bei RT statt. Durch die Zugabe von 25 μl 3 \times SDS-Probenpuffer wurde die Reaktion gestoppt. Die Überstände wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und durch Coomassie-Blau angefärbt. Über Nacht wurden dann die Gele getrocknet. Das Phosphorylierungssignal wurde mit Hilfe eines Röntgenfilmes (X-omat AR 5, Kodak) nachgewiesen.

2 \times Kinasepuffer (pH 7,4)

100 mM HEPES

10 mM MgCl_2

2 mM DTT

2.4.8 Induktion und Reinigung von rekombinantem his-DdLmpC aus *E. coli*

Zur Immunisierung von Kaninchen wurde ein C-terminales *DdlmpC*-Fragment rekombinant exprimiert (Expressionsvektor pQE32-*lmpC*), das zur leichteren Reinigung mit einem "His-tag" (6 Histidinreste) versehen war. Das Fragment wurde mit den Primern *lmpC-2uni* und *lmpC-3rev* und dem cDNA-Klon SSE457 (pBluescript SK+, enthält ein 2,5-kB Sali/NotI-

Insert mit dem kompletten Leserahmen von *ImpC*) als Matritze amplifiziert. Zunächst wurde das Fragment in den Schnittstellen BamHI/XbaI des Vektors pUC19 zwischenkloniert, um über die BamHI/SalI-Schnittstellen in den mit IPTG induzierbaren pQE32-Vektor kloniert zu werden. Zur Überprüfung wurde das Insert sequenziert, um Fehler durch die PCR-Amplifikation auszuschließen. Das resultierende rekombinante Protein bestand aus 174 Aminosäureresten, dies entspricht einer errechneten Molekülmasse von 19,7 kDa und einem isoelektrischen Punkt von 6,1. Zur Expression wurde der *E. coli* Stamm XL1-Blue verwendet. Eine 6 l Hauptkultur (LB-Medium) wurde auf eine OD₆₀₀ von 0,1 mit einer ÜN-Kultur angeimpft und bei 37°C bis zu einer OD₆₀₀ von ca. 0,6 wachsen gelassen. Die Induktion der Proteinexpression erfolgte durch die Zugabe von 1 mM IPTG und einer weiteren Inkubation für 4-5 h bei 37°C. Danach wurden die Zellen geerntet (4.200 UpM, 30 min, 4°C), in nativem Lysispuffer (einschließlich 1mM Benzamidin und 0,5 mM PMSF) resuspendiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Zellen wurden unter kaltem Wasser wieder aufgetaut und auf Eis homogenisiert. Nach der Zugabe von Lysozym (1mg/ml) wurden das Zellhomogenat mit Ultraschall (6 x 60 s, 50%) behandelt. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation (JA20, 12.500 UpM, 30 min 4°C). Das rekombinante Protein befand sich in "inclusion bodies", daher wurde der lösliche Überstand verworfen und das Sediment nach 2 weiteren Waschschritten im denaturierendem Lysispuffer (mit 2 M bzw. 4 M Harnstoff) in einem denaturierenden Lysispuffer mit 7 M Harnstoff in Lösung gebracht (2 Extraktionsschritte). Die Überstände der 7 M Harnstoff-Extraktionen wurden vereinigt und auf eine Ni²⁺-NTA-Säule geladen (3-5 ml Säulenmaterial, äquilibriert in denaturierendem Lysispuffer mit 7 M Harnstoff). Die Säule wurde nachfolgend mit dem selben Puffer bei pH 8,0, pH 6,3 und pH 5,9 gewaschen, bis die OD₂₈₀ jeweils auf 0,02 zurückging. Die Elution erfolgte bei pH 4,5. Die vereinigten Eluate wurden schrittweise gegen 1 x PBS-Puffer dialysiert, um den Harnstoff zu entfernen. Die Ankonzentrierung erfolgte mit Hilfe von Centrikon-Röhrchen. Die Ausbeute lag bei 1,2 mg gereinigtem his-DdLmpC aus einer 6 l Bakterienkultur.

nativer Lysispuffer50 mM NaH₂PO₄ (pH 8,0)

300 mM NaCl

10 mM Imidazol

denaturierender Lysispuffer

0,01 M Tris-HCl (pH 8,0)

0,1 M NaH₂PO₄

2 M, 4 M bzw. 7 M Harnstoff

2.4.9 Induktion und Reinigung von GST-Rac1, GST-RhoA und GST-CDC42

Alle drei humanen GTPasen wurden als GST-Fusionproteine (pGEX-Vektor) in *E. coli* DH5 α exprimiert. Die Rac1- und CDC42-Konstrukte wurden von H. Faix, das RhoA-Konstrukt von G. Yueksekdag zur Verfügung gestellt. Eine 2 l Hauptkultur (LB-Medium) wurde auf OD₆₀₀ von 0,1 mit einer Übernachtskultur angeimpft und bei 28°C bis zu einer OD₆₀₀ von ca. 0,6 wachsen gelassen. Die Induktion der Proteinexpression erfolgte durch die Zugabe von 0,2 mM IPTG und einer ÜN-Inkubation bei 28°C. Die Zellen wurden geerntet (4.200 UpM, 30 min, 4°C) und in PBS (einschließlich Lysozym (1mg/ml), β -Mercaptoethanol (Endkonzentration 2 mM) und Proteaseinhibitorcocktail) resuspendiert. Da im Protease-inhibitorcocktail EDTA enthalten war, wurde zum PBS MgCl₂ (Endkonzentration 2 mM) zugegeben, da Mg²⁺-Ionen wichtig für die GTPasen sind. Die Zellen wurden mit Ultraschall geöffnet (6 x 60 s, 50%, Eiswasser) und anschließend für 30 min bei 12.500 UpM und 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Falcon-Röhrchen dekantiert. Hierzu wurde dann an "beads" gekoppeltes Glutathion hinzugegeben, welches zuvor in PBS gelöst worden war (Spatelspitze!). Dieser Ansatz wurde dann ÜN bei 4°C auf einem Rotor inkubiert. Die "beads" wurden nachfolgend für 10 min bei 2.000 UpM und 4°C abzentrifugiert, in PBS (einschließlich MgCl₂ und Proteaseinhibitorcocktail) resuspendiert und auf eine Säule gegeben. Das Waschen der abgesetzten "beads" erfolgte mit PBS (einschließlich MgCl₂ und Proteaseinhibitorcocktail). Für die Eluierung wurde zu diesem Puffer 30 mM reduziertes Glutathion gegeben und der pH-Wert neu eingestellt, da Glutathion sauer ist. Die gesammelten Fraktionen wurden mehrfach gegen PBS (einschließlich Benzamidin, 5 mM MgCl₂ und 2 mM DTT) dialysiert.

2.4.10 Analytischer Protease-Verdau

Um die Membrantopologie von DdLmpB und DdLmpC zu ermitteln, wurden AX2-Membransedimente in TD-Puffer resuspendiert und mit 200 μ g/ml Trypsin bzw. 50 μ g α -Chymotrypsin in An- oder Abwesenheit von 0,1% Triton X-100 für 3 h bei 37°C bzw. 30 min auf Eis behandelt. Die nötige Trypsin- bzw. α -Chymotrypsin-Konzentration war zuvor durch eine Titrationsreihe ermittelt worden.

TD-Puffer (pH 8,0)

10 mM Tris/HCl

1 mM DTT

2.4.11 Zellfraktionierung

1 x 10⁹ Zellen einer axenisch gewachsenen *D. discoideum*-Kultur wurden abzentrifugiert und zweimal mit kaltem Soerensen-Puffer gewaschen. Das Zellpellet wurde mit einer Zelldichte von 1 x 10⁸ Zellen/ml in HEPES-Puffer resuspendiert und die Zellen durch einen kurzen Ultraschall-Impuls und mehrere Passagen durch einen Nuclepore-Filter mit 5 µm Porengröße geöffnet. Die vollständige Öffnung der Zellen wurde im Mikroskop kontrolliert. Das Homogenat wurde kurz abzentrifugiert (15.000 x g, 30 min, 4°C). Der Überstand wurde nach Abnahme eines Aliquots verworfen, das Membran-Pellet mit Hilfe eines Dounce-Homogenisators in einem kleinen Volumen HEPES-Puffer resuspendiert und auf einen vorbereiteten diskontinuierlichen Saccharose-Stufengradienten aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte in einem SW40 Rotor bei 112.000 x g (29.000 UpM, 20 h, 4°C). Die einzelnen Stufen des Gradienten (je 2 ml) enthielten (von oben nach unten) 0,88; 1,02; 1,17; 1,32; 1,47 und 2,49 M Saccharose (entspricht 30, 35, 40, 45, 50 und 80% (w/v) Saccharose) in HEPES-Puffer (Weiner et al., 1993). Nach der Zentrifugation wurden 11 Fraktionen von 0 M nach 2,49 M Saccharose entnommen, jede Fraktion umgehend in Immunoblots analysiert und auf Proteingehalt und Enzymaktivität untersucht. Durch die Messung der Enzymaktivitäten der sauren oder alkalischen Phosphatase (Loomis, 1969; Loomis und Kuspa, 1984) wurde die Verteilung von Plasmamembran und Lysosomen bestimmt.

HEPES-Puffer (pH 7,4)

10 mM HEPES/NaOH

1 mM DTT

0,5 mM PMSF

2 mM Benzamidin / + Proteaseinhibitorcocktail

2.4.12 Messung von Enzymaktivitäten in subzellulären Fraktionen

Die Aktivität der sauren und der alkalischen Phosphatase wurde in den einzelnen Fraktionen der Saccharose-Stufengradienten gemessen. Die Enzymaktivitäten in den einzelnen Fraktionen wurden als relative Werte in Prozent der Gesamtaktivität aller gemessenen Fraktionen eines Gradienten dargestellt.

Reaktionsansatz zur Aktivitätsbestimmung der sauren Phosphatase

500 µl Citratpuffer (90 mM, pH 4,8)

500 µl p-Nitrophenylphosphat (50 mM) (Substrattabletten, Sigma)

10 µl Fraktion

Nach 30 min Inkubation bei 37°C wurde die Reaktion durch Zugabe von 1 ml Na₂CO₃ (1M) gestoppt. Die Ansätze wurden kurz abzentrifugiert (13.000 UpM, 30 s) und die Optische Dichte der Überstände bei 410 nm im Spektralphotometer bestimmt. Als Standard diente eine Probe, bei der 10 µl H₂O zugegeben wurden.

Reaktionsansatz zur Aktivitätsbestimmung der alkalischen Phosphatase

Substrat-Lösung

10 mM p-Nitrophenylphosphat

10 mM MgCl₂

10 mM Tris/HCl (pH 8,5)

Ansatz

900 µl Substrat-Lösung

100 µl Fraktion

Nach 1 h Inkubation bei 25°C wurde die Reaktion durch Zugabe von 1ml Na₂CO₃ (1M) gestoppt. Die Ansätze wurden kurz abzentrifugiert (13.000 UpM, 30 s) und die Optische Dichte der Überstände bei 410 nm im Spektralphotometer bestimmt. Als Standard diente eine Probe, bei der 100 µl H₂O zugegeben wurden.

2.4.13 Herstellung von polyklonalen Antisera aus Kaninchen

Die Herstellung der polyklonalen Antisera wurde von der Firma Eurogentec (Ougrée, Belgien) vorgenommen. Hierfür wurden die rekombinanten Proteine his-DdLmpB und his-DdLmpC in 0,1% SDS gelöst nach Belgien geschickt. Je zwei Kaninchen (SA7654 und SA7655 für his-DdLmpC; SA7656 und SA7657 für his-DdLmpB) wurde Prä-Immuns Serum abgenommen und anschließend die Antigen-Lösung injiziert (jeweils etwa 100 µg rekombinantes Protein) gefolgt von weiteren "boost"-Injektionen nach 14, 28, 56 und 80 Tagen. Ab der 2. "boost"-Injektion wurde den Tieren jeweils 10 Tage nach der Injektion eine geringe Menge Blut (anfangs 2 ml, dann 20 ml) entnommen und in gefrorener Form verschickt. Das Serum wurde jeweils auf seine Reaktivität gegenüber dem rekombinanten Protein und *D. discoideum* Zellhomogenaten getestet. Nach ca. 100 Tagen wurden die Kaninchen ausgeblutet (50 ml).

2.4.14 Affinitätsreinigung von polyklonalem Antikörper

Rekombinantes his-DdLmpC wurde auf Nitrozellulose gegeben, getrocknet und anschließend mehrere Stunden in PBS gewaschen. Nach dreimaligen Waschen mit NCP + 0,5% BSA er-

folgte eine ÜN-Inkubation der Nitrozellulose mit 300 µl Serum + 200 µl NCP bei 4°C. Anschließend wurde die Nitrozellulose 3 x 5 min mit NCP + 0,5% BSA gewaschen. Die Elution der gebundenen Antikörper erfolgte mit 2 x 150 µl Glycin/HCl (100 mM, pH 2,5). Die Eluate wurden anschließend mit 6 µl Tris (1 M) neutralisiert. Die Lagerung der affinitätsgereinigten Antikörperlösung erfolgte bei -20°C.

2.5 Zellbiologische Methoden

2.5.1 Indirekte Immunfluoreszenz

Für die Immunfluoreszenzmarkierungen wurden die Deckgläschen zunächst mit 0,1 M Salzsäure gereinigt. Die *Xenopus*-Herzmuskel-Zellen (Xth2) wurden bei RT direkt auf das Deckgläschen wachsen gelassen. Die *D. discoideum*-Zellen wurden bis zu einer Dichte von 3×10^6 Zellen/ml geerntet. 5×10^5 Zellen wurden auf ein Deckgläschen ausgebracht und für 30 min erlaubt abzusetzen. Nach Absaugen der überschüssigen Flüssigkeit wurden die Deckgläschen für 10 min in -20°C kaltes Methanol gegeben, um die Zellen zu fixieren. Die Deckgläser wurden an der Luft getrocknet und mit den Zellen nach oben auf einen Parafilm gelegt. Anschließend wurde 1 h mit PBG abgesättigt und für 1-3 h mit Verdünnungen des ersten Antikörpers gegen DdLmpB und DdLmpC (1:200 bis 1:500) in PBG inkubiert. Nach Entfernen des ersten Antikörpers wurden die Präparate 5 x 10 min mit PBG gewaschen und mit dem zweiten, fluoreszenzmarkierten Antikörper in PBG für 1 h überschichtet. Zum Einsatz kamen Alexa-488 oder Cy3-gekoppeltes Ziege-anti-Kaninchen IgG (1:100 bis 1:1000 verdünnt). Zur Färbung des Zellkerns wurde DAPI (4,6-Diamidino-2-Phenylindol, Sigma) in einer Verdünnung (0,5 µg/ml Endkonzentration) zugegeben. Nach dreimaligen Waschen mit PBS und dH₂O wurden die Präparate in Gelvatol eingebettet und zum Aushärten über Nacht bei 4°C aufbewahrt.

Als Kontrolle für die Spezifität der Antiseren diente das jeweilige Prä-Immunserum, welches unter den gleichen Bedingungen getestet wurde. Weiterhin zur Kontrolle wurden die Antiseren von DdLmpB und DdLmpC gegen die *D. discoideum* RB2-Zellen getestet.

10 x PBS (für Immunfluoreszenz, pH 7,4)

1,37 M NaCl

27 mM KCl

81 mM NaH₂PO₄

15 mM KH₂PO₄

in bid. H₂O, autoklavieren

Gelvatol

PBG

0,5% BSA

0,05% Fischgelatine

in 1 x PBS, steril filtrieren

20 g Gelvatol 20-30 (Polyvinylalkohol, MW 10.000) 16 h in PBS rühren
40 ml Glycerin zugeben, nochmals 16 h rühren
zentrifugieren (12.000 g, 15 min, RT), Überstand abnehmen
25 ng/ml DABCO (Diazabicyclo-(2,2,2)-oktan) zum Überstand geben und aliquotiert in
Spritzen bei -20°C lagern

2.5.2 Nachweis von Makropinosomen und Endosomen

Für die Markierung von Makropinosomen und Endosomen wurden zunächst die Deckgläschen mit 0,1 M Salzsäure und destilliertem H₂O gereinigt. Exponentiell wachsende *Dictyostelium*-Zellen wurden auf das Deckgläschen gebracht und für 15 min bei RT absitzen lassen. Danach wurde das Medium entfernt und gegen eine TRITC-Dextran-Lösung (5 mg/ml TRITC-Dextran (MW 155.000) in HL5) für die gewünschte Zeit ausgetauscht (Hacker et al., 1997). Die Zellen wurden anschließend 2 x kurz in Phosphatpuffer gewaschen und dann sofort fixiert, oder es wurde frisches HL5-Medium für eine gewählte Zeit wieder hinzugegeben und dann fixiert. Die Fixierung erfolgte mit -20°C kaltem Methanol (einschließlich 1% Formaldehyd). Dem folgte ein Waschgang mit Ethanol (70%), anschließend mehrere mit PBS/Glycin.

PBS/Glycin

PBS + 100 mM Glycin

(Glycin sättigt freie Aldehydgruppen ab.)

2.5.3 Konfokale Mikroskopie

Konfokale Mikroskopie wurde an Standard-Immunfluoreszenzpräparaten mit einem invers angeordneten Mikroskop (Leica TCS-SP Mikroskop), das mit einem Argon-Laser sowie mit einem 63X PI Fluotar 1.32 Ölimmersionobjektiv ausgerüstet war, durchgeführt. Folgende Laserwellenlängen wurden verwendet: 488 nm (Alexa488) und 514 nm (TRITC). Zur Untersuchung der Präparate mit Doppelfärbung wurden beide Farbstoffe separat gemessen und anschließend zusammengesetzt. Dadurch sollte ein "cross talk" zwischen den Signalen vermieden werden, der sich bei gleichzeitiger Messung beider Wellenlängen störend auswirkt. Die Rohdaten wurden auf ein Leica TCS NT Bildverarbeitungssystem übertragen und auf einem Power Macintosh 8500/180 mit den Programmen NIH Image und Adobe Photoshop weiterverarbeitet.

3 Ergebnisse

Teil 1

3.1 Biochemische und zellbiologische Charakterisierung von DdLmpB und DdLmpC

3.1.1 Expression eines C-terminalen *DdlmpC*-Fragmentes in *E. coli*

Für die Herstellung polyklonaler Antikörper wurde ein Fragment aus *DdlmpC* durch PCR an der cDNA amplifiziert, das Produkt in den His-Vektor pQE32 kloniert, in *E. coli* XL1-blue-Zellen exprimiert, und das rekombinante Protein über eine Ni²⁺-NTA-Säule isoliert. Die Aminosäuresequenz des rekombinanten Proteins ist in Abb. 3 wiedergegeben. Die Verwendung von bakteriell exprimiertem Protein hat den Vorteil, daß nur Peptid-Epitope vorliegen. Bei der Nutzung des endogen exprimierten DdLmpC für die Immunisierung (es besteht aus 783 Aminosäuren) würden auch die vermutlich zahlreichen N-Glykosylierungen (22 mögliche Stellen) antigenisch wirken. Dies könnte zu einer hohen Kreuzreaktivität mit anderen Glykoproteinen führen.

```

1  MRGSHHHHHH GSTRTANEWL WDCQDDLLDY LGIDQQCSFQ QNNTIFKPST
51  VYTGKKDLSL TNQYQQFQEQ STLTIWNGTV NVTGFVENGQ MAPLVQDNLP
101 QSLTIFEENI LRPLSLVHSS SSSVMGVSTQ RYYLPNQSF IDPVFNNSIN
151 GFANLTGLEFN GVPSRVDLQP SLIS*

```

Abb. 3: Aminosäuresequenz von his-DdLmpC

Das rekombinante Protein his-DdLmpC besteht aus insgesamt 174 Aminosäuren. Die 6 N-terminal gelegenen Histidinreste (unterstrichen) sind mit einem C-terminalen Fragment von DdLmpC verknüpft. Das C-terminale Fragment von DdLmpC (fett und kursiv) wurde mit den Primern *lmpC-2uni* und *lmpC-3rev* und dem cDNA-Klon SSE457 als Matritze in der PCR amplifiziert. Dieses Fragment wurde in den Vektor pUC19 in den Schnittstellen BamHI und XbaI zwischenkloniert. Dem folgte eine Umklonierung in den pQE32-Vektor (BamHI/SalI) (siehe auch 2.4.8).

Untersuchungen ergaben, daß für die Expression des rekombinanten Proteins XL1-blue-Zellen besser geeignet waren als M15-Zellen (nicht dargestellt). Eine maximale Proteinmenge an his-DdLmpC wurde dabei nach einer 5 h Induktion mit 1 mM IPTG festgestellt. Eine ÜN-Induktion mit IPTG ergab keine höhere Ausbeute (Vergleich Spur 3 und 4 in Abb. 4A). Obwohl das klonierte Fragment für die Aminosäuren 472-622 und somit nicht für die C-terminal gelegene transmembrane Domäne kodierte, bildete das rekombinante Protein in *E. coli* "inclusion bodies". Dies läßt sich aus der Beobachtung ableiten, daß erst denaturierender 7 M Harn-

stoffpuffer (pH 8,0) große Mengen des rekombinanten Proteins aus der Pelletfraktion der geöffneten Zellen in den löslichen Überstand überführen konnte (Abb. 4A). Diese Fraktion wurde anschließend auf eine Ni²⁺-NTA-Säule geladen. Nach mehreren Waschgängen, in denen schrittweise der pH-Wert gesenkt wurde, konnte his-DdLmpC erfolgreich bei pH-Wert 4,5 eluiert werden (Abb. 4B). Das eluierte Protein wurde dialysiert und ankonzentriert. Die Ausbeute lag bei etwa 1,2 mg gereinigtem his-DdLmpC aus einer 6 l Bakterienkultur.

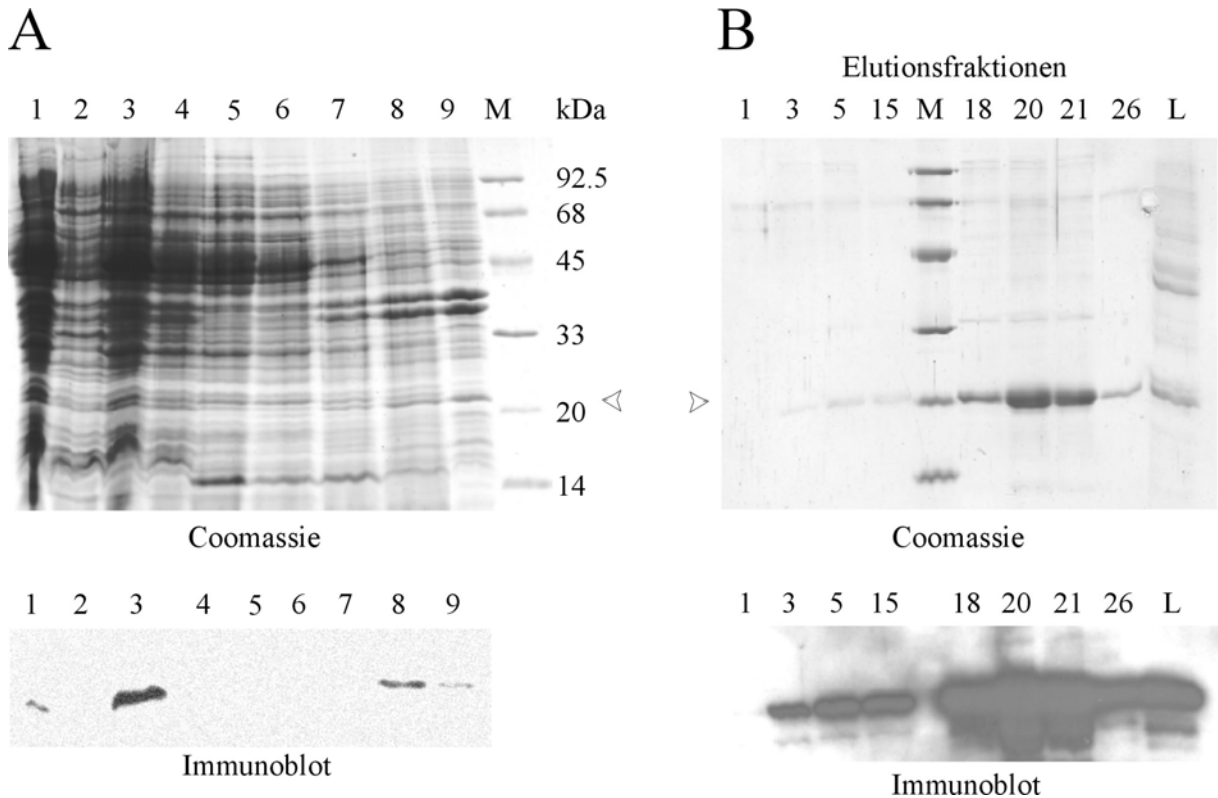


Abb. 4: Expression und Reinigung des rekombinanten Proteins his-DdLmpC

(A) Induktion der Expression und Isolierung von his-DdLmpC. Die zu untersuchenden Fraktionen wurden in SDS-Probenpuffer aufgekocht und mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Die Gele wurden dann mit Coomassie-Blau (oben) angefärbt oder in Immunoblots (unten; monoklonaler "His-tag"-Antikörper; Verdünnung 1:20.000) analysiert. Spur 1: ÜN-Vorkultur (stationär, ohne IPTG), Spur 2: Hauptkultur vor der IPTG-Zugabe (OD₆₀₀ = 0,5), Spur 3: 5 h Induktion mit IPTG, Spur 4: ÜN-Induktion mit IPTG, Spur 5-8: Überstände der einzelnen Waschschrte mit nativem bzw. denaturierendem Lysatpuffer mit 2, 4 und 7 M Harnstoff (in Reihenfolge). Spur 9: Zellsediment nach Waschen mit 7 M Harnstoff.

(B) Reinigung des rekombinanten Proteins his-DdLmpC über eine Ni²⁺-NTA-Affinitätssäule. Der his-DdLmpC enthaltende Überstand (7 M Harnstoff, pH 8,0) wurde auf eine Ni²⁺-NTA-Säule geladen (L) und bei pH 8,0 und 6,4 gewaschen. Die Elution erfolgte bei pH 5,9 (Fraktion 1-15) und pH 4,5 (Fraktion 16-30). Der Immunoblot mit einem monoklonalen Antikörper gegen das "His-tag" (Verdünnung 1:20.000) zeigte in den Elutionsfraktionen ein deutliches Signal bei 20 kDa, dem eine Bande im Coomassie-Blau gefärbten Gel zugeordnet werden konnte (Pfeilspitze).

```
DdLmpA      MVKRGCCRKMVNHKGCLVSGIFLAVIGAVLFILAFALLPHLINQTTQNAVIQAVIVDST
DdLmpB      -----MKHIGRIVSFPIGLVLIAVGIIIFVVVNRTIKDEFKKAAVVIPDNGAEE
DdLmpC      -----MVANTKGLLIAGLLLSVIGAALFVVISLALLPSVLNVATNNAIVDAIVDSF
```

DdLmpA	SSQRYNDWAGQQS-IENYYQQYFYAWNLTNPNEFLNGSIPIFETVGPFFNYKYEFNFSNVT
DdLmpB	IVDPWVRFIGNEGDPNNVRYTTFMAYNLNPIETMQGHLPKYQEVGPYSYNYIYERINAN
DdLmpC	KSQRYNDWAGQKS-VDNYFKQYYLWNLNTPNEVLNGKNCNFEKIGPFNYKYEWNNKSVS
DdLmpA	FQDGGNLATYTTQSKSFIYQSDMSPNDPNEIMITNINPAYLGLMFQLAPNAELLDNMPAEN
DdLmpB	LYEDEKLSFKLWKRYFP IVADGYRDP TKDTIYHFNLVYGA AVKQAG-----SEV
DdLmpC	FSDDGNLINYIQSKSYKWIIEGEDSLNPFVSTTNFNPAYLGLLSTLSKNSITLG-MTAED
DdLmpA	LLIALSGCGQMRLFLEYLSSDNFTNIVYFTQNPPLYQEQYLNILKSLNGDEQ-----YFY
DdLmpB	ALSVALTAAAMGKIITGLTDP SKV KAGFAAAPT V TAGAF SNLL TAAGND PAT---ACGL
DdLmpC	LLYTLASAPQTKQFLEYLSSDNFTMIAYFYNGPKYFNQQYQLLLSTINNNLTTTPTIYFL
DdLmpA	QQWANATSIPQKGN--WYGMLVSSVNNNESSNISILSAKLLFNSSNENSILNQEIGST
DdLmpB	WQTSTSSSTPLVPPS-----VPIIAGS--PSDISQAQCQALFDPNKFSLTDPTNVGV
DdLmpC	EQWSNSTIIPITNGNSSLWDNMLISYGLDS--PSGISLQSALEILNPMNQYSLLNSTNGIS
DdLmpA	LWINALLG--DKTSITVLTSELQTLVDQIDMILNWWLNDFSKVYTESYVNEICDIPDISM
DdLmpB	YLLNPAGS-----KAALLASPFGLTQVADLIMKYQLALTSTFVPTTLVSRFAECSDPKT
DdLmpC	YWINAVFNGPNSNSYQILEQELGINQAQLTLVMIWWLKGFNQYTMSQLLKQCEIESIEL
DdLmpA	LGVCQFVTGNALNGR--SISNYTFLTQPFQDQPIEIPLLYQSIGIDVKLSVSVQQA YKSL
DdLmpB	CTNNPLYFGLLQWAKNPSLLGQSVFAIPNSGVPAAPE-----FGIYTSSELSLTKAGSLF
DdLmpC	LGVCQFITITPLGYK--SISQFNITNLPWLE-PIEIP-----IAMGTNLTISTNEAQNLS
DdLmpA	FNESDS-----NSILNLNGLVNFL TASKS- FDTFKQYNVTLF DAIKI IGYATAELY--EQ
DdLmpB	LNTSTINLITPTSIGTILVYGQKLKADPTSIPPALYAPFSSGEFDAIVKYTGyimAAAFVD
DdLmpC	FNDSID-----DSLTLIHGLGLFLEQMS-TNSNFTKWNLTNNDAMTMIGYFLSYIPNTTG
DdLmpA	YNKPTILGLYEKYGGLIV TRSMDD WLWNCQD GILDYLGVD QPCALQON-----N
DdLmpB	GDIKKNQIFKDYQGGPIVKHTVHDFLFNSTDPLLKLMYPTPSAWVSSPLDNIQDVKVAN
DdLmpC	YSIKSVQSFYNTSG-LIV TRTANEWLWDCQDDLLDYL GID QCCSFQON-----N
DdLmpA	TVNKPSTIFTGQQDLSMTNQIF EFQ ETFLTCWNGSVQ VEG- FTESGQFPPLQSD-PPQT
DdLmpB	ATLHTDEIYTGVDIDLVSPPITFEFE-EELNYNKKIKVSGSFAEQLPYSYLSKD-PEAP
DdLmpC	TIFKPSTVYTGKDLSLTNQYQQFQEQ STLT IWNGTVNVTG-FVENGQMAPLVQDNLPQS
DdLmpA	MTLFEENVIRPVQLELSGDSQVQ GIDTKRYLVNNS FP IST TFKTTIPGFANLTDIQN-L
DdLmpB	VNVFTDEFARSLFRKEVGGNFGGIPYYRYRINESNWEINPDYFQTIPLYLLNLTSLKSGA
DdLmpC	LTFEENILRPLSLVHSSSSVMG VST QRYL PN QSF ID PVFNNSINGFANLTGLFNGV
DdLmpA	PIYVSLWDMYEVPPQYSSNN-LQGLN QTY QSAQVPLDLEP ITGNALY YNLKLQINLA PE
DdLmpB	PAYLSRPRKLGIDVGYYYKAGITDLINDEDLDFADYEPKAIHGRYSLQVNTYIQG
DdLmpC	PIYVSLWDMYGVPIEYSSLY-INGLN QTYENAEIPLDLEPITGNTLY YNLKLQINLQ IPS
DdLmpA	FSN--WFSSN----STFKNMKS N--- VFYPILKIGQTATPSQSNIDLLNSQFKLIKILGF
DdLmpB	SDG-----TNSTLYNKYSAFRSD---VVHPMFVGVNIIAATQEQIDILTKAYKVDSFRYA
DdLmpC	NANSLWFSSLGNWTNIFSP-TNSNSFGIFYPSLKIGQTATASTNDINLLKQQFKQIQTVKI
DdLmpA	VPVIVVSIIGGILLIAGISMFAFGFKLRQ QK QOQGYQAI INNE
DdLmpB	<u>ITVILIVVGGFLSLISGGLFVLDKIIDL-----</u>
DdLmpC	<u>APVVVVSIFGGILLIAGLVMAINGFRKTFYNNNQYNGYNIIN-</u>

Abb. 5: Aminosäuresequenzen von DdLmpA, DdLmpB und DdLmpC

Vergleich der Aminosäuresequenzen aller drei Membranproteine der CD36/LIMPII-Superfamilie aus *D. discoideum*. Die N-terminalen und die C-terminalen Membrandomänen sind unterstrichen. Die für die Antiserumproduktion benutzten Peptidabschnitte, die mit einem "His-tag" fusioniert wurden, sind fett und kursiv wiedergegeben.

3.1.2 Spezifität der Antiseren 7654, 7655, 7656 und 7657

Für die Gewinnung polyklonaler Antiseren von his-DdLmpB (7656 und 7657) und his-DdLmpC (7654 und 7655) wurde die Firma Eurogentec beauftragt. Jeweils 2 Kaninchen wurden mit identischen Antigenpräparationen und Immunisierungsprotokollen behandelt. Aliquots der Antiseren wurden ab der zweiten Injektion auf ihre Spezifität getestet. In Abb. 5 sind die vollständigen Aminosäuresequenzen aller drei DdLmp sowie die Peptidabschnitte, die für die jeweilige Antigenproduktion benutzt wurden, dargestellt.

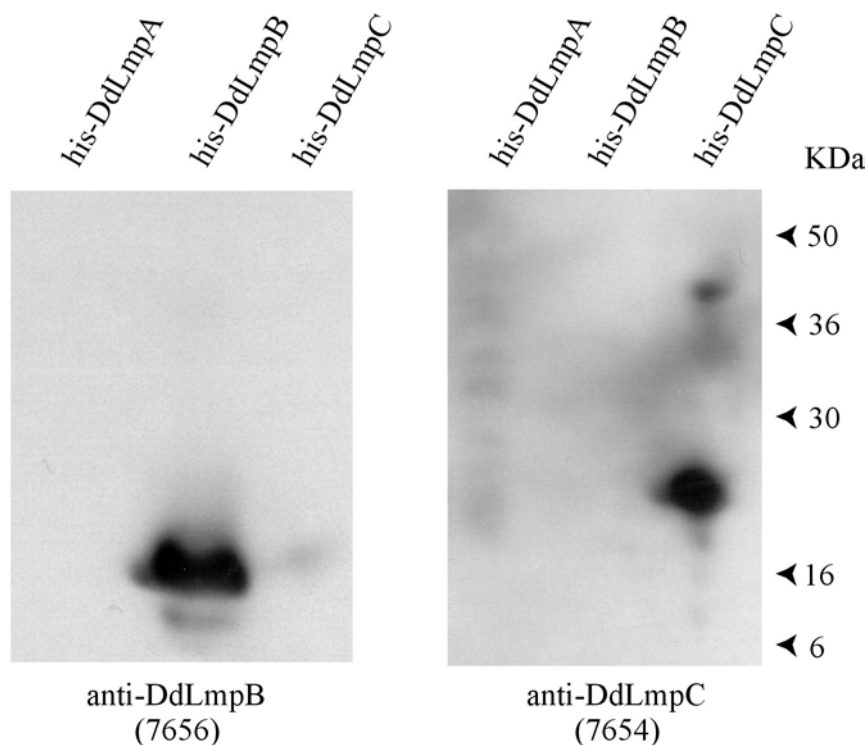


Abb. 6: Spezifität der polyklonalen Antiseren 7656 und 7654 (Verdünnung 1:50.000)

Nach der zweiten Immunisierung wurde das Kaninchenserum auf Kreuzreaktionen im Immunoblot getestet. Dazu wurden je 0,5 µg der rekombinanten Proteine his-DdLmpA, his-DdLmpB und his-DdLmpC auf ein SDS-Gel geladen, aufgetrennt, auf Nitrozellulose transferiert und mit den zu testenden Antiseren analysiert. Eine parallel durchgeführte Coomassie-Blau-Färbung zeigte, daß in allen Spuren vergleichbare Proteinmengen geladen waren (nicht dargestellt).

Für his-DdLmpB und his-DdLmpC konnten mit den Antiseren Signale bei 16 kDa bzw. bei 20 kDa detektiert werden (Abb. 6), die mit der erwarteten Größe der rekombinanten Proteine und den Signalen, die in parallel durchgeführten Immunoblots mit dem anti-"His-tag" Antikörper erzielt wurden, übereinstimmten. Ähnlich wie bei DdLmpA wurde auch für DdLmpC ein C-terminaler Bereich als Antigen ausgewählt. Trotz einer Homologie von ca. 60% waren die Seren nicht kreuzreaktiv (Abb. 6). Das rekombinante Protein aus DdLmpB war weder zu

den Konstrukten aus DdLmpA noch aus DdLmpC homolog, eine Kreuzreaktion der Antikörper war dementsprechend auch nicht zu erwarten.

Zur Untersuchung der Spezifität der Antiseren in *D. discoideum*-Fraktionen wurden AX2-Zellen nach der Zellöffnung durch 100.000 g Zentrifugationen in löslichen Überstand und Membransediment aufgetrennt.

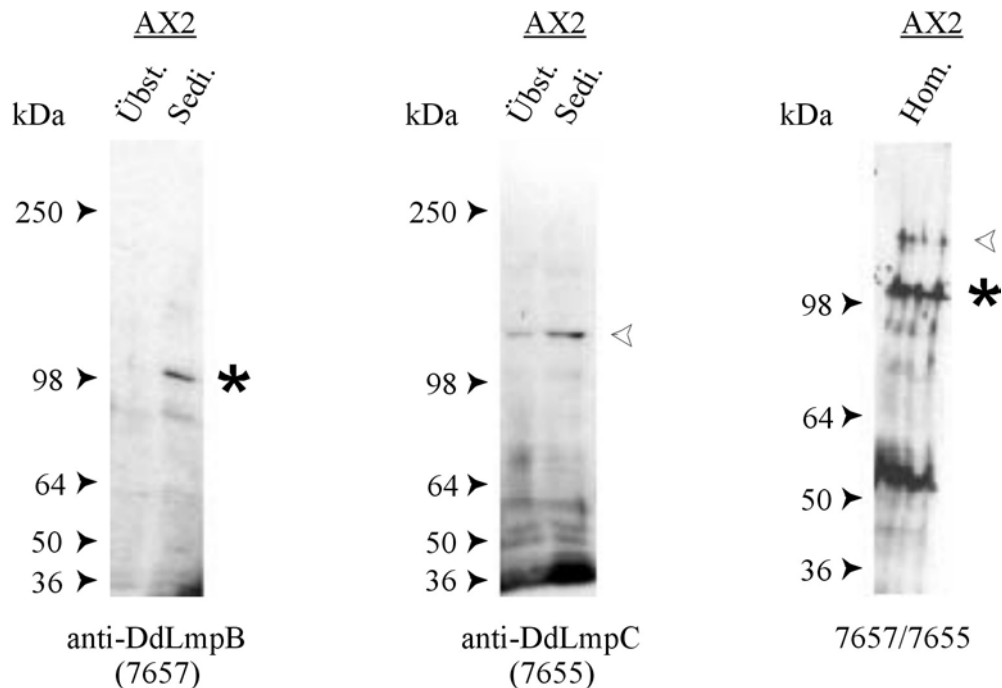


Abb. 7: Spezifität der polyklonalen Antiseren 7657 und 7655 (Verdünnung 1:50.000) in *D. discoideum*-Homogenaten

DdLmpB und DdLmpC liegen bei Zellfraktionierungen im 100.000 g Sediment vor. AX2-Zellen wurden mit Nuclepore-Filtern geöffnet und die Homogenate für 1 h bei 100.000 g zentrifugiert. Überstände ("Übst."), Sedimente ("Sedi.") und Homogenate ("Hom.") wurden durch SDS-PAGE und Immunoblots mit den anti-DdLmpB Antiseren 7656 und 7657 bzw. mit den anti-DdLmpC Antiseren 7654 und 7655 analysiert. Eine parallel durchgeführte Coomassie-Blau-Färbung zeigte, daß in allen Spuren vergleichbare Proteinmengen geladen waren (nicht dargestellt). Der Stern verweist auf die DdLmpB-, die Pfeilspitze auf DdLmpC-Bande. Aufgrund der sehr ähnlichen Spezifität der Antiseren wird hier jeweils nur ein Antiserum stellvertretend dargestellt.

Im 100.000 g Sediment der AX2-Zellen waren deutliche Banden bei ungefähr 100 kDa (anti-DdLmpB) und 110 kDa (anti-DdLmpC) zu erkennen (Abb. 7). Diese Banden konnten in der löslichen Fraktion nicht bzw. nur schwach detektiert werden. Der Unterschied zwischen dem Laufverhalten beider Proteine im Gel und dem berechneten Molekulargewicht (90 kDa für DdLmpB und 94 kDa für DdLmpC) kann durch die starke N-Glykosylierung erklärt werden. Eine gleichzeitige Inkubation des Zellhomogenates mit einem DdLmpB- und einem DdLmpC-Antiserum verdeutlichte sowohl den Größenunterschied von DdLmpB und DdLmpC und zeigte zugleich, daß zwischen beiden Proteinen keine Kreuzreaktivität vorliegt.

Alle Proteine aus der DdLmp-Familie werden sehr leicht abgebaut, was zu unterschiedlich starkem Auftreten von kleineren Banden führen kann (siehe Abb. 7, rechts).

3.1.3 Expression von DdLmpB und DdLmpC in RB2-Zellen

In RB2-Zellen war das Gen *DdLmpA* in einem REMI-Ansatz unterbrochen worden (Karakesioglou et al., 1999). Um die Frage zu klären, ob diese Zellen den Verlust von DdLmpA durch eine verstärkte Expression von DdLmpB bzw. DdLmpC ausgleichen, wurden AX2- und RB2-Zellen nach der Zellöffnung durch 100.000 g Zentrifugationen in löslichen Überstand und Membransediment aufgeteilt, diese Fraktionen auf ein SDS-Gel aufgetragen und mittels Immunoblot analysiert (Abb. 8).

Die Intensität der Banden der Pelletfraktion von AX2 und RB2 lassen keine Veränderungen der DdLmpB und DdLmpC Expression vermuten.

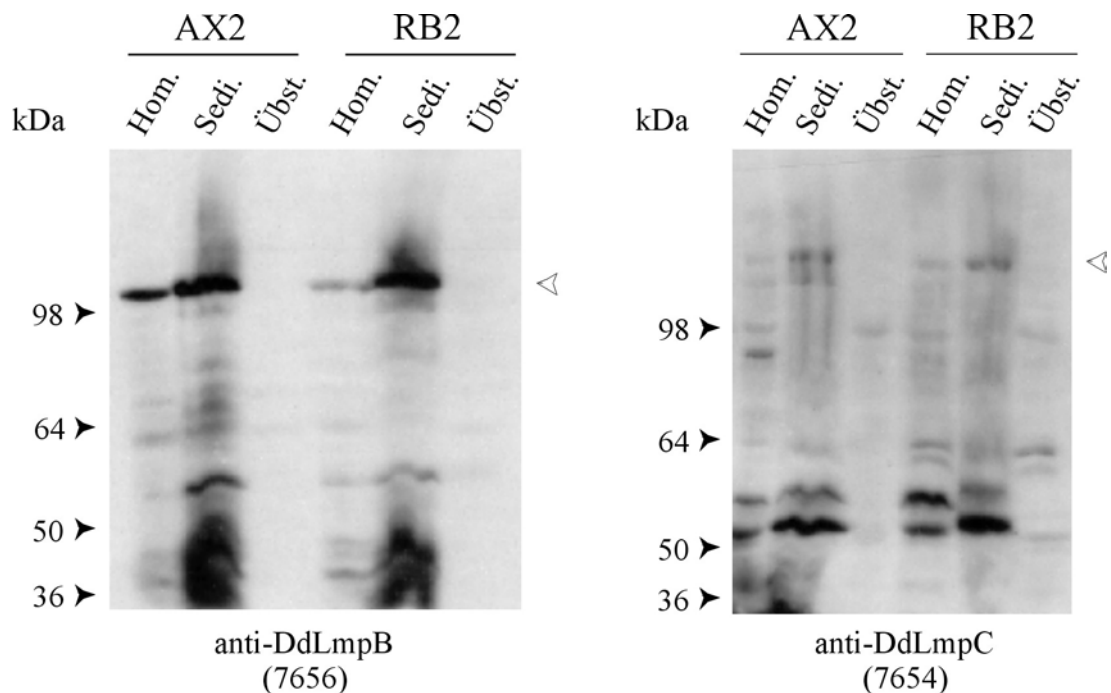


Abb. 8: Vergleich der Expression von DdLmpB und DdLmpC in AX2 und RB2-Zellen

Zellen der Stämme AX2 und RB2 wurden mit Nuclepore-Filtern geöffnet und die Homogenate für 1 h bei 100.000 g zentrifugiert. Homogenate ("Hom."), Überstände ("Übst.") und Sedimente ("Sedi.") wurden durch SDS-PAGE und Immunoblots mit den Antiseren anti-DdLmpB 7656 und anti-DdLmpC 7654 (beide 1:50.000 verdünnt) analysiert. Eine parallel durchgeführte Coomassie-Blau-Färbung zeigte, daß in allen Spuren vergleichbare Proteinmengen geladen waren (nicht dargestellt). Die Pfeilspitze weist auf die DdLmpB- bzw. DdLmpC-Bande hin.

3.1.4 Nachweis der Topologie durch analytische Protease-Behandlung

Die potentiellen Membrandurchgänge von DdLmpB und DdLmpC wurden durch Computeranalysen ermittelt. Nach der "positive inside"-Regel (Von Heijne, 1986) liegen N- und C-

Termini, die besonders viele basische Aminosäurereste tragen, im Zytosol, während sich die zentrale Domäne in den Lumen der Vesikel befindet. Diese Regel trifft sowohl auf DdLmpA als auch auf DdLmpB zu. DdLmpC hingegen weist kein besonders häufiges Vorkommen an basischen Aminosäurereste sowohl am N- wie auch am C-Terminus auf (Abb. 5).

Um deshalb die Membranorientierung von DdLmpB und DdLmpC experimentell zu bestätigen, wurde eine analytische Protease-Behandlung mit den Membranfraktionen von AX2-Zellen durchgeführt (Abb. 9). Trotz der Protease-Behandlung mit Trypsin bzw. α -Chymotrypsin konnte vollständiges DdLmpB und DdLmpC nachgewiesen werden (Abb. 8). Erst nach der Zugabe des Detergens TritonX-100 wurden beide Membranproteine in Gegenwart von Trypsin bzw. α -Chymotrypsin signifikant abgebaut. Dieses Resultat zeigt eindeutig, daß die zentralen Domänen von DdLmpB und DdLmpC im vesikulären Lumen liegen und erst nach Auflösen der Vesikelmembran durch die Proteasen abgebaut werden können.

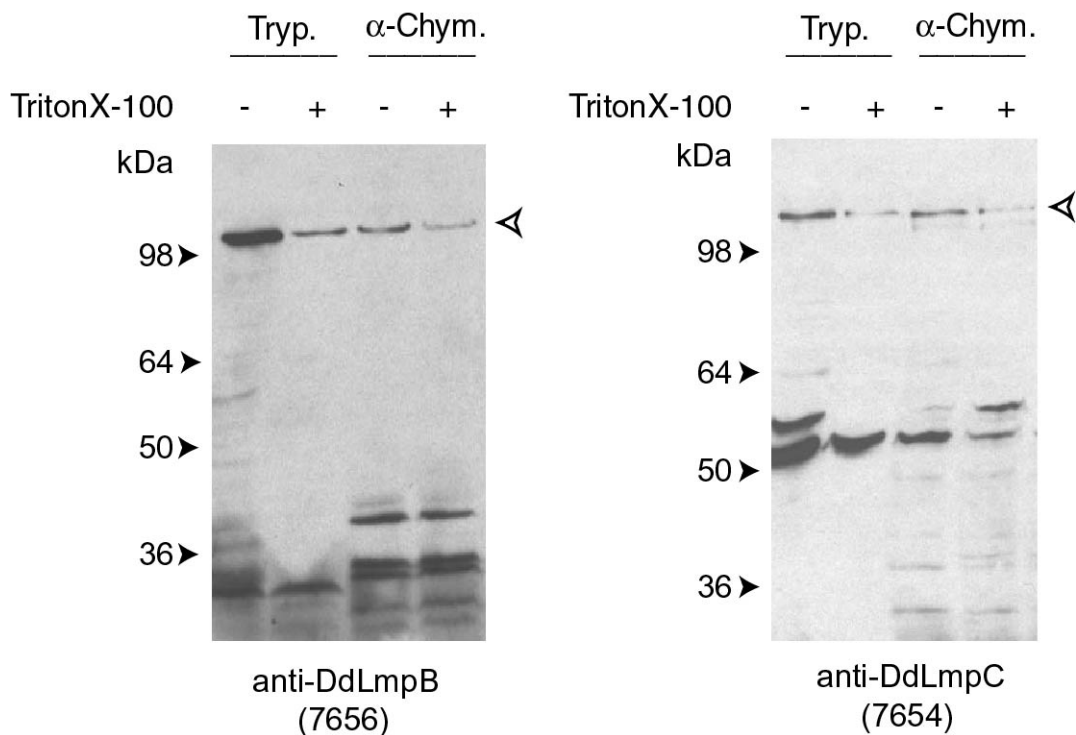


Abb. 9: Analytische Protease-Behandlung

AX2-Membransedimente wurden mit 200 μ g/ml Trypsin bzw. 50 μ g/ml α -Chymotrypsin in An- oder Abwesenheit von 0,1% TritonX-100 behandelt. Nach entsprechender Inkubationszeit auf Eis bzw. bei 37°C (siehe 2.4.10) wurden die Proben mit SDS-PAGE und Immunoblot (Verdünnung 1:50.000) analysiert. Eine parallel durchgeführte Coomassie-Blau-Färbung zeigte, daß in allen Spuren vergleichbare Proteinmengen geladen waren (nicht dargestellt). Die Pfeilspitze verweist auf die DdLmpB- bzw. DdLmpC-Bande.

3.1.5 Intrazelluläre Lokalisation von DdLmpB und DdLmpC in *D. discoideum*

3.1.5.1 Zellfraktionierung

Um die DdLmpB- und DdLmpC-positiven Vesikel genauer zu analysieren, wurde eine subzelluläre Fraktionierung über einen diskontinuierlichen Saccharose-Gradienten durchgeführt (Abb. 10). Die Leitenzyme saure Phosphatase und alkalische Phosphatase wurden zur Unterscheidung von Lysosomen und Plasmamembran herangezogen. Die Aktivität der sauren Phosphatase aus reifen Lysosomen konnte überwiegend in den Fraktionen geringerer Dichte (vor allem Fraktion 3 und 4) nachgewiesen werden. Dagegen wurde vor allem in den Fraktionen mittlerer bis hoher Dichte die Aktivität der alkalischen Phosphatase gemessen. Hier finden sich die Membransedimente des kontraktiven Vakuolensystems und der Plasmamembran (Weiner et al., 1993).

Die Fraktionen des Saccharose-Gradienten wurden durch Immunoblots analysiert, und die Verteilung von Leitproteinen mittels Densitometrie quantifiziert. Die α -L-Fucosidase ist ein Marker für lysosomale Vesikel und konnte ähnlich der Aktivität der sauren Phosphatase in den oberen Fraktionen nachgewiesen werden. Das Membran-assoziierte Protein Comitin (Golgi-Marker) und das Zelladhäsionsmolekül CsA ("Contact site A", Marker für die Plasmamembran) zeigten gute Übereinstimmung mit der Verteilung der alkalischen Phosphatase-Aktivität in Bereichen mittlerer und hoher Dichte. In den Fraktionen der höchsten Dichte finden sich Zellkerne und Membranen des ER (Weiner et al., 1993). Dr. K.-P. Janssen konnte zeigen, daß DdLmpA weder mit dem lysosomalen Marker α -L-Fucosidase noch mit den Membranmarkern höherer Dichte kolokalisiert, sondern in dazwischen liegenden Fraktionen nachweisbar ist. Diese Verteilung wird in der Literatur den frühen Endosomen und Postlysosomen zugeordnet (Buczynski et al., 1997). Auch für DdLmpB und DdLmpC konnte eine Ankonzentrierung in diesen Fraktionen gezeigt werden. Während die Verteilung von DdLmpC nahezu der Verteilung von DdLmpA entspricht, ist für DdLmpB eine leichte Verschiebung zu den Fraktionen höherer Dichte festzustellen. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, daß DdLmpB an anderen endolysosomalen Vesikeln lokalisiert ist, als dies für DdLmpA und DdLmpC der Fall ist. Der Verteilung von DdLmpB im Gradienten entspricht auch die Verteilung des Proteins Golvesin, einem Marker für das mittlere Endosom und dem Golgi (Schneider et al., 2000).

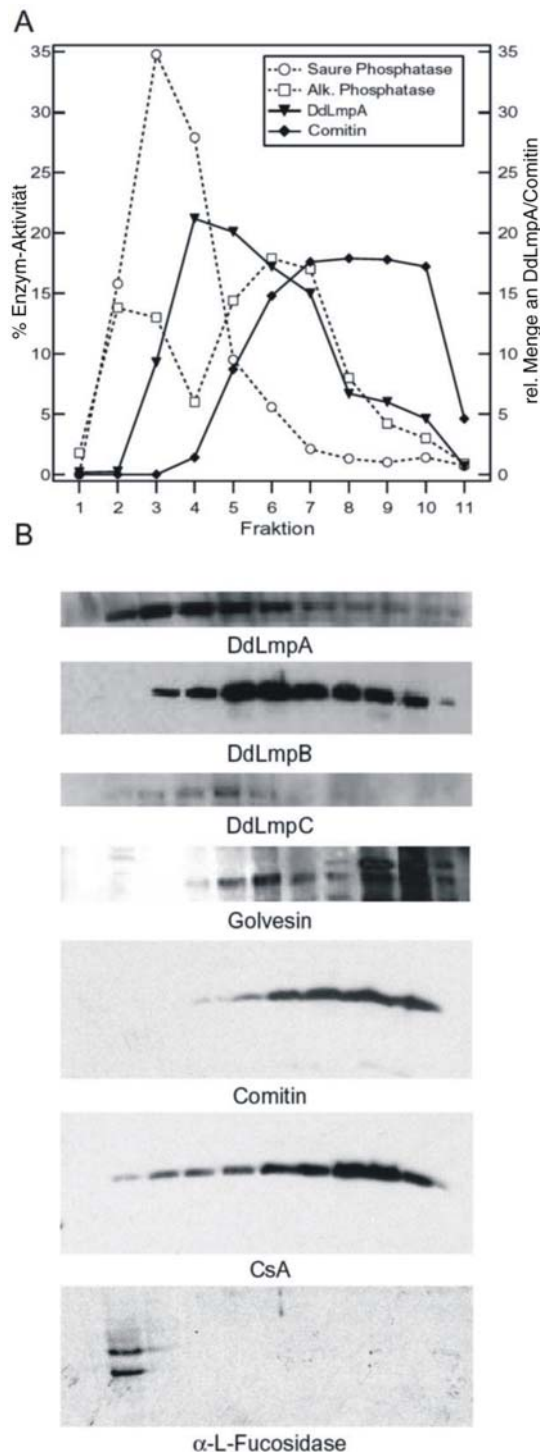


Abb. 10: Membranfractionierung im Zuckergradienten

AX2-Zellen wurden mit Hilfe von Nuclepore-Filtern geöffnet und die Membranfraktion in einem Saccharose-Gradienten aufgetrennt. Nach der Zentrifugation wurden 11 Fraktionen von 0 M (Fraktion 1) bis 2,49 M (Fraktion 11) Saccharose entnommen. Die Verteilung ausgewählter Proteine wurde in Immunoblots detektiert und densitometrisch ausgewertet. Die Verteilung von Plasmamembran und Lysosomen wurde durch Aktivitätsmessung der Marker-Enzyme saure Phosphatase (Lysosomen) und alkalische Phosphatase (Plasmamembran) bestimmt.

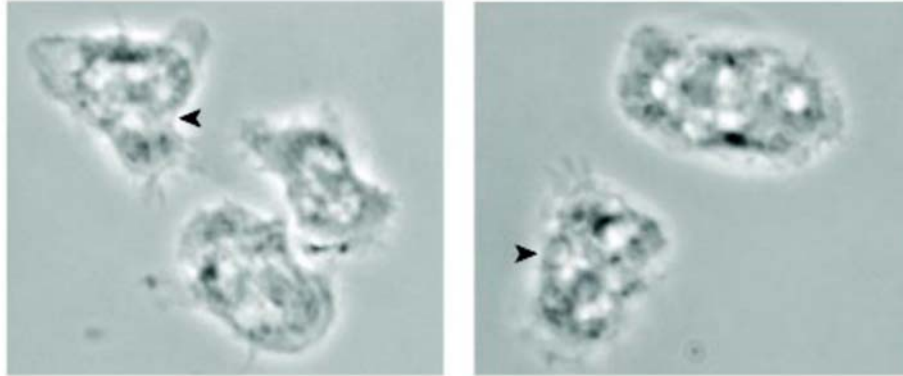
(A) Auf der x-Achse sind die Saccharose-Fraktionen und auf der y-Achse sind die relative Menge an Protein bzw. Phosphatase-Aktivität angegeben (relativer Anteil einer Fraktion bezogen auf die Gesamtaktivität aller Fraktionen).

(B) Verteilung von DdLmpA, DdLmpB, DdLmpC und der Markerproteine Golvesin (Golgi/mittleres Endosom), Comitin (Golgi), Contact Site A (CsA, Plasmamembran) und α -L-Fucosidase (Lysosom)

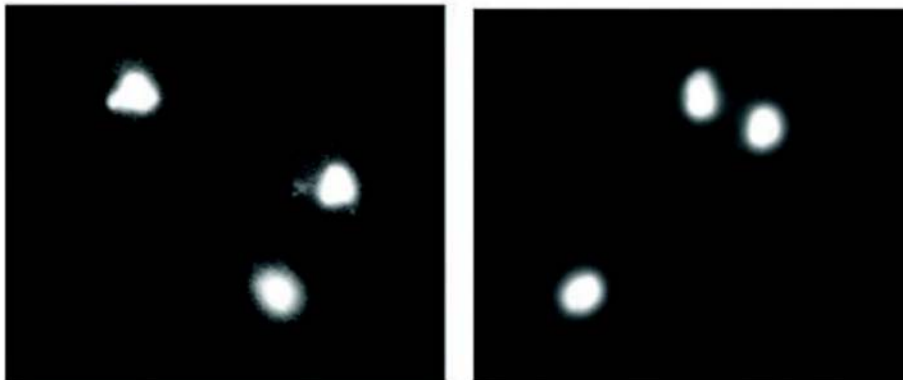
im Immunoblot. Die Spuren entsprechen den Fraktionen 1-11 (von links nach rechts). Die Verteilung von α -L-Fucosidase und Contact Site A wurde anhand von AX2 T6-Zellhomogenaten bestimmt. (Aus Janssen et al., 2001)

3.1.5.2 Immunfluoreszenz-Untersuchungen

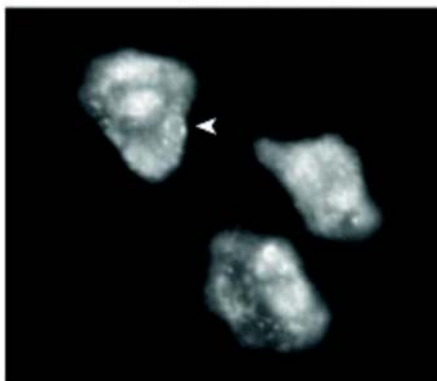
Phase



DAPI



anti-DdLmpB



anti-DdLmpC

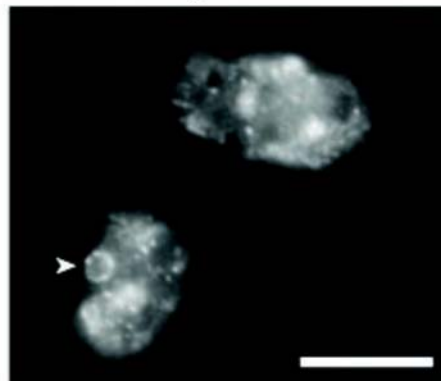


Abb. 11: Subzelluläre Verteilung von DdLmpB und DdLmpC in der Immunfluoreszenz

AX2-Zellen (t0) wurden mit kaltem Methanol fixiert und mit den Antiseren 7656 (anti-DdLmpB; Verdünnung 1:500) bzw. 7654 (anti-DdLmpC; Verdünnung 1:200) inkubiert. Bei der Verwendung von affinitätsgereinigten Antikörpern wurden vergleichbare Resultate erzielt. Die Pfeilspitzen deuten auf große, ringartig fluoreszierende Strukturen, die an Makropinosomen erinnern und in der Phasekontrastaufnahme als opake Vesikel erkennbar sind. Die Kernfärbung der Zellen erfolgte mit DAPI. Der Balken entspricht 10 μ m.

Bisher konnten alle Mitglieder der LIMPII-Subgruppe, einschließlich DdLmpA, an endolysosomalen Vesikeln lokalisiert werden (Karakesisoglou et al., 1999). Die polyklonalen DdLmpB- und DdLmpC-Antiseren markierten in Immunfluoreszenz-Experimenten an AX2-Zellen hauptsächlich punktförmige, vesikuläre Strukturen, die in der gesamten Zelle verteilt und von unterschiedlicher Größe (bis zu 0,5 μm) waren (Abb. 11/12). Daneben wurden größere Strukturen (bis zu einem Durchmesser von 2 μm) in Form von Ringen markiert (Abb. 11). Diese ringförmigen Strukturen zeigten Übereinstimmung mit opaken Vesikeln im Phasenkontrastbild. Eine spezifische Markierung der Plasmamembran wurde nicht beobachtet, kann aber nicht ausgeschlossen werden. Zur Klärung der Frage, ob es sich bei den angefärbten Strukturen um endolysosomale Vesikel handelt, wurden AX2-Zellen mit TRITC-Dextran inkubiert. Für die so markierten Vesikel in Zellen konnten Kollokationen mit DdLmpB und DdLmpC beobachtet werden (Abb. 12). Dieser Befund ist eine weitere Bestätigung dafür, daß es sich bei DdLmpB und DdLmpC um endolysosomale Proteine handelt.

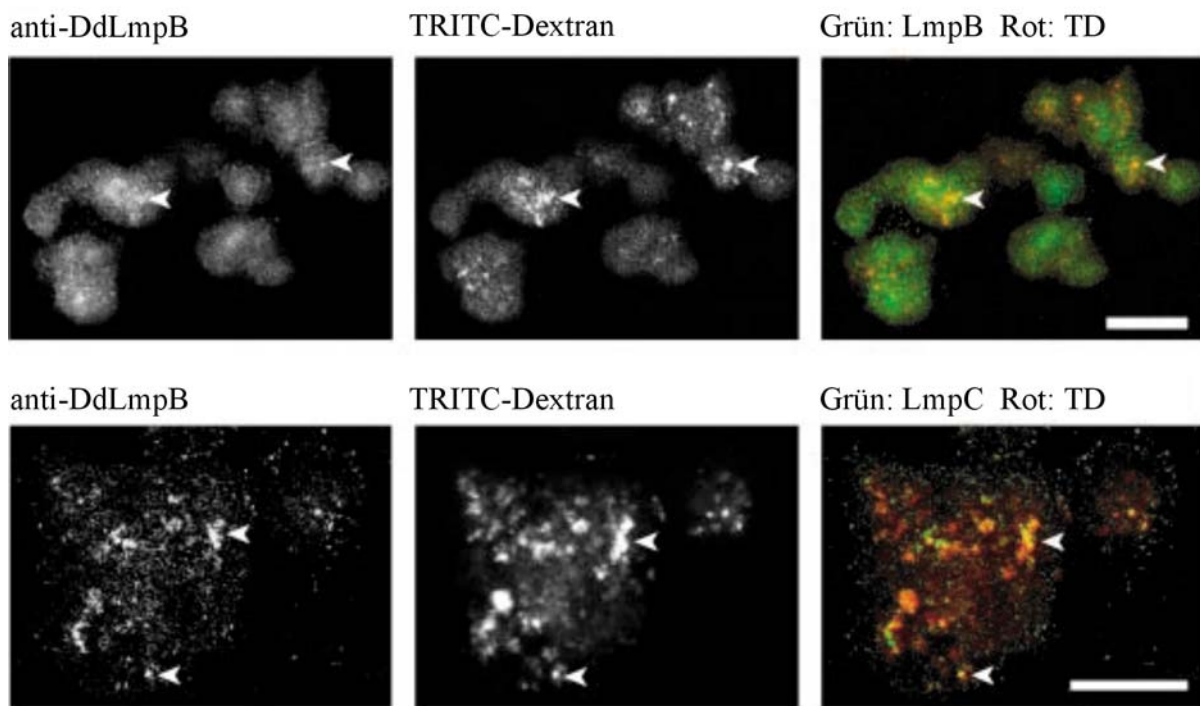


Abb. 12: Immunfluoreszenz-Untersuchungen mit TRITC-Dextran

DdLmpB und DdLmpC kolokalisieren mit dem Endosomen-Marker TRITC-Dextran. In der Wachstumsphase befindliche AX2-Zellen wurden für 5 min im Medium mit TRITC-Dextran markiert, mit 1% Formaldehyd in kaltem Methanol fixiert und mit den Antiseren 7656 (anti-DdLmpB; 1:500) oder 7654 (anti-DdLmpC; 1:200) inkubiert. Die Zellen wurden mit der konfokalen Mikroskopie analysiert. Die Pfeilspitzen deuten auf Strukturen, die sowohl für TRITC-Dextran als auch für DdLmp positiv sind. Der Balken entspricht 10 μm .

3.1.6 Wachstumsabhängige Expression von DdLmpA, DdLmpB und DdLmpC

Obwohl während der gesamten Entwicklung von *D. discoideum* ein konstanter Level an mRNA für DdLmpA vorhanden ist, konnte mit fortschreitender Entwicklung nur noch sehr wenig DdLmpA nachgewiesen werden. Schon nach 6 h ist eine deutliche Abnahme zu beobachten (siehe 13A und B). DdLmpB ist während der Entwicklung in gut nachweisbaren Mengen vorhanden. Die Reduktion der mRNA Konzentration im ersten Drittel der Entwicklung spiegelt sich nur marginal auf der Proteinebene wieder.

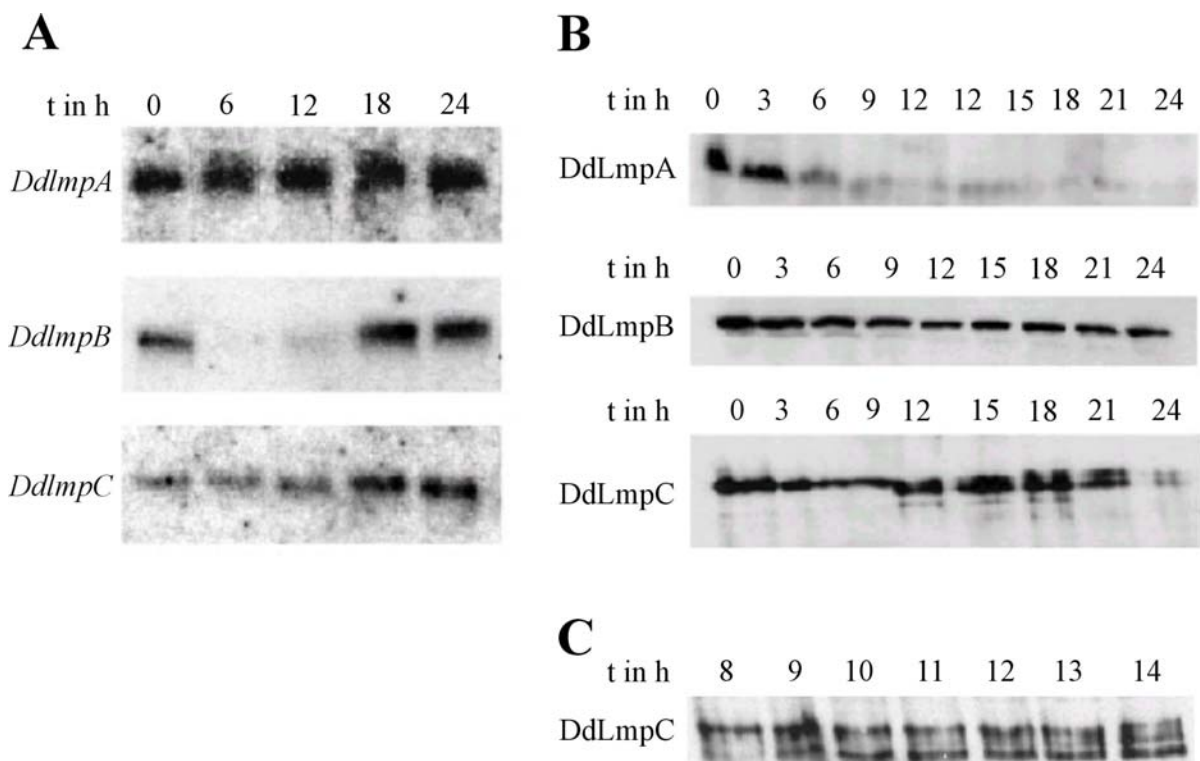


Abb. 13: Entwicklungsregulation von DdLmpA, DdLmpB und DdLmpC

(A) mRNA-Mengen von *DdlmpA*, *DdlmpB* und *DdlmpC* zu verschiedenen Zeitpunkten der Entwicklung. Pro Spur des Agarosegels wurden 20 µg RNA geladen, elektrophoretisch getrennt und auf Nitrozellulose transferiert. Die Hybridisierung erfolgte dann mit spezifischen Sonden. Diese Abbildung wurde von K.-P. Janssen erstellt und dient hier nur als Vergleich für die Immunoblots.

(B)/(C) Western-Blot Analyse von DdLmpA, DdLmpB und DdLmpC. Die Zellen wurden nach den angegebenen Zeiten geerntet, die Proteine durch SDS-PAGE aufgetrennt und durch die Lmp-Antiseren analysiert. In 13C wird im Detail hervorgehoben, daß die LmpC-Isoform in der späteren Entwicklung zusätzliche Banden zeigt.

Auch die für *DdlmpC* auf mRNA-Ebene festgestellte Zunahme während der Entwicklung entspricht nicht der tatsächlichen Menge von Protein. Interessanterweise konnte im Migrationsstadium ("slug"-Bildung) eine zweite, in der Phase der Furchtkörperbildung dann eine dritte Bande detektiert werden (siehe 13C). Beide Banden entsprechen einer Größe um die 100 kDa. Inwieweit diese Banden auf Veränderungen in der posttranslationalen Modifizie-

rung oder auf einen Einfluß von entwicklungsregulierten Proteasen zurückzuführen sind, bleibt noch zu überprüfen.

3.2 Molekularbiologische Charakterisierung von *DdlmpB* und *DdlmpC*

3.2.1 *DdlmpB*- und *DdlmpC*-Konstrukte für die Gendisruption

Zur Herstellung von *DdlmpB*- bzw. *DdlmpC*-minus-Mutanten durch homologe Rekombination wurden verschiedene Ansätze gewählt (siehe 2.3.17). Die *Dictyostelium*-Zellen wurden mit den Konstrukten, die ungespalten, linearisiert oder als Fragment verwendet wurden, transformiert. Dabei wurden für jedes Konstrukt mehrere hundert Klone isoliert und mit Hilfe von PCR und Immunoblot analysiert. Weiterhin wurden die Transformanten auch verschiedenen Klonierungsmethoden ("single cell"-Klonierung; "spreader dilution" und axenische Kultivierung) unterzogen, da keine Aussage darüber getroffen werden konnte, welchen Einfluß die Gendisruption eines der beiden Gene auf Phagozytose und Pinozytose hat. Dennoch konnten keine Mutanten isoliert werden. Allerdings ist es kürzlich bei der Einweisung der neuen Doktorandin Frau Annette Vogel gelungen, eine *DdLmpB*-Mutante herzustellen. Im folgenden werden die ersten, gemeinsam durchgeführten Analysen dieser Mutante zusammengefaßt.

3.2.2 Southern-Blot verschiedener *DdLmpB*-negativer Klone

Unter der Verwendung des von mir hergestellten Konstrukts pUCBsrDBam-*lmpB* (siehe Abb. 14B) konnten mehrere AX2-Klone identifiziert werden, die auf Proteinebene *DdLmpB*-negativ sind. Um diese Klone auf der genomischen Ebene genauer zu charakterisieren, wurde ein Southern-Blot durchgeführt (siehe Abb. 14A/B). Als Sonde wurde ein 600 Bp großes N-terminales *DdlmpB*-Fragment verwendet. Alle drei *DdLmpB*-negativen Klone (A1, B1 und C2) zeigten das gleiche Restriktionsmuster, das sich deutlich von dem des AX2-Wildtyps unterscheidet. Als eine weitere Kontrolle wurde der Blasticidin resistente, jedoch *DdLmpB*-positive Klon B5 verwendet.

In Janssen et al. (2001) konnte gezeigt werden, daß "upstream" vom *DdlmpB* unter anderem Schnittstellen von XbaI, BglII und HincII liegen. Da auch im "gene replacement"-Konstrukt alle drei Schnittstellen vorhanden sind, bot sich eine Verwendung der entsprechenden Restriktionsenzyme an. Ein im Wildtyp 2,5 kB großes XbaI-Fragment wird durch ein erfolgreichen "knock-out" von *DdlmpB* auf ein 2,0 kb großes XbaI-Fragment verkürzt. Dies konnte für alle drei *DdLmpB*-negativen Klone nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu zeigten der Klon

B5, bei dem der Vektor zufällig integriert war, und der Wildtyp AX2 die vorhergesagte 2,5 kB-Bande auf.

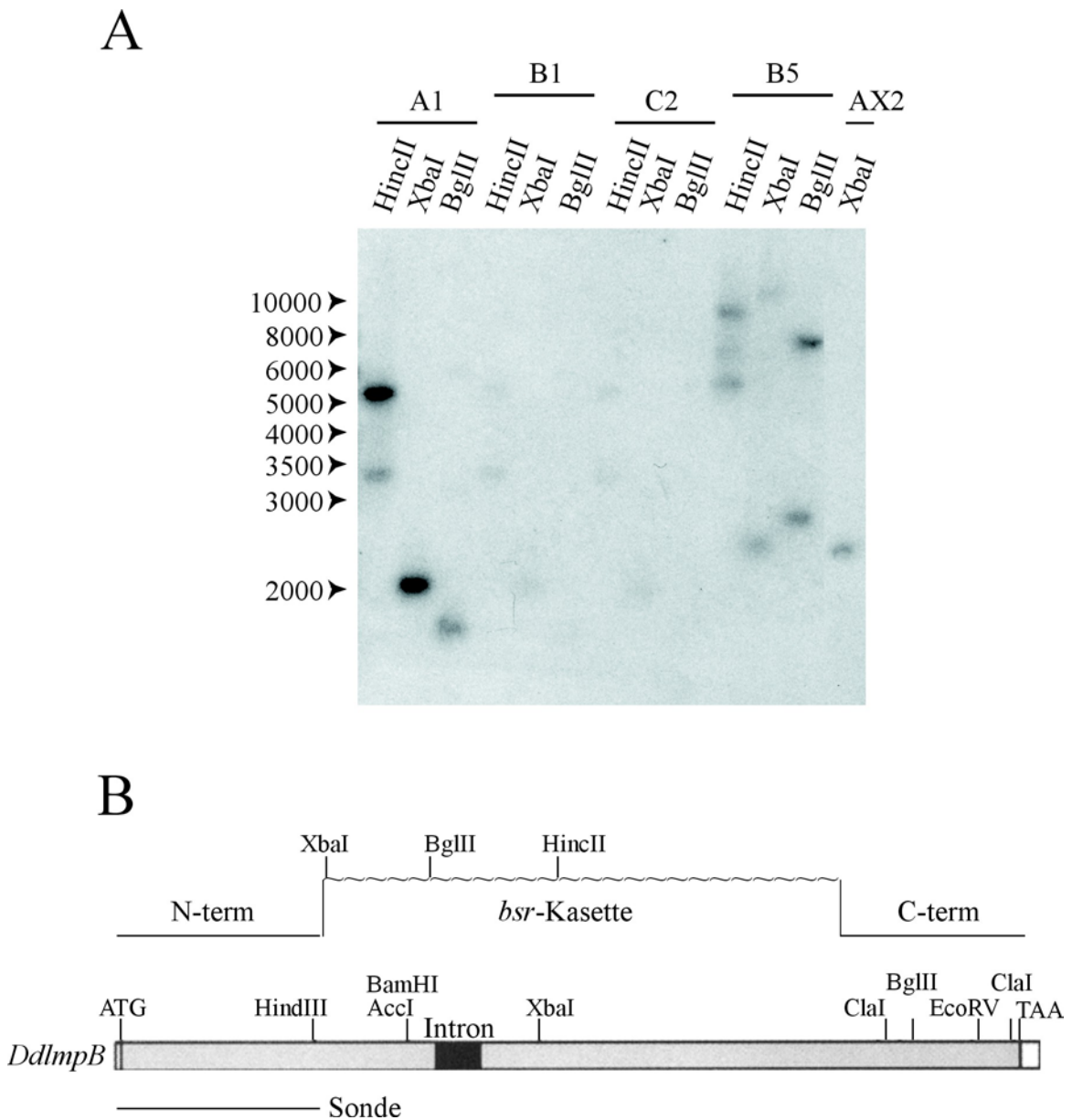


Abb. 14: Southern-Blot mit genomischer DNA aus verschiedenen DdLmpB-negativen Klonen, einem DdLmpB-positiven Klon sowie aus AX2-Wildtypzellen

(A) Pro Spur des Agarosegels wurden 10 μ g entsprechend gespaltener DNA geladen, elektrophoretisch getrennt, auf Nitrozellulose transferiert, mit einer radioaktiv markierten Sonde (N-terminales *lmpB*-Fragment bis kurz nach der HindIII-Schnittstelle) bei 37°C hybridisiert und exponiert.

(B) *DdLmpB* und wichtige Restriktionsschnittstellen. Weiterhin ist der Bereich der verwendeten Sonde und das für die erfolgreiche homologe Rekombination verwendete Konstrukt, einschließlich der XbaI-, HincII- und BglIII-Schnittstellen wiedergegeben.

Auch das vom Wildtyp erwartete 2,6 kB große BglIII-Fragment zeigte bei den "knock-out"-Klonen die erwartete Verkürzung auf 1,4 kB. Das Gleiche gilt für das gegenüber dem Wildtyp

um 1,8 kB kleinere HincII-Fragment. Die hierbei gleichzeitig auftretende ca. 5,2 kB-Bande deutet auf einen unvollständigen Verdau hin. Zusammenfassend läßt sich sagen, daß der Southern-Blot den "knock-out" von *DdlmpB* in den Klonen A1, B1 und C2 bestätigt.

Teil 2

3.3 Biochemische Charakterisierung der Interaktion der *Yersinia* YopO-Kinase mit eukaryontischen Zytoskelettproteinen

3.3.1 Kosedimentation von YopO und YopO K269A mit Aktin

Aktin als eukaryontischer Aktivator der Autophosphorylierung des *Yersinia* Effektorproteins YopO war zuerst von Juris et al. (2000) beschrieben worden. Aktin kann in der Zelle in Form von Aktin-filamenten (F-Aktin) vorliegen, die aus globulären, monomeren Molekülen (G-Aktin) gebildet werden. Da zu Beginn dieser Arbeit unbekannt war, welche Form von Aktin für die Aktivierung der YopO-Kinase verantwortlich ist, sollte zunächst mit Hilfe von Kosedimentationsexperimenten geklärt werden, ob YopO an F-Aktin bindet.

YopO konnte nicht zusammen mit F-Aktin bei 100.000 g sedimentiert werden (Abb. 15A, Spur 11). Dies gibt einen Hinweis darauf, daß zwischen F-Aktin und YopO entweder keine, oder nur eine sehr schwache, kurzzeitige Interaktion stattfindet. Interessant ist, daß im 100.000 g Überstand (Spur 10) YopO in einer unscharfen Bande vorliegt. Da die Unschärfe der Bande erst in Gegenwart von Aktin und 2 mM MgCl₂ (im Polymerisationspuffer enthalten) auftritt, liegt die Vermutung nahe, daß diese Bande die Folge einer Modifizierung (eventuell einer Phosphorylierung) von YopO widerspiegelt. G-Aktin ohne MgCl₂ hat diesen angenommenen modifizierenden Einfluß auf YopO nicht (Spur 8). Offensichtlich ist das gereinigte YopO sehr instabil und enthält mehrere Abbauprodukte. Das Mg²⁺ im Polymerisationspuffer scheint die Kinase vor einer Aggregation zu schützen (Vergleich Spur 5 mit Spur 7). ATP ist als Stabilisator eher unwahrscheinlich. Dafür spricht die Beobachtung, daß das im G-Puffer enthaltene ATP keinen offensichtlichen stabilisierenden Effekt auf YopO ausübt (Vergleich Spur 7 mit Spur 9).

In YopO K269A ist die Kinaseaktivität durch die Punktmutation fast vollständig gehemmt (Juris et al., 2000). Interessanterweise scheint diese "dead kinase"-Mutante die Polymerisation von Aktin zu behindern (Abb. 15B, Spur 10). Im Vergleich zum Wildtyp verlagert sich das Verhältnis G-Aktin : F-Aktin von 10:90 (Wildtyp) zu 40:60 (Mutante) (Abb. 15A und B, jeweils Spur 10 und 11). Dagegen konnte die oben erwähnte unscharfe Bande vom YopO bei YopO K269A unter gleichen Bedingungen nicht beobachtet werden. Dies unterstützt die These, daß es sich bei der Modifizierung um eine Phosphorylierung handelt. In Gegenwart von Aktin und Polymerisationspuffer ist YopO K269A (im Gegensatz zum Wildtyp) zu gleichen Teilen im Überstand und in der Pelletfraktion nachweisbar (Spur 10 und 11).

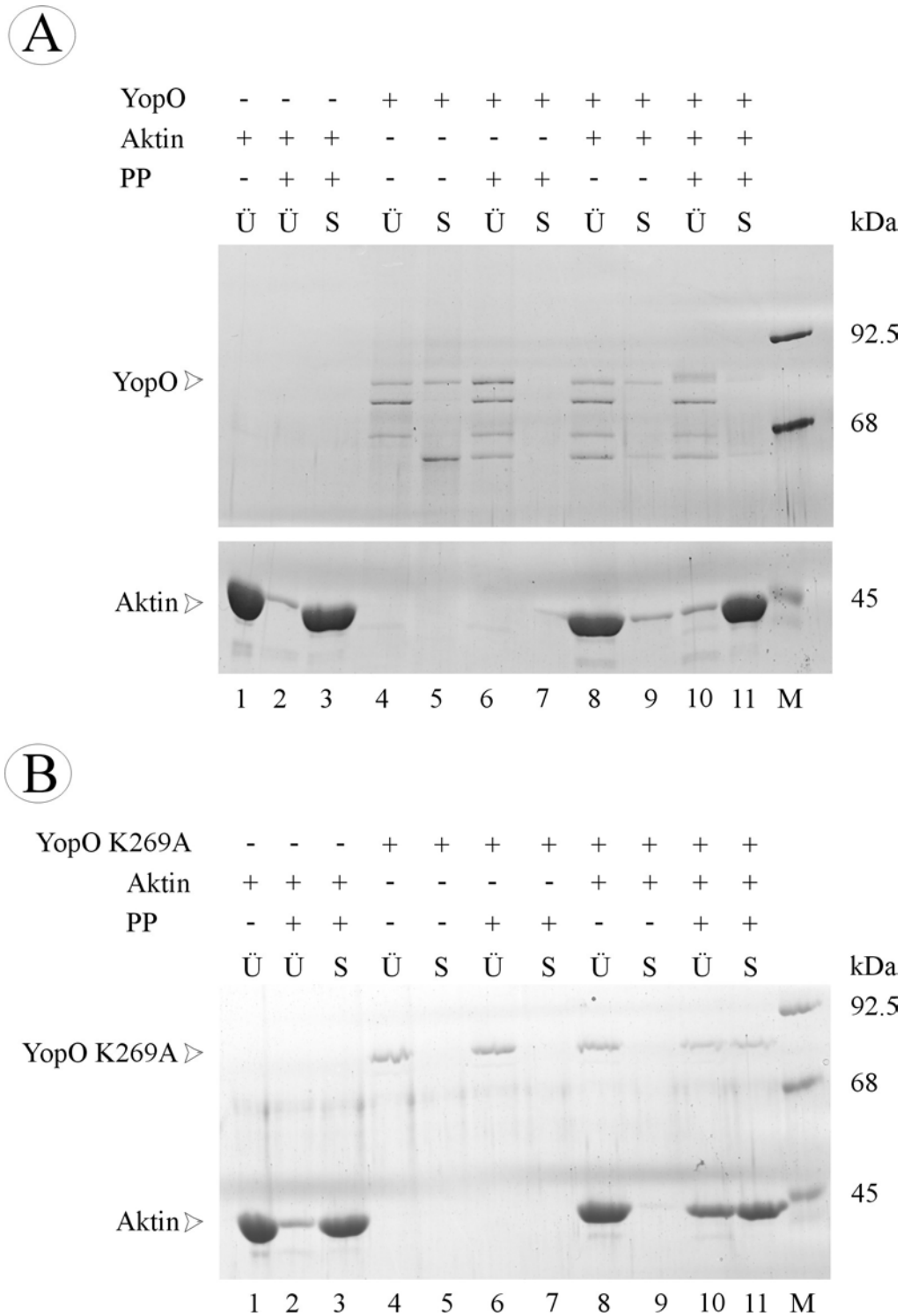


Abb. 15: Kosedimentation von YopO und inaktivem YopO K269A mit Aktin

Zunächst wurden die gereinigten Proteine für 10 min bei 100.000 g zentrifugiert. Vom abgenommenen Überstand wurden 0.5 μ M YopO (**A**) bzw. YopO K269A (**B**) mit 5 μ M Aktin in Gegenwart oder in Abwesenheit vom Polymerisationspuffer (PP) inkubiert und anschließend 30 min bei 100.000 g zentrifugiert. Der Überstand (Ü) wurde vom Sediment (S) getrennt, und beide Proben wurden anschließend mittels SDS-PAGE und Coomassie-Blau-Färbung analysiert. Die Beladung der einzelnen Spuren ist angegeben. Um die unscharfe Bande von YopO besser sichtbar zu machen, wurde ein 7.5%-iges SDS-Gel für YopO und ein 15%-iges SDS-Gel für Aktin verwendet.

3.3.2 YopO als GST-Fusionsprotein

Die verschiedenen YopO-Konstrukte wurden von Guelnihal Yueksekdag als GST-Fusionsproteine in *E. coli* exprimiert und gereinigt. Da die Abspaltung der Glutathion-S-Transferase oftmals unnötig ist, wurde in Kosedimentationsexperimenten und in Kinase-Assays geklärt, ob das Fusionsprotein die gleichen Eigenschaften in Bezug auf Aktin aufweist. Da keine Unterschiede festgestellt werden konnten und das Fusionsprotein offenbar stabiler ist, wurde nachfolgend auf eine Abspaltung des GST-Proteins verzichtet. Die Daten dieser Untersuchung sind in der Arbeit nicht dargestellt.

3.3.3 Kinase-Assays

3.3.3.1 Aktivierung der Autophosphorylierung von YopO durch G-Aktin

Im Kinase-Assay wurde deutlich, daß G-Aktin YopO aktiviert (Abb.16, Spur 2-4). Dabei scheint ein 1:1 Verhältnis (G-Aktin:YopO) auszureichen, um nach 1 h Inkubation bei RT ein maximales Phosphorylierungssignal zu erhalten. G-Aktin muß hierfür also nicht in Überschuß vorliegen (Vergleich Spur 3 mit Spur 4). Ein Verhältnis von 0.1:1 ist allerdings nicht ausreichend (Spur 2). Die Zugabe von Severin, einem F-Aktin und G-Aktin bindenden und fragmentierenden Protein, und F-Aktin alleine beeinflussen die Reaktion nicht (Spur 5-7). Die Zugabe von Phalloidin, einer Substanz, die die Depolymerisierung des Filamentes durch eine Herabsetzung der kritischen Konzentration behindert (Cooper, 1987), führte zu einer weiteren Abschwächung des nachweisbaren Signals (Abb. 17, Spur 7).

Für die zur Kontrolle eingesetzte inaktive Kinase YopO K269A konnte erwartungsgemäß kein Phosphorylierungssignal nachgewiesen werden (Abb. 16, Spur 8).

3.3.3.2 Untersuchung des Einflusses einiger aktinbindender Proteine oder aktinmodifizierender Substanzen auf die Aktivierung der Autophosphorylierung von YopO durch Aktin

Profilin I ist ein gut charakterisiertes G-Aktin bindendes Protein. Durch die Interaktion mit Profilin I wird G-Aktin dem Gleichgewicht mit F-Aktin entzogen. Die Bindung von Profilin I an G-Aktin hat allerdings keinen Einfluß auf die Aktivierung von YopO (siehe Abb. 17 und 18).

Cytochalasin D ist eine G-Aktin und F-Aktin bindende organische Substanz. Durch die Bindung an das schnell wachsende "plus"-Ende des Aktinfilamentes übt es eine verkappende Funktion aus und verhindert dadurch eine weitere Anlagerung von Aktinuntereinheiten. In Gegenwart von Mg^{2+} führt die Verwendung von Cytochalasin D (in einer äquimolaren

Konzentration) zu einer verstärkten Dimerisierung des monomeren Aktins (Cooper, 1987). Es konnte festgestellt werden, daß die Aktivierung der YopO-Kinase unter diesen Bedingungen stark reduziert ist (Abb. 17, Vergleich Spur 1 mit Spur 4). Ein 5-facher Überschuß an CytochalasinD hatte keine weitere Reduzierung des Phosphorylungssignals von YopO zur Folge (Spur 5). Dies stimmt gut mit der Ansicht überein, daß CytochalasinD höchstens 1:1 an G- und F-Aktin bindet (Cooper, 1987).

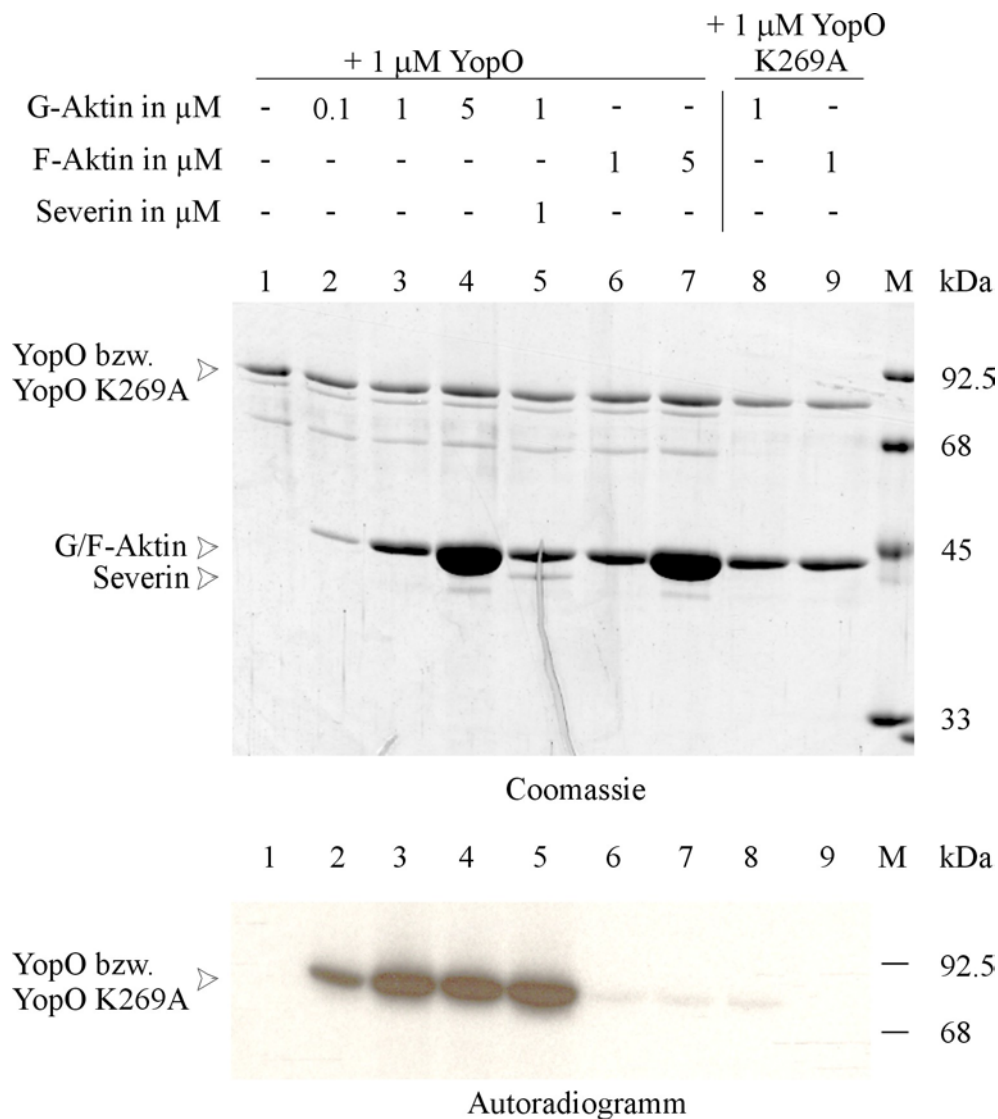


Abb. 16: G-Aktin als Aktivator von YopO *in vitro*

1 µM YopO bzw. YopO K269A wurde 1 h bei RT mit unterschiedlichen Mengen an G- und F-Aktin (0.1 µM, 1 µM und 5 µM) und Severin (1 µM) im Kinasepuffer (einschließlich γ -³²P-ATP) inkubiert. Die Proben wurden dann anschließend mittels SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie-Blau angefärbt (Coomassie). Das Phosphorylungssignal wurde mit Hilfe eines Röntgenfilmes nachgewiesen (Autoradiogramm). Die Beladung der einzelnen Spuren ist angegeben.

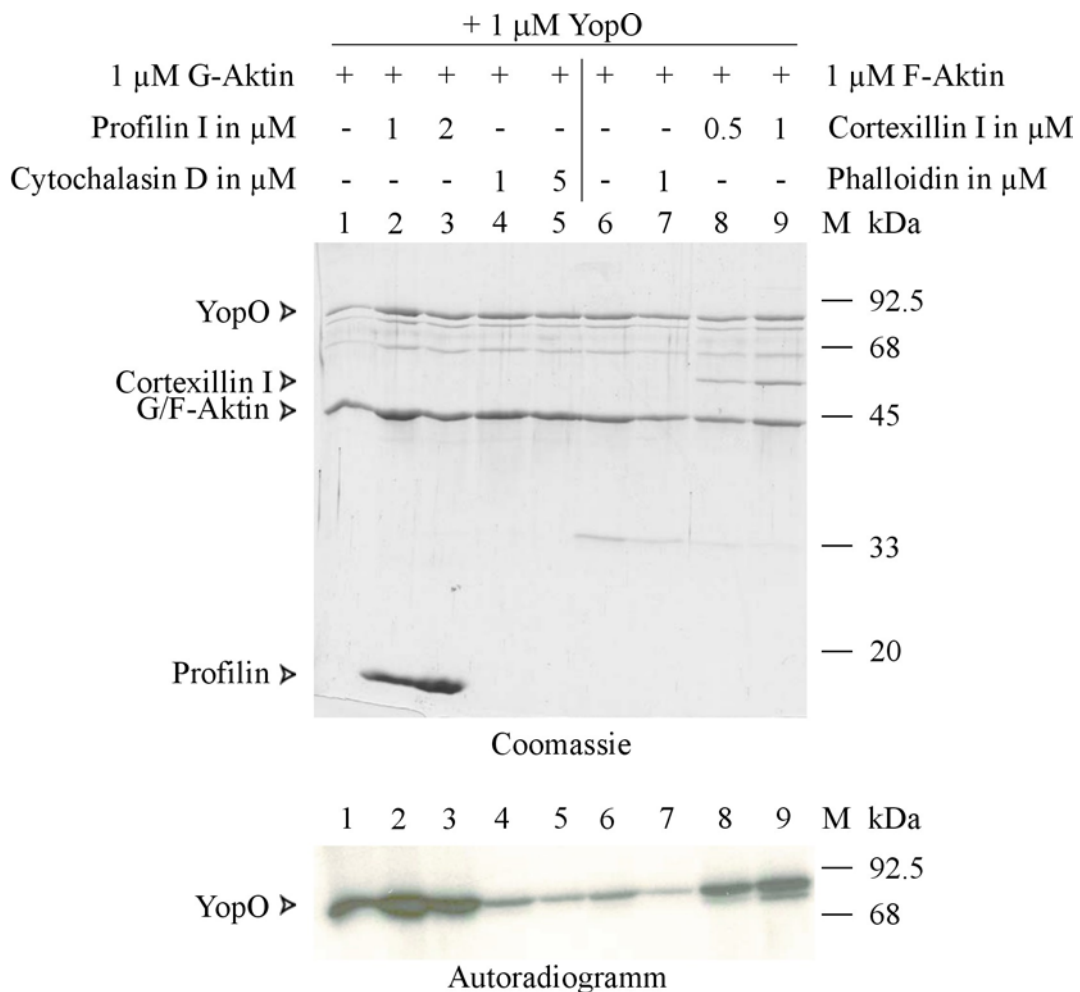


Abb. 17: Aktivierung der YopO-Kinase in Anwesenheit verschiedener aktinbindender Proteine und chemischer Substanzen

1 μ M YopO wurde 1 h bei RT mit 1 μ M G- oder F-Aktin im Kinasepuffer (einschließlich γ - 32 P-ATP) und mit verschiedenen aktinbindenden Proteinen (Profilin I, Cortexillin I) oder aktin-modifizierenden Substanzen (Cytochalasin D, Phalloidin) inkubiert. Für die Reaktion benötigtes F-Aktin wurde zuvor 1 h bei RT im Polymerisationspuffer aus G-Aktin in Gegenwart von Cortexillin I oder Phalloidin gebildet, anschließend abzentrifugiert (100.000 g, 30 min) und entsprechend eingesetzt. Die Proben wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie-Blau angefärbt (Coomassie). Das Phosphorylungssignal wurde mit Hilfe eines Röntgenfilmes nach-gewiesen (Autoradiogramm). Die Beladung der einzelnen Spuren ist angegeben.

Überraschenderweise führte die Zugabe von Cortexillin I zu F-Aktin zu einer stärkeren Phosphorylierung der YopO-Kinase (Spur 8 und 9). Cortexillin I ist ein F-Aktin bindendes Protein. Es spielt eine Rolle bei der Stabilisierung der Aktinfilamente, indem es antiparallele Filamente quervernetzt und dadurch bündelt (Faix et al., 1996). Dieses Protein ist bisher nur aus *D. discoideum* bekannt. Ein Kontrollexperiment zeigte, daß Cortexillin I alleine nicht in der Lage ist, YopO zu aktivieren (hier nicht dargestellt). Jedoch ist die indirekte Aktivierung von GST-YopO durch Cortexillin I in Gegenwart von F-Aktin bei weitem nicht so stark, wie

die durch G-Aktin stimulierte Aktivierung (siehe Abb. 18). Weiterhin kann man erkennen, daß das Verhältnis 0.1:1:1 (Cortexillin I : Aktin : GST-YopO) einem Sättigungsverhältnis für die Kinaseaktivierung entspricht, da auch ein Verhältnis von 0.5:1:1 kein stärkeres Phosphorylierungssignal von GST-YopO zur Folge hat (Vergleich Abb. 18 Spur 8 mit Spur 10). Eine Zugabe von Phalloidin hebt die stimulierende Wirkung von Cortexillin I auf (Spur 9 und 11).

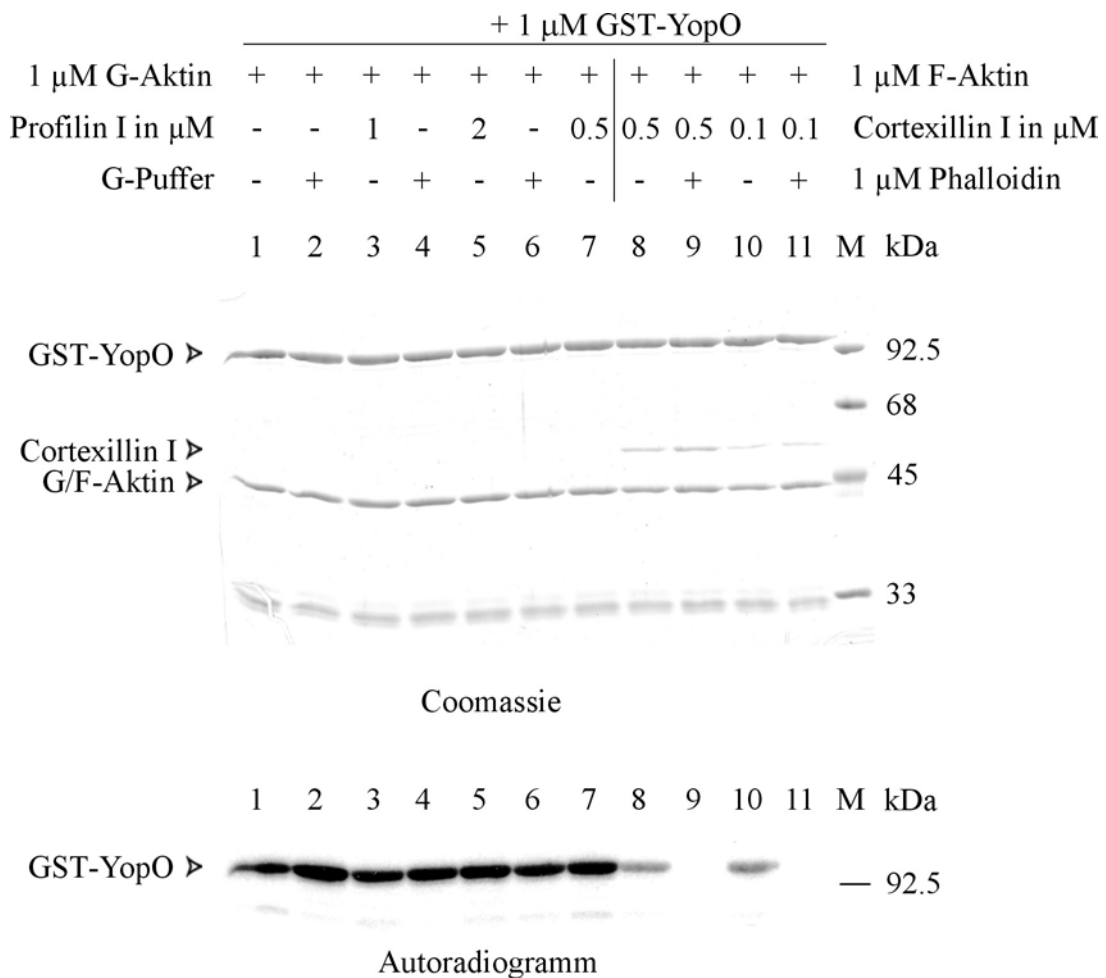


Abb. 18: Aktivierung der YopO-Kinase in Anwesenheit von Profilin I und Cortexillin I

Die Vorgehensweise war die gleiche wie in Abb. 17 beschrieben. Die Konzentrationen von GST-YopO, G-Aktin, F-Aktin und Phalloidin sind jeweils 1 μ M. Die entsprechend verwendeten Konzentrationen von Profilin I und Cortexillin I sind der Abbildung zu entnehmen.

Da das im G-Puffer vorliegende Profilin I zusätzliches, nicht γ - 32 P markiertes ATP enthält, wurden Kontrollen mit entsprechend gleichen Mengen an G-Puffer aufgetragen. (Spur 2 als Kontrolle zur Spur 3; Spuren 4 und 6 als Kontrollen zu den Spuren 5 und 7).

3.3.3.3 MBP ("myelin basic protein"), Histon-TypIII und Casein als künstliche Substrate von GST-YopO

Obwohl bisher das eukaryontische Substrat der YopO-Kinase unbekannt ist, konnten Juris et al. (2000) zeigen, daß verschiedene künstliche basische Substrate (MBP, Histon-TypIII, Casein) durch YopO in Gegenwart von Aktin phosphoryliert werden. Es war daher von Interesse, diese Interaktion genauer zu untersuchen.

1 µM GST-YopO	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	
1.2 µg MBP	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	
1 µM G-Aktin	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	1 µM F-Aktin
1 µM Profilin I	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	1 µM Cortexillin I
						-	-	-	-	+	+	1 µM Phalloidin

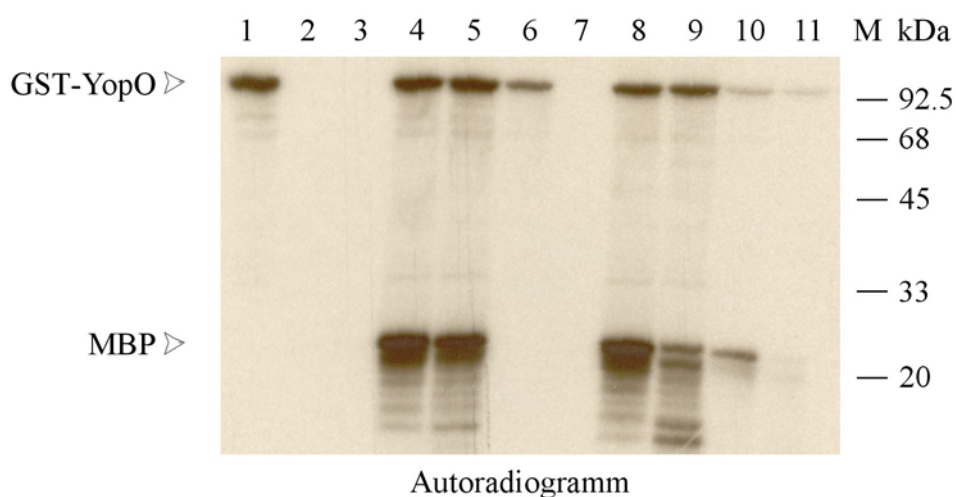
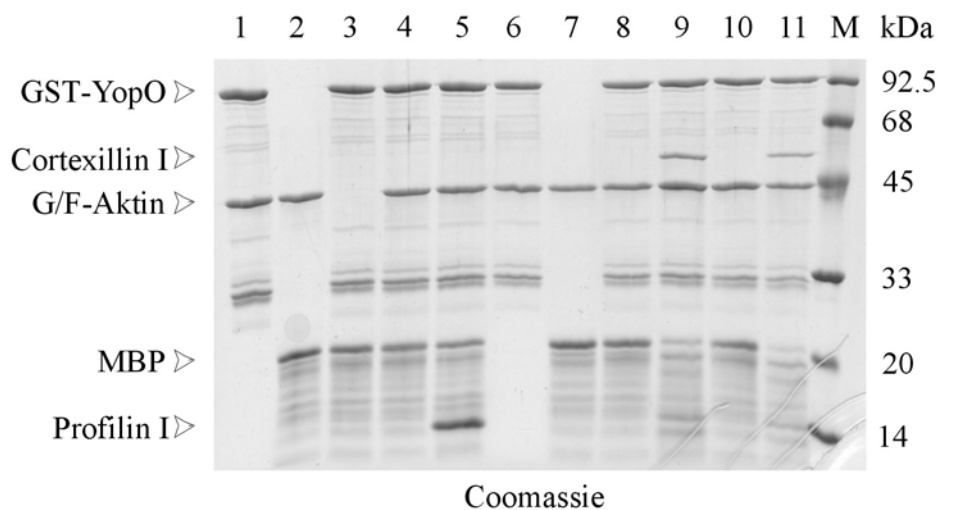


Abb. 19: MBP als Substrat der aktivierten YopO-Kinase

Die Vorgehensweise war die gleiche wie in Abb. 17 beschrieben. Die Konzentrationen von GST-YopO, G-Aktin, F-Aktin, Profilin I, Cortexillin I und Phalloidin waren jeweils 1 µM. Mit Ausnahme der Kontrollen (Spur 1 und Spur 6) wurden 1.2 µg MBP ("myelin basic protein") pro Ansatz eingesetzt. Die genaue Zusammenstellung der Ansätze ist der Tabelle zu entnehmen.

Die Abb. 19 stellt die Resultate der Untersuchung mit MBP ("myelin basic protein") dar. Der Spur 3 ist zu entnehmen, daß MBP durch GST-YopO in Abwesenheit von G-Aktin nicht phosphoryliert wird. Erst nach Zugabe von G-Aktin konnten sowohl für GST-YopO als auch für das Substrat MBP Phosphorylierungssignale nachgewiesen werden (Spur 4), Profilin I hat darauf keinen Einfluß (Spur 5). Überraschenderweise hatte die Zugabe von MBP zu F-Aktin und GST-YopO ein stärkeres Phosphorylierungssignal der Kinase zur Folge als in den Ansätzen ohne MBP (Vergleich Spur 8 mit Spur 7). Ähnlich der Zugabe von Phalloidin bei Cortexillin I (Abb. 18 Spur 9) bewirkte auch hier die Zugabe von Phalloidin eine verminderte Aktivierung der Kinaseaktivität (Spur 10). Weiterhin erwähnenswert ist die Beobachtung, daß die Zugabe von Cortexillin I zum MBP in Gegenwart von F-Aktin und GST-YopO eine Degradation des basischen Proteins begünstigte (Spur 9 und 11). Eine Kontamination mit Proteinkinasen konnte hier ausgeschlossen werden.

Histon-TypIII wurde als ein weiteres künstliches Substrat von YopO beschrieben. Jedoch konnte keine Phosphorylierung von Histon-TypIII durch die aktivierte YopO-Kinase in Gegenwart von G-Aktin festgestellt werden (Abb. 20 Spur 3). Ähnlich dem Cortexillin I und MBP hat Histon-TypIII einen positiven Einfluß auf die Aktivierung der Kinase in Gegenwart von F-Aktin. In diesem Fall wird dann auch das basische Substrat teilweise phosphoryliert (Spur 8). Überraschenderweise wurde zudem eine Phosphorylierung des Aktins beobachtet. Dies wird noch deutlicher, wenn man zum Reaktionsansatz Cortexillin I zugibt. (Spur 9). Eine Zugabe des Phalloidins bewirkt auch in Gegenwart von Histon-TypIII eine deutliche Reduzierung der Aktivierung von GST-YopO (Spur 10).

Als letztes künstliches Substrat von YopO wurde Casein getestet. Es konnte gezeigt werden, daß erst in der Gegenwart von G-Aktin die Kinase in der Lage ist, Casein zu phosphorylieren (siehe Abb. 21 Spur 4). Dagegen konnte aktiviertes GST-YopO in Gegenwart von Cortexillin und F-Aktin nur sehr wenig Casein phosphorylieren. Dabei konnte, wie schon bei Histon-TypIII beschrieben, ebenfalls eine leichte Phosphorylierung von Aktin nachgewiesen werden (Spur 9). Im Gegensatz zu den beiden basischen Proteinen Histon-TypIII und MBP, konnte für Casein in Gegenwart von F-Aktin nur eine sehr schwache Aktivierungsbande von GST-YopO beobachtet werden (Spur 8).

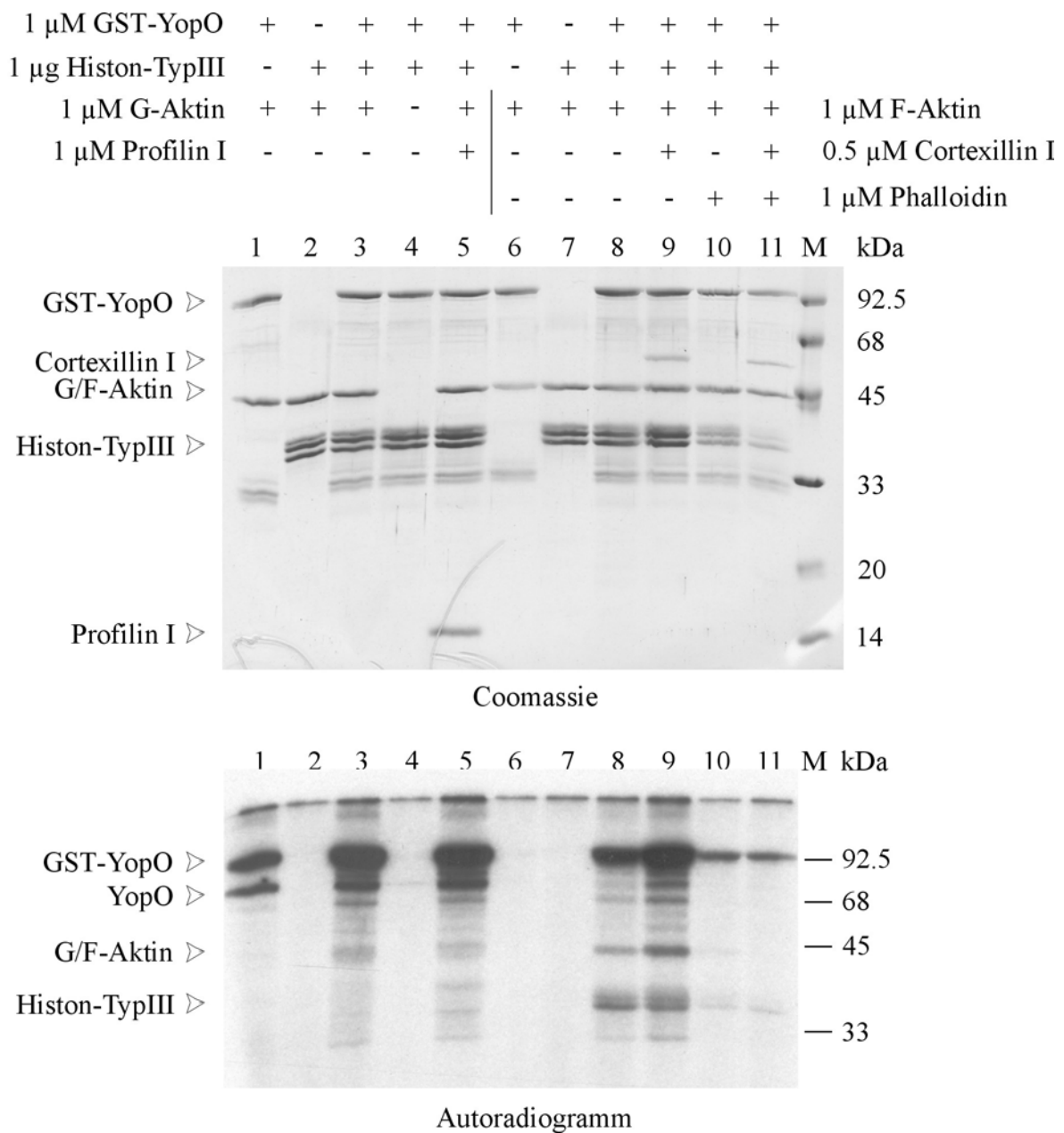


Abb. 20: Histon-TypIII als Substrat der aktivierten YopO-Kinase in Gegenwart von F-Aktin

Die Vorgehensweise war die gleiche wie in Abb. 17 beschrieben. Die Konzentrationen von GST-YopO, G-Aktin, F-Aktin, Profilin I und Phalloidin waren jeweils 1 μ M, die von Cortexillin I 0.5 μ M. Mit Ausnahme der Kontrollen (Spur 1 und Spur 6) wurden 1.0 μ g Histon-TypIII pro Ansatz verwendet. Die genaue Zusammenstellung der Ansätze ist der Tabelle zu entnehmen.

Es sei daraufhin gewiesen, daß das nachweisbare YopO aus der Abspaltung der GST-Sequenz von GST-YopO resultiert.

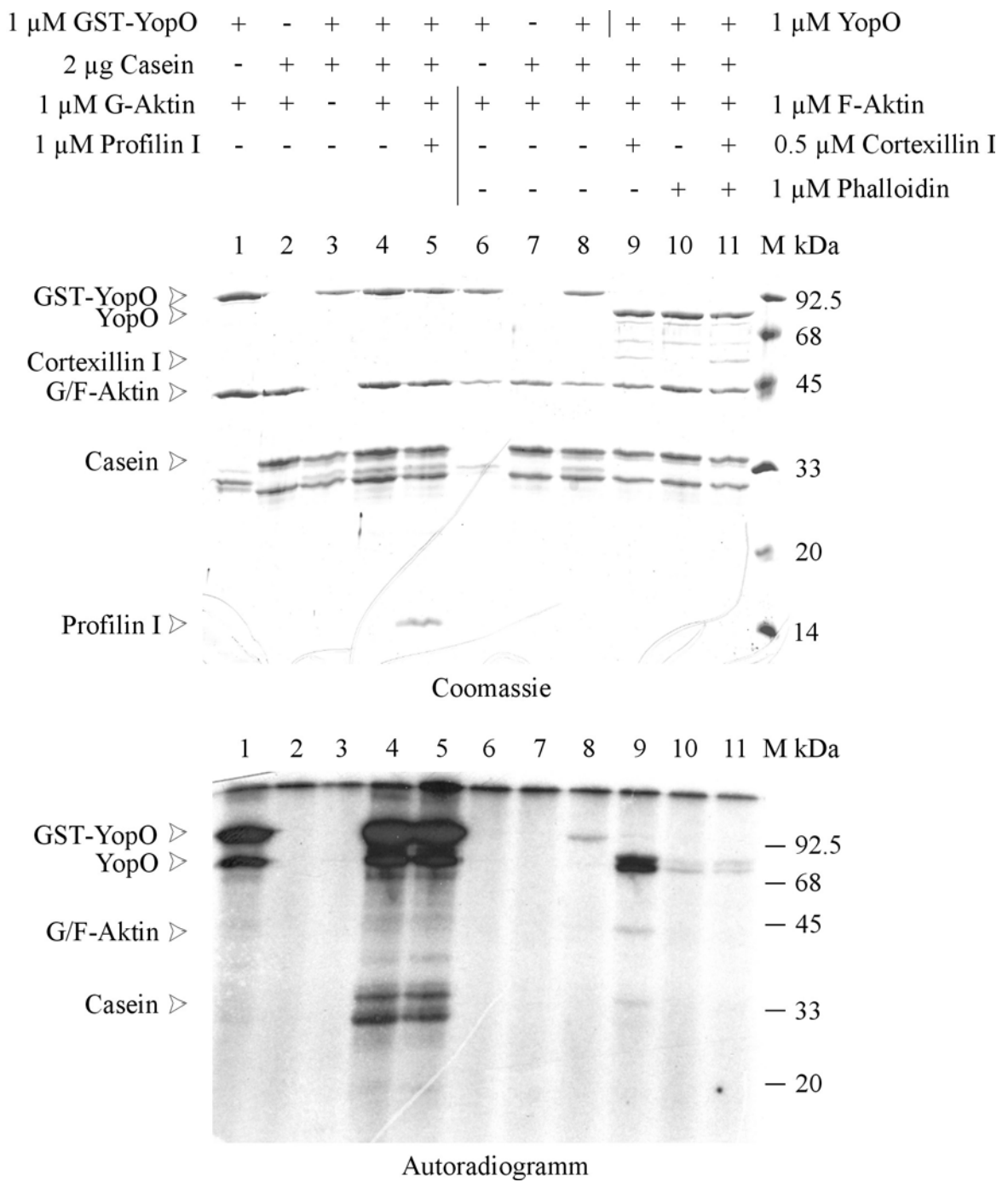


Abb. 21: Casein als Substrat der aktivierten YopO-Kinase

Die Vorgehensweise war die gleiche wie in Abb. 17 beschrieben. Die Konzentrationen von GST-YopO, G-Aktin, F-Aktin, Profilin I und Phalloidin waren jeweils 1 μ M, die von Cortexillin I 0.5 μ M. Mit Ausnahme der Kontrollen (Spur 1 und Spur 6) wurden 2.0 μ g Casein pro Ansatz eingesetzt. Die genaue Zusammenstellung der Ansätze ist der Tabelle zu entnehmen.

3.3.3.4 Vergleich von Muskel- und Nichtmuskelaktin als Aktivator der Autophosphorylierung von YopO

Alle bisherigen Untersuchungen dieser Arbeit wurden mit Kaninchen-Muskelaktin durchgeführt. Ein Grund hierfür war, daß sich das Muskelaktin leicht und in großen Mengen isolieren läßt. *Yersinien* zeigen jedoch einen Tropismus für das lymphatische Gewebe. Da Aktin hochkonserviert ist, aber dennoch geringfügige Unterschiede in der Aminosäuresequenz zwischen Muskel- und Nichtmuskelaktin aufweist, waren Untersuchungen mit dem Nichtmuskelaktin notwendig. Hierfür wurde das Aktin aus *D. discoideum* verwendet. Dabei stellte sich heraus, daß Nichtmuskelaktin ein ungefähr 10-fach besserer Aktivator der Kinase ist (Vergleich Abb. 22 und 23).

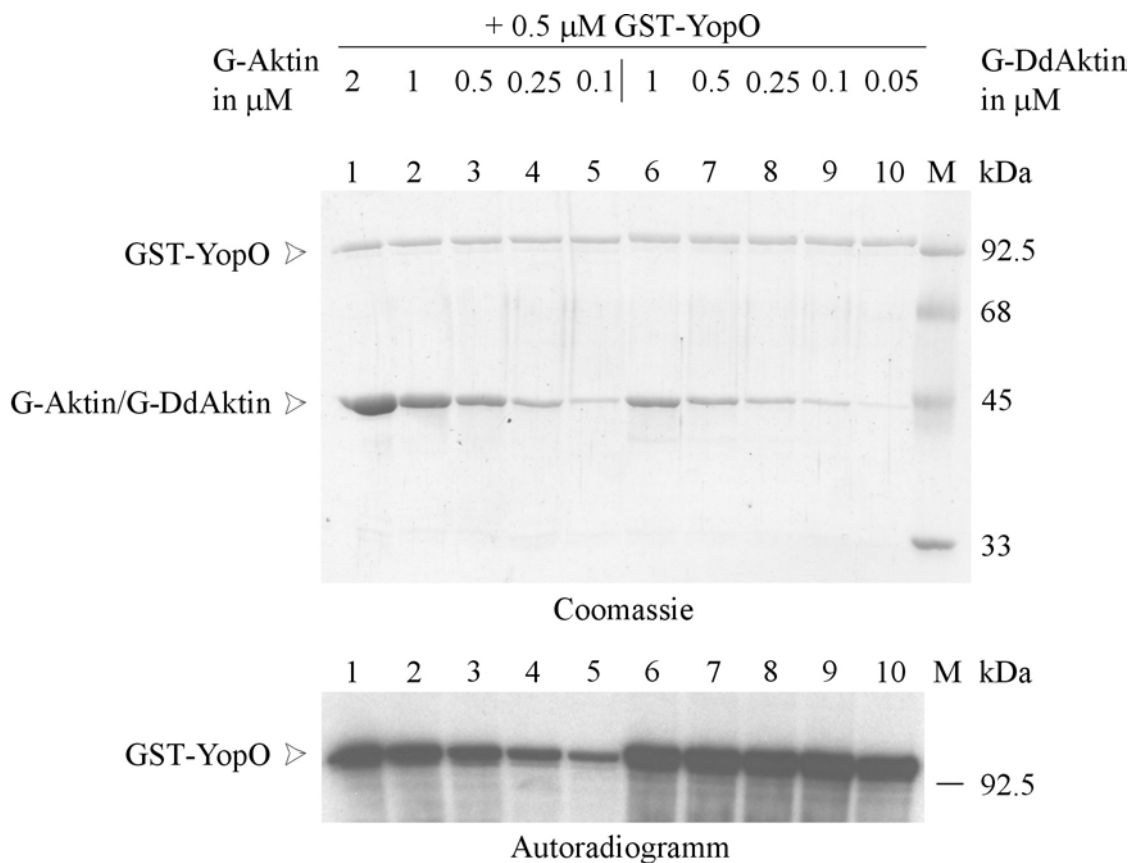


Abb. 22: Nichtmuskelaktin ist ein ca. 10-fach besserer Aktivator von GST-YopO als Muskelaktin (Teil 1)

1 μ M GST-YopO wurde 1 h bei RT mit unterschiedlichen Konzentrationen von monomerem Muskelaktin aus Kaninchen (Aktin) oder monomerem Nichtmuskelaktin aus *D. discoideum* (DdAktin) im Kinasepuffer (einschließlich γ - 32 P-ATP) inkubiert. Die Proben wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie-Blau angefärbt (Coomassie). Das Phosphorylierungssignal wurde mit Hilfe eines Röntgenfilmes nachgewiesen (Autoradiogramm). Die Beladung der einzelnen Spuren ist angegeben.

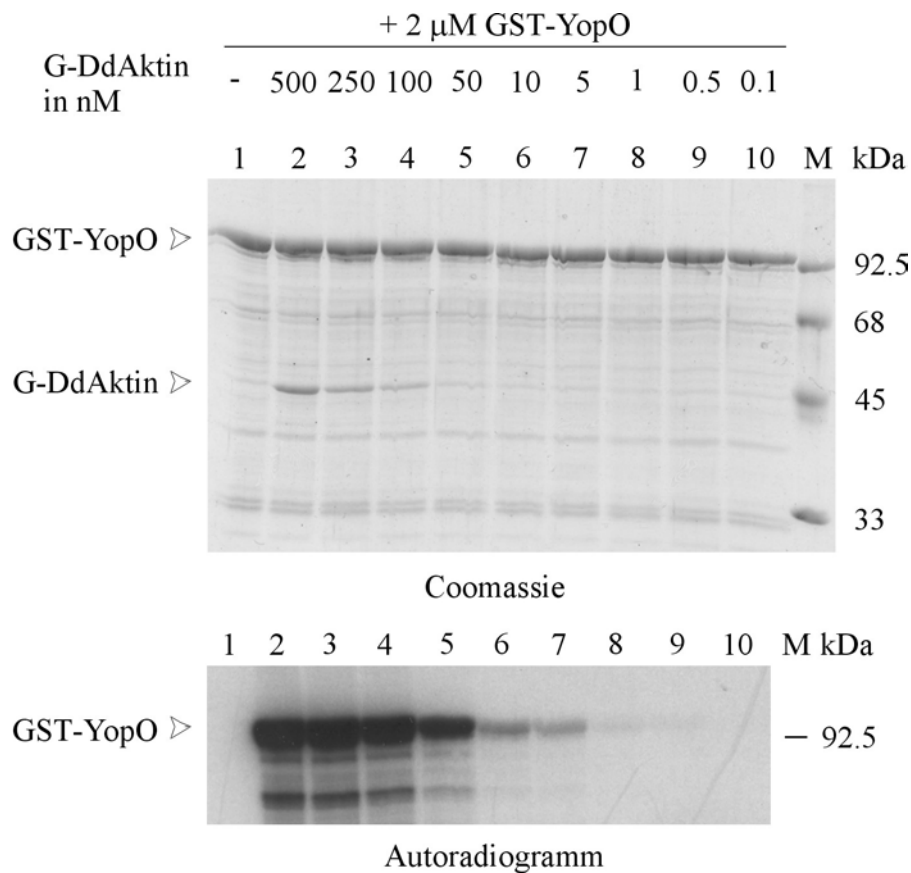


Abb. 23: Nichtmuskelaktin ist ein ca. 10-fach besserer Aktivator von GST-YopO als Muskelaktin (Teil 2)

Die Vorgehensweise ist der Abb. 22 zu entnehmen. Die Beladung der einzelnen Spuren ist angegeben. Es ist zu beachten, daß im Vergleich zur Abb. 22 die doppelte Konzentration von GST-YopO verwendet wurde.

Auch bei DdAktin aktiviert nur die monomere Form die Kinase, Unterschiede zu Aktin aus Blutplättchen konnten nicht festgestellt werden. Die Zugabe von Cortexillin I zu polymerisiertem DdAktin hatte im Gegensatz zur Zugabe zum polymerisierten Muskelaktin keinen deutlich positiven Einfluß auf die Aktivierung von YopO (ohne Abb.).

3.3.3.5 Untersuchungen zum Einfluß verschiedener GTPasen auf die Aktivierung von YopO

In der Literatur ist neben einer postulierten Aktinbindestelle ebenfalls eine GTPase-Bindestelle für Rac1 und RhoA am C-terminalen Ende von YopO beschrieben (Dukuzumuremyi et al., 2000). Deshalb war es von Interesse herauszufinden, ob die GTPasen einen Einfluß auf die Aktivierung von YopO durch monomeres Aktin besitzen. Da bekannt ist, daß Rac1 und RhoA sowohl in der GDP- wie auch in der GTP-gebundenen Form an YopO binden können, wurden beide Möglichkeiten in einem Kinase-Assay untersucht. CDC42, eine weitere GTPase, die aber nicht an YopO binden kann, wurde hierbei als Kontrolle verwendet. Weder Rac1 noch RhoA hatten einen hemmenden Einfluß auf die Autophosphorylierung von YopO

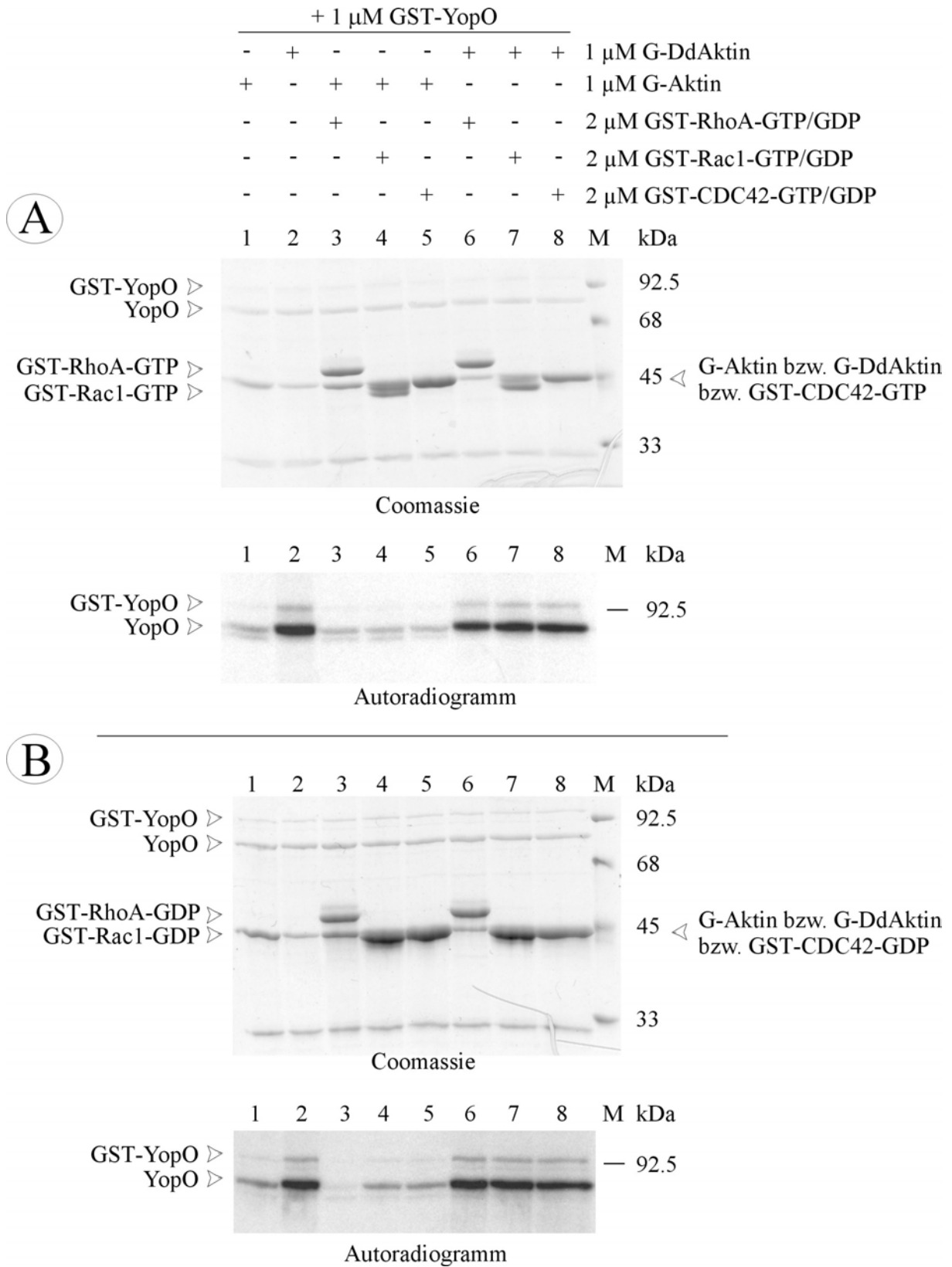


Abb. 24: Der Einfluß verschiedener GTPasen auf die Aktivierung von YopO

(A)/(B) 1 μ M GST-YopO wurde 1 h bei RT mit 1 μ M G-Aktin (Muskel/Kaninchen) bzw. 1 μ M G-DdAktin (Nichtmuskel/*D. discoideum*) im Kinasepuffer (einschließlich γ -³²P-ATP) in Gegenwart von 2 μ M GST-GTPase (Rac1/RhoA/CDC42) in GTP- oder GDP-gebundener Form inkubiert. Es sei daraufhin gewiesen, daß das nachweisbare YopO aus der Abspaltung der GST-Sequenz von GST-YopO resultiert.

in Gegenwart von Nichtmuskelaktin haben (Abb. 24 A und B). Im Gegensatz dazu konnte beim Muskelaktin in Anwesenheit von RhoA-GDP eine Hemmung der Phosphorylierung von YopO beobachtet werden (Abb. 24 B, Spur 3).

3.3.3.6 Untersuchungen zur Oligomerisierung von YopO

Bisher waren keine Daten verfügbar, die darüber Auskunft geben, ob die Kinase YopO für ihre Autophosphorylierung als Monomer, Dimer oder Oligomer vorliegen muß. Um erste Anhaltspunkte zur Klärung dieser Frage zu gewinnen, wurden Kinase-Assays in gleichzeitiger Anwesenheit verschiedener YopO-Konstrukte durchgeführt.

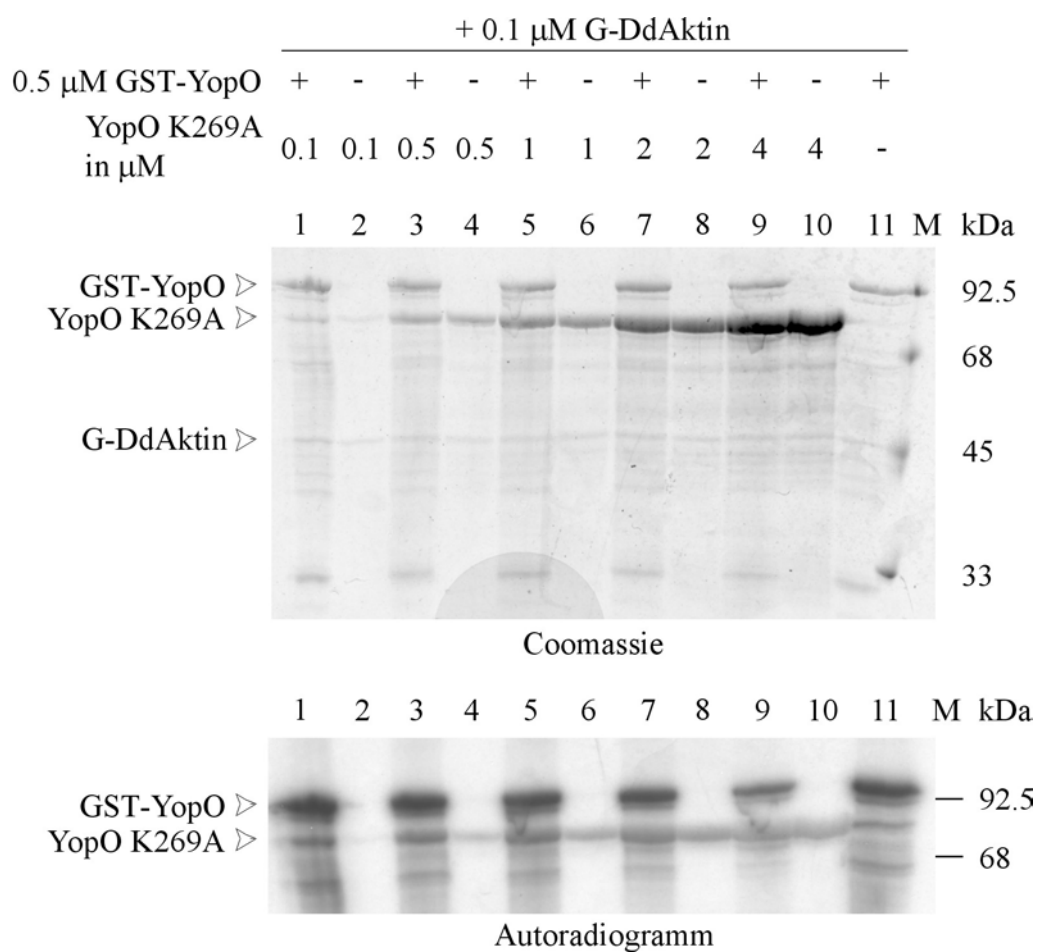


Abb. 25: Die Zugabe der inaktiven Mutante YopO K269A zum Wildtyp reduziert beim 4-fachen Überschuß das Phosphorylierungssignal von GST-YopO

1 μ M GST-YopO wurde 1 h bei RT mit 0.1 μ M G-DdAktin im Kinasepuffer (einschließlich γ - 32 P-ATP) in Gegenwart unterschiedlicher Konzentrationen von YopO K269A inkubiert. Zur Kontrolle diente der gleiche jeweilige Ansatz ohne den Wildtyp GST-YopO. Die Proben wurden dann anschließend mittels SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie-Blau angefärbt (Coomassie). Das Phosphorylierungssignal wurde mit Hilfe eines Röntgenfilmes nachgewiesen (Autoradiogramm). Die Beladung der einzelnen Spuren ist angegeben.

Steigert man die Konzentration der inaktiven Mutante YopO K269A bei gleichbleibender Konzentration von GST-YopO so kann man bei einem Verhältnis von 4:1 eine deutliche Reduzierung der Phosphorylierung von YopO feststellen (Abb. 25 Spur 9). Weiterhin kann man beobachten, daß YopO K269A scheinbar die Kinaseaktivität nicht vollständig verloren hat, da eine sehr schwache Phosphorylierungsbande bei hoher Konzentration nachweisbar ist (Spur 10). Dies paßt gut mit einer mündlichen Mitteilung von Prof. Dr. M. Aepfelbacher zusammen, wonach die Kinaseaktivität in der Mutante nicht komplett ausgeschaltet, sondern nur sehr stark reduziert ist. Es läßt sich aber auch feststellen, daß YopO K269A in Gegenwart von GST-YopO nicht phosphoryliert wird.

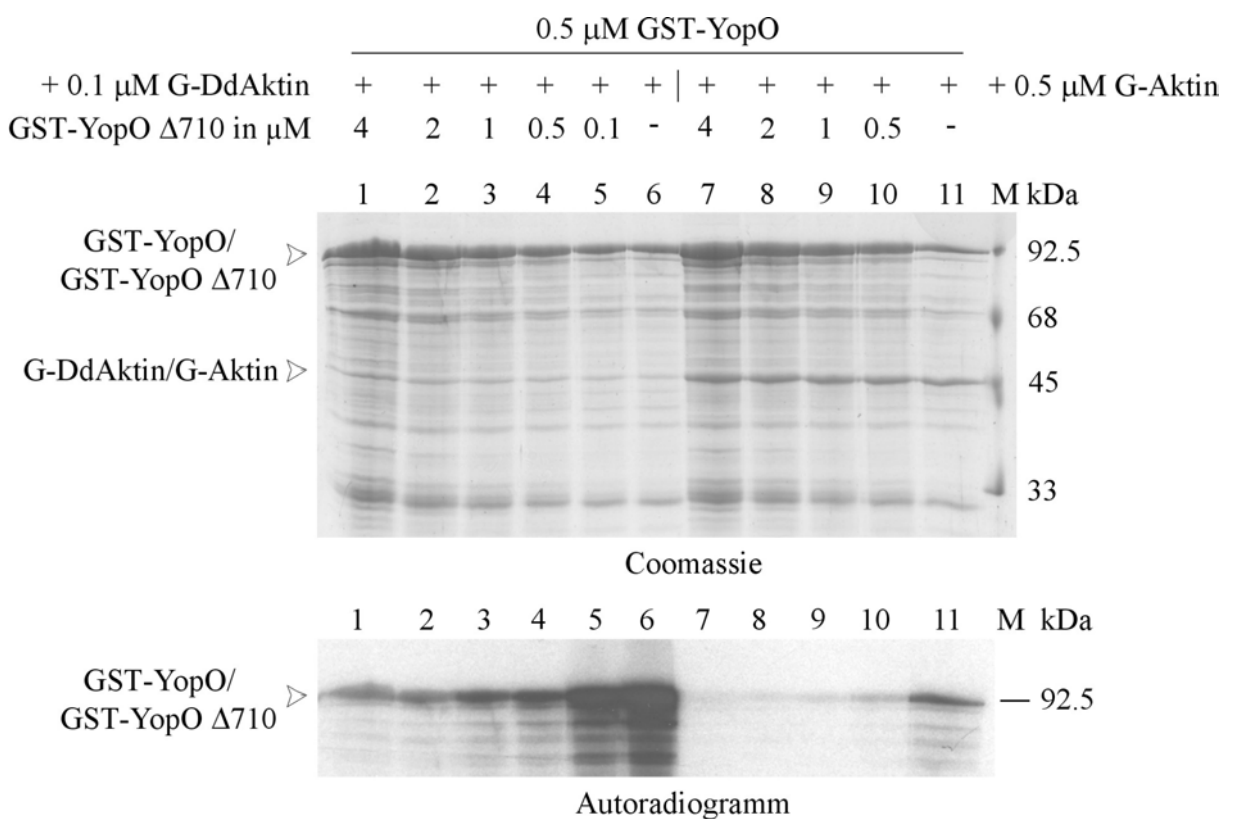


Abb. 26: Die Zugabe der Deletions-Mutante YopO Δ 710 zum Wildtyp reduziert

bei steigender Konzentration das Phosphorylierungssignal von GST-YopO

1 μ M GST-YopO wurde 1 h bei RT mit 0.1 μ M G-DdAktin bzw. 0.5 μ M G-Aktin im Kinasepuffer (einschließlich γ - 32 P-ATP) in Gegenwart verschiedener Konzentrationen der Deletions-Mutante YopO Δ 710 inkubiert. Die Proben wurden anschließend mittels SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie-Blau angefärbt (Coomassie). Das Phosphorylierungssignal wurde mit Hilfe eines Röntgenfilmes nachgewiesen (Autoradiogramm).

Eine stärkere Reprimierung der Phosphorylierung von YopO konnte beim Mischen des Wildtyps mit der Deletionsmutante YopO Δ 710 (hier fehlen die letzten 20 Aminosäuren, die

eine Coronin-ähnliche Sequenz aufweisen) beobachtet werden (Abb. 26). Schon ein 1:0.5-Verhältnis (WT:MT) führte zu einem deutlich schwächeren Phosphorylierungssignal im Vergleich zur Kontrolle (Vergleich Spur 4 mit Spur 6). Dabei ist diese reprimierende Wirkung unabhängig davon, ob Muskel- oder Nichtmuskelaktin vorliegt.

Bei einem Kinase-Assay des Wildtyps YopO in Gegenwart von GST-20aa (dieses Konstrukt enthält nur die letzten 20 Aminosäuren von YopO) konnte bei einem 1:1- bzw. 1:2-Verhältnis kein Einfluß auf die Autophosphorylierung der Kinase festgestellt werden.

3.3.4 Untersuchungen zum Einfluß verschiedener YopO-Konstrukte auf die Polymerisierung von Aktin mittels Fluoreszenzspektroskopie

Mit Hilfe der Fluoreszenzspektroskopie wurde der Einfluss verschiedener YopO-Konstrukte auf die Polymerisierung von Aktin gemessen (Abb. 27 A-C). Hierbei wurde Pyren-markiertes G-Aktin verwendet, das im Filament ungefähr 30-fach stärker fluoresziert. Es konnte festgestellt werden, daß sowohl der Wildtyp als auch die inaktive Mutante einen hemmenden Einfluß auf die Aktin-Polymerisierung besitzen. Jedoch fällt im Vergleich beider Konstrukte auf, daß der Effekt des Wildtyps deutlicher war. GST-20aa hatte keinen negativen Einfluß auf die Polymerisierung des Aktins. Deshalb konnte dieses Konstrukt auch als Kontrolle dafür dienen, daß nicht schon alleine die Gegenwart von GST einen hemmenden Einfluß auf die Polymerisierung des Aktins besitzt.

In vorhergehende Experimente konnte gezeigt werden, daß G-Aktin die Autophosphorylierung von YopO stimuliert (Abb. 16). Weiterhin konnte ein hemmender Einfluß von YopO auf die Aktin-Polymerisierung gemessen werden. Deshalb war es von Interesse, ob mittels eines Emission-Scans eine direkte Bindung zwischen der Kinase YopO und dem G-Aktin gezeigt werden kann. Hierfür wurde Pyren-markiertes G-Aktin in einem Spektralbereich von 380-395 nm gemessen. Die auftretende charakteristische Kurve diente der Kontrolle. Eine Zugabe von YopO in steigender Konzentration führte zu einem immer weiter ansteigenden Maximum der Emission (Abb. 27 D). Dies kann als ein Beweis für die direkte Interaktion zwischen Aktin und YopO angesehen werden, da nur ein direkter Kontakt beider Moleküle den Verlauf der Kurve beeinflussen kann. Eine hier nicht wiedergegebene Kontrolle unterstützt diese Annahme, da für GST-20aa auch bei einem 100-fachen Überschuß kein Einfluß auf die charakteristische Kurve für Pyren-markiertes G-Aktin festgestellt werden konnte.

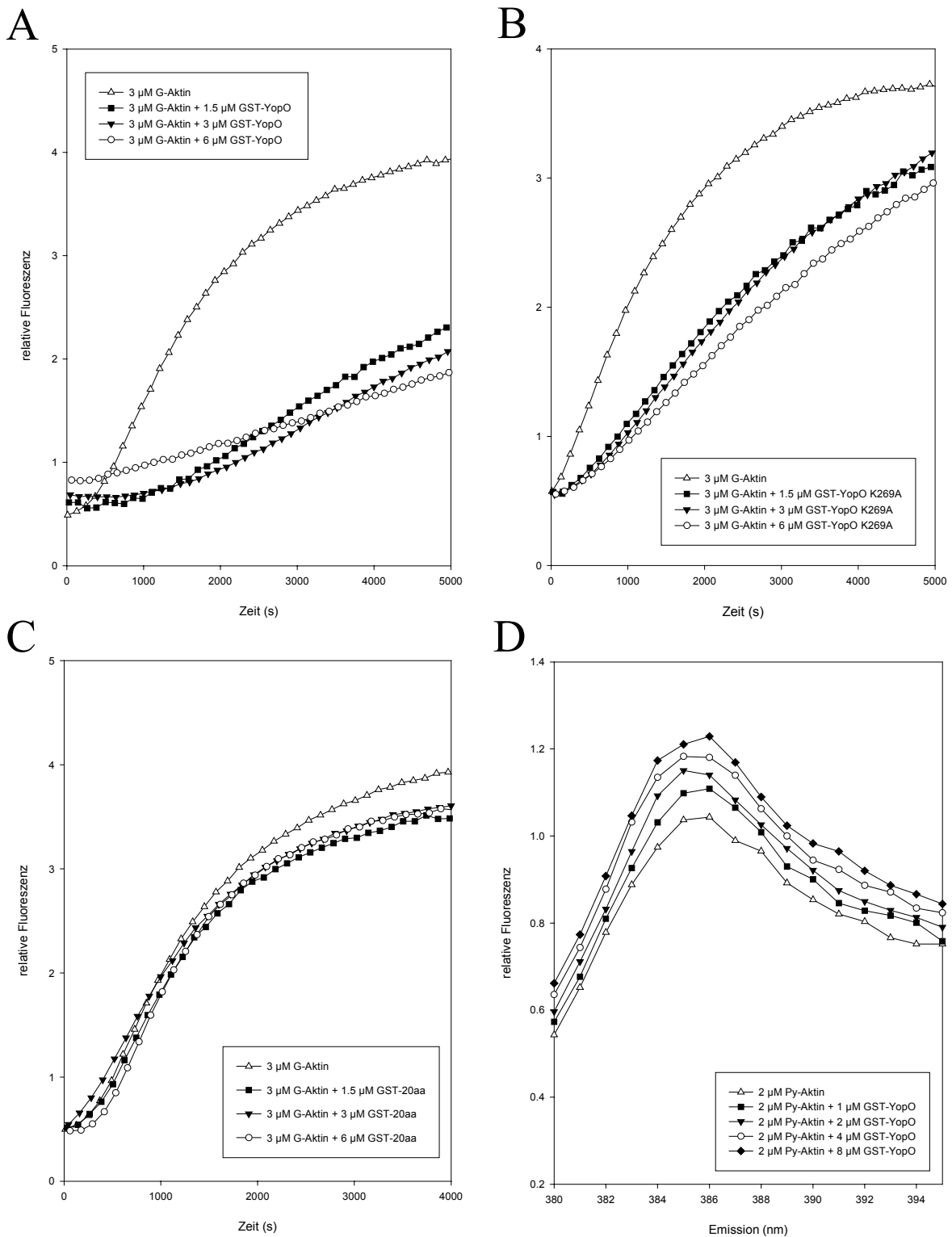


Abb. 27: Fluoreszenzspektroskopische Untersuchungen

(A)/(B)/(C) 3 μM G-Aktin und 0.3 μM Pyren-G-Aktin wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen des zu testenden YopO-Konstruktes im Polymerisationspuffer gemischt. Mit Hilfe der Fluoreszenzspektroskopie wurde dann der entsprechende Verlauf der Aktin-Polymerisation gemessen.

(D) Je 2 μM Pyren-G-Aktin wurde mit unterschiedlichen Konzentrationen an YopO 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde ein Emissionsscan durchgeführt.

4 Diskussion

4.1 DdLmpB und DdLmpC

Im Zuge der vollständigen Sequenzierung des *D. discoideum*-Genoms konnte festgestellt werden, daß es neben DdLmpA (Karakesisoglou et al., 1999) zwei weitere homologe Proteine der CD36/LIMP-II-Familie gibt. Eine erste biochemische und zellbiologische Charakterisierung der DdLmpB und DdLmpC genannten Proteine war Teil dieser Arbeit. Ähnlich wie für DdLmpA konnte eine familientypische Membran-Topologie und eine Lokalisation an endolysosomalen Vesikeln nachgewiesen werden. Unterschiede ergaben sich in der entwicklungsabhängigen Regulation.

4.1.1 Die Membran-Topologie der DdLmp-Homologen

Alle bisherigen Mitglieder der CD36/LIMP-II-Familie weisen eine typische Haarnadelstruktur auf. Diese Struktur beschreibt jeweils am N- und C-Terminus eine hydrophobe, transmembrane Domäne für die Integration der Proteine in die Plasma- oder Vesikelmembran. Beide Proteinenden liegen im Zytosol der Zelle vor. Für die Mitglieder der LIMP-II-Subgruppe ist gezeigt worden, daß der zentrale, stark glykosylierte Abschnitt im Lumen der Vesikel vorliegt (Vega et al., 1991; Karakesisoglou et al. 1999). Dabei sind für LIMP-II aus der Ratte 11 potentielle N-Glykosylierungsstellen beschrieben (Vega et al., 1991). Im allgemeinen wird jedoch nur etwa ein Drittel aller möglichen Asn-X-Ser/Thr-Sequenzen in Proteinen auch tatsächlich glykosyliert (Kornfeld und Kornfeld, 1985). Die DdLmp-Proteine enthalten ebenfalls mehrere Glykosylierungsstellen. So sind für DdLmpA 19, für DdLmpB 9 und für DdLmpC 22 mögliche Stellen beschrieben (Karakesisoglou et al. 1999; Janssen et al., 2001). Glykosylierungen haben einen Einfluß auf das Laufverhalten der Proteine bei der elektrophoretischen Auftrennung im SDS-Gel. Dies erklärt, warum die erwarteten, berechneten Werte für DdLmpB bei 90 kDa und für DdLmpC bei 94 kDa liegen, die tatsächlichen Werte aber 100 kDa für DdLmpB und 120 kDa für DdLmpC betragen. Daß hierfür die Glykosylierung verantwortlich ist, konnte durch Deglykosylierungsexperimente nachgewiesen werden.

Die nachgewiesene Glykosylierung von DdLmpB und DdLmpC gab einen Hinweis darauf, daß auch bei diesen beiden Proteinen der zentrale Bereich extrazellulär oder im Lumen von Zellorganellen vorliegt. Um diese Annahme zu bestätigen, wurde eine analytische Protease-Behandlung durchgeführt. Da erst die Zugabe eines Detergenzes zur Zerstörung von

Membranstrukturen eine deutlich sichtbare Degradation beider Membranproteine durch die verwendeten Proteasen erlaubte, konnte diese These experimentell bestätigt werden.

Transmembrane Proteine werden in der Regel während der Synthese zunächst in die Membran des Endoplasmatischen Reticulums (ER) eingebaut, um anschließend über den Golgi-Apparat vesikulär zum Zielort transportiert zu werden. Über die kotranslationale Translokation von Peptidketten ins ER ist in *Dictyostelium* sehr wenig bekannt. Datenbankanalysen zeigten jedoch, daß es in *Dictyostelium* zu den sechs Proteinuntereinheiten des eukaryontischen SRP-Komplexes ("signal recognition particle") homologe Proteine gibt. Es ist bekannt, daß dieser SRP-Komplex, der zudem noch aus einer 7S-RNA besteht, während der Translation an eine hochdivergente hydrophobe Signalsequenz einer wachsenden Peptidkette bindet und dadurch den Translationsprozeß stoppt. Die Bindung von SRP an seinen ER-Membran gebundenen Rezeptor führt nachfolgend zur Interaktion des mitgeführten Ribosoms mit einem porenartigen, membrandurchdringenden Translokations-komplex. Der SRP-Komplex selbst dissoziiert von der Signalsequenz und dem Ribosom ab und erlaubt dadurch den Fortgang des Translationsprozesses (Keenan et al., 2001). Die wachsende Peptidkette wird nun entsprechend ihrer hydrophobe(n) Domäne(n) in die Membran eingebaut. Dabei gilt nach der "positive inside"-Regel (Von Heijne, 1986), daß bei einem Vergleich der "upstream"- und "downstream"-Region der ersten transmembranen Domäne die positivere zum Zytosol hin orientiert ist.

Es ist anzunehmen, daß dieser Mechanismus auf alle drei DdLmp-Proteine anwendbar ist. Dabei dient vermutlich die erste transmembrane Domäne auch als Erkennungsmotiv für SRP. Die davor liegende N-terminale Region von 6-17 Aminosäuren ist zu kurz und zu wenig hydrophob, um als zusätzliches Signalpeptid zu fungieren. Gegen eine oft in diesem Zusammenhang auftretende Abspaltung der Signalsequenz durch eine Signalpeptidase spricht die familientypische Insertion in der Membran.

4.1.2 Intrazelluläre Lokalisation von DdLmpB und DdLmpC

Um die Lokalisation von DdLmpB und DdLmpC zu klären, wurden vor allem diskontinuierliche Saccharose-Gradienten und Immunfluoreszenzuntersuchungen durchgeführt. Ähnlich wie für DdLmpA wies der Saccharose-Gradient nach, daß sowohl DdLmpB wie auch DdLmpC hauptsächlich in Fraktionen vertreten sind, die endosomale Vesikel und Postlysosomen enthalten (Buczynski et al., 1997). Für DdLmpA und DdLmpC konnte eine nahezu identische Verteilung festgestellt werden. DdLmpB zeigte eine leichte Verschiebung zu den dichteren Saccharose-Fraktionen, die dem Protein Golvesin entsprechen, einem Marker für das mittlere Endosom und dem Golgi (Schneider et al., 2000). Die Daten ließen

vermuten, daß DdLmpB offenbar an anderen endolysosomal Vesikeln als DdLmpA und DdLmpC lokalisiert ist.

4.1.2.1 Die Sortierungssignale der DdLmp-Proteine

Eine argumentative Unterstützung dieser Annahme findet sich bei der Betrachtung der Sortierungssignale. Zunächst läßt sich allgemein feststellen, daß DdLmpA und DdLmpC ein sogenanntes Tyrosin-basierendes Sortierungssignal aufweisen, während DdLmpB ein Di-Leucin-Motiv enthält. Beide Motive findet man generell bei Proteinen, die im endolysosomal Weg eine Rolle spielen (Sandoval et al., 2000; Eskelinen et al., 2003).

LIMP2 aus der Ratte weist ähnlich DdLmpB ein Di-Leucin-Signal auf. Ein erheblicher Unterschied besteht jedoch in der Länge der "upstream"-Region vom Di-Leucin-Signal bis zur transmembranen Domäne, die bei LIMP2 aus 16 Aminosäuren, bei DdLmpB jedoch nur aus 2 Aminosäuren besteht. Bekannt ist, daß LIMP2 direkt vom TGN zum späten Endosom/Lysosom transportiert wird. Dabei spielt der Adaptorkomplex-3 (AP-3) eine essentielle Rolle, der die Sequenzfolge (D/E)E(R/K)xPL(L/I) als generelles Bindemotiv benötigt (Rodionov et al., 2002). Vergleicht man diese Sequenz mit der von DdLmpB (DKIIDL), dann liegt die Vermutung nahe, daß AP-3 nicht an DdLmpB binden kann. Zum einen ist das Motiv in DdLmpB extrem kurz, zum anderen ist das Auftreten von zwei Isoleucinen bisher einzigartig. Insofern besteht hier noch Klärungsbedarf, ob es sich wirklich um ein Sortierungssignal handelt.

Obwohl DdLmpA und DdLmpC untereinander ähnliche Signalmotive aufweisen, ist ein bemerkenswerter Unterschied zwischen beiden festzustellen. Ohno et al., (1998) und Aguilar et al., (2001) untersuchten die Signalbindungsspezifität der einzelnen mittleren Untereinheiten $\mu 1$ – $\mu 4$ der bisher bekannten Adaptorkomplexe zum Tyrosin-Sortierungssignal. Im Fall von DdLmpA und DdLmpC läßt sich zum einen festhalten, daß DdLmpA vermutlich mit AP-3 interagiert und somit vom TGN zum Endolysosom transportiert wird. Für DdLmpC hingegen läßt sich keine zuverlässige Aussage treffen, da das vorhandene Tyrosin-Sortierungssignal wenig spezifisch für ein Adaptorkomplex zu sein scheint.

Über Adaptorkomplexe und Adaptor-ähnliche Proteine ist in *Dictyostelium* bisher sehr wenig bekannt. Temesvari et al., (1996) und de Chasse et al., (2001) konnten die homologen Proteine Apm1-Apm4 als $\mu 1$ – $\mu 4$ Untereinheiten identifizieren. Es ist also anzunehmen, daß alle vier Adaptorkomplexe in *Dictyostelium* vorkommen. Darüber hinaus ist bisher nichts bekannt.

Zusammengefaßt lassen die Sortierungssignale der DdLmp-Homologen darauf schließen, daß alle drei Proteine durch verschiedene Vesikelpopulationen ins Endolysosom gelangen.

4.1.2.2 Die DdLmp-Proteine und die Makropinozytose

Immunfluoreszenzuntersuchungen ergaben für DdLmpB und DdLmpC eine Lokalisation an vesikulären Strukturen unterschiedlicher Größe. Der überragende Teil beider Proteine konnte an kleinen punktförmigen Strukturen (bis 0.5 μm) detektiert werden. Daneben wurden aber auch Vesikel markiert, die eine Größe von bis zu 2 μm aufwiesen und an Makropinosomen erinnern. Untersuchungen am konfokalen Mikroskop bestätigten diese Beobachtungen.

Viele eukaryontische Zellen haben die Fähigkeit, Flüssigkeit (Pinozytose) und Partikel (Phagozytose) aus der Umwelt aufzunehmen. Unter Makropinosomen versteht man Vesikel mit extrazellulärer Flüssigkeit, die eine Größe von 0.2-2 μm aufweisen und in einem Aktin-abhängigen, jedoch Clathrin-unabhängigen Prozeß entstehen (Hacker et al., 1997). Diese Makropinosomen sind z.B. bei dendritischen Zellen und bei *Dictyostelium* bekannt. Durch Makropinozytose internalisieren dendritische Zellen unter anderem Antikörper-gebundene Antigene (Sallusto et al., 1995). In axenischen *Dictyostelium*-Zellen stellt die Makropinozytose den Hauptweg der Nahrungsaufnahme dar. Daher führt eine Beeinträchtigung der Makropinozytose zu einer Beeinträchtigung des Wachstums (Hacker et al., 1997).

TRITC-Dextran ist ein Marker für die Makropinozytose. Immunfluoreszenzuntersuchungen in *D. discoideum* zeigten, daß ein großer Teil der TRITC-Dextran-positiven Vesikel auch DdLmpA-positiv sind. Die Inaktivierung des *DdLmpA*-Genes in Wildtyp-Zellen führt zur Reduzierung der Makropinozytoserate auf 25% des ursprünglichen Wertes, was eine Beeinträchtigung des Wachstums in einer Schüttelkultur zur Folge hat. Der Prozeß Phagozytose bleibt jedoch unbeeinflusst (Temesvari et al., 2000). Die Exozytose hingegen ist in der DdLmpA-Mutante behindert.

Für DdLmpB und DdLmpC konnten ebenfalls, jedoch in einem deutlich geringeren Umfang, Kolokalisationen mit TRITC-Dextran-positiven Vesikeln nachgewiesen werden. Dennoch blieb die Wachstumsrate für axenische DdLmpB⁻-Zellen im Vergleich zum Wildtyp unverändert. Eine mögliche Kompensation des Fehlens von DdLmpB durch eine verstärkte Expression von DdLmpA und/oder DdLmpC kann ausgeschlossen werden (mündliche Mitteilung von A. Vogel). Studien zeigten weiterhin, daß auch axenische DdLmpA⁻-Zellen DdLmpB und DdLmpC nicht verstärkt exprimieren. Diese Beobachtungen zusammengefasst sprechen dafür, daß DdLmpB zumindest keine entscheidende Rolle bei der Makropinozytose spielt. Dennoch kann nicht ausgeschlossen werden, daß entweder familienfremde Proteine oder DdLmpA/DdLmpC (z.B. durch eine veränderte Lokalisation) das Fehlen von DdLmpB bei der Makropinozytose kompensieren. Über eine mögliche Rolle von DdLmpC bei der Makropinozytose kann momentan keine Aussage getroffen werden.

4.1.2.3 Die Rolle von $PI(4,5)P_2$ und $PI(3,4,5)P_3$ bei der Makropinozytose

Im Gegensatz zu DdLmpB und DdLmpC weist DdLmpA eine PIP_2 -Bindestelle am C-Terminus auf, für die eine direkte Interaktion mit $PI(4,5)P_2$ und $PI(4)P$ nachgewiesen werden konnte (Karakesi-soglou et al., 1999). In einem Model von Cardelli (2001) zur Phagozytose und Makropinozytose spielt $PI(4,5)P_2$ eine zentrale Rolle (Abb. 28).

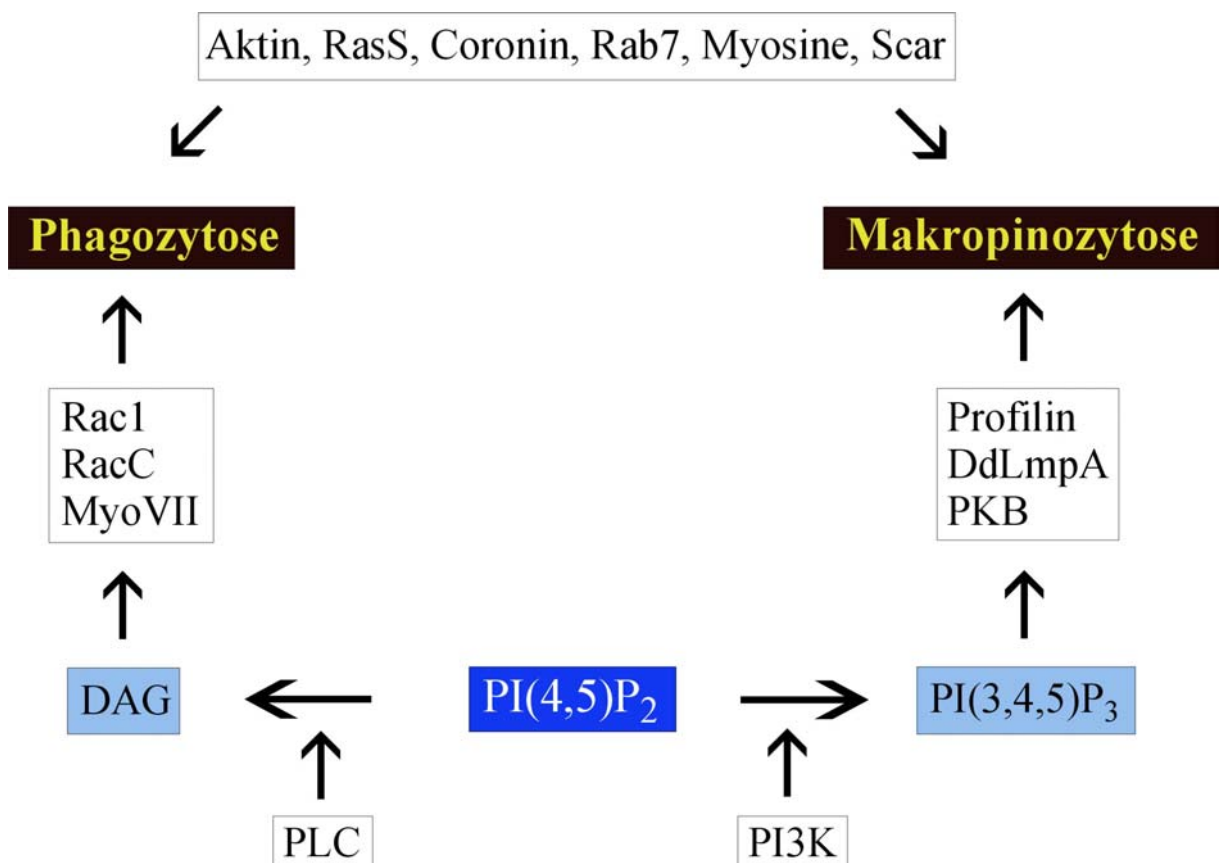


Abb. 28: Verschiedene biochemische Mechanismen regulieren die Makropinozytose und Phagozytose in *Dictyostelium* (nach Cardelli, 2001)

Dieses Model geht davon aus, daß Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP_2) in der Regulation der Phagozytose und der Makropinozytose eine zentrale Rolle einnimmt. Die Phospholipase C (PLC) katalysiert die Spaltung von PIP_2 in Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP_3) und Diacylglycerol (DAG). Dies kann zur Aktivierung von Rap1 und zum Anstieg der Ca^{2+} -Konzentration führen. Es findet die Initiierung der Phagozytose statt. Phosphoinositid-3-kinasen (PI3K), Profilin und DdLmpA (?) katalysieren die Bildung von Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat (PIP_3). Dieses Phosphoinositid reichert sich an makropinosomalen "cups" an, führt zur Rekrutierung weiterer Proteine und induziert dadurch die Makropinozytose. Aktin, RasS, Coronin, Rab7, Myosine und Scar sind Zytoskelettproteine, die an beiden Endozytosewegen beteiligt sind.

Die Phospholipase C spaltet $PI(4,5)P_2$ in Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP_3) und Diacylglycerol (DAG). DAG spielt bei der Phagozytose eine wichtige Rolle. PIP_2 kann durch Phosphoinositid-3-kinasen in $PI(3,4,5)P_3$ umgewandelt werden. In *D. discoideum* gibt es 3 Phosphoinositid-3-kinasen, die Homologien zur 110 kDa PI-3-Kinase von Säugetieren

aufweisen. Eine Inaktivierung von *Ddpik1* und *Ddpik2* führt unter anderen zu Defekten in der Makropinozytose (Rupper et al., 2001). Eine Interaktion von Profilin mit Phosphoinositid-3-kinasen führt zur Aktivierung der Kinase (Singh et al., 1996). Das gebildete Substrat PI(3,4,5)P₃ reichert sich an den makropinozytotischen "cups" an. Diese Anreicherung ist eine Voraussetzung dafür, daß sich im laufenden Prozeß Vesikel von der Zellmembran abschnüren können. Für die Bildung der makropinozytotischen "cups" selbst, die sehr F-Aktin reich sind, sind weder PI(3,4,5)P₃, noch DdPIK1/DdPIK2, noch deren Effektor Proteinkinase B (PKB) notwendig (Rupper et al., 2001).

An den gebildeten Makropinosomen sind während der ersten 30-60 Sekunden Aktin, Coronin und PKB, nach > 60 Sekunden DdLmpA, Rab7 und die Protonenpumpe V-ATPase nachweisbar. Bisher ist nichts über die Regulation dieses koordinierten Austausches bekannt. Da hierfür Vesikelfusionen notwendig sind, ist gut möglich, daß auch bei diesem Prozeß PI(4,5)P₂ und PI(3,4,5)P₃, sowie entsprechende Binde-Proteine (wie z.B. DdLmpA) eine Rolle spielen. Zudem könnte die Interaktion von DdLmpA mit PIP₂ für den Vorgang der Endosomenreifung wichtig sein. Daß eine Störung des Reifeprozesses zu drastischen Beeinträchtigungen der Endozytose führt, konnte an der Expression der dominant-negativen Form Rab7T22N nachgewiesen werden (Buczynski et al., 1997).

4.1.2.4 Die DdLmp-Proteine und die Endosomenreifung

Die Endosomenreifung ist ein sehr dynamischer Prozeß. Ein von der Zellmembran abgeschnürtes frühes Endosom ist von einem Geflecht aus F-Aktin, Coronin und anderen aktinbindenden Proteinen, sowie GTPasen umgeben, das sich jedoch innerhalb einer Minute auflöst (Maniak et al., 1995). Bis zu diesem Zeitpunkt besitzt das Endosom einen neutralen pH-Wert. Durch die Entfernung der Hülle ist das Endosom fusionsbereit mit anderen Vesikeln. Innerhalb weniger Sekunden findet nun eine Ansäuerung durch die herbeigeführte vakuoläre H⁺-ATPase statt (Clarke et al., 2002). Interessanterweise konnte Gotthardt et al. (2002) anhand gereinigter Phagosomen zeigen, daß DdLmpB in einem sehr frühen Stadium am Phagosom nachweisbar ist. Einer möglichen Spekulation, daß DdLmpB schon an der Zellmembran sitzt, widersprechen die Daten von Immunfluoreszenzen. Mit zunehmender Phagosomenreifung wird immer weniger DdLmpB nachweisbar. Ob dies die Folge einer Degradation oder einer Rezyklierung ist, bleibt noch zu klären. Andere Vesikelpopulationen, die unter anderem DdLmpA und DdLmpC enthalten, fusionieren nun mit dem mittlerem/spätem Endosom und bleiben bis zum Lysosom nachweisbar mit ihm verbunden. Beide Proteine zeigen hierbei eine ähnliche Verteilung wie sie für die Hydrolase CathepsinD beobachtet wurde. Mit zunehmender Neutralisierung der Lysosomen infolge der Entfernung

der vakuolären H⁺-ATPase schwindet die Nachweisbarkeit beider Proteine (Gotthardt et al., 2002). Das Endosomensystem von *D. discoideum* ist kein "dead-end"-System, sondern die Lysosomen fusionieren am Ende des Reifeprozesses wieder mit der Zellmembran. Immunfluoreszenzen konnten keine Lokalisation von DdLmpA und DdLmpC an der Zellmembran nachweisen. Dies spricht dafür, daß beide Proteine entweder vorher degradiert oder rezykliert werden.

4.1.3 Die Entwicklungsregulation der DdLmp-Proteine

Bei Nahrungsmangel beginnt die Amöbe *D. discoideum* einen Entwicklungszyklus, bei dem die DdLmp-Isoformen unterschiedlich reguliert werden. Es konnte gezeigt werden, daß auf der einen Seite zwar das Transkript des *DdlmpA* durchgehend und zu gleichen Mengen gebildet wird, daß das Protein dennoch ab der frühen Aggregationsphase kaum noch in der Zelle nachweisbar ist. DdLmpA unterliegt somit einer posttranskriptionellen Regulation. Um über den Charakter der Regulation mehr aussagen zu können, sind weitere Untersuchungen nötig.

Für *DdlmpB* konnte hingegen ab der frühen Entwicklungsphase keine Expression festgestellt werden. Überraschenderweise wird das Transkript allerdings in der späten Entwicklungsphase wieder gebildet und übersteigt quantitativ deutlich den Ausgangslevel. Auf Proteinebene dagegen ist DdLmpB im gesamten Zyklus nachweisbar. Daß in der Abwesenheit des Transkriptes dennoch Protein nachweisbar ist, läßt auf eine hohe Stabilität des Proteins über Stunden schließen. Obwohl mehr Transkript von *DdlmpB* in der späten Entwicklungsphase nachgewiesen wurde, ist jedoch keine verstärkte Bildung des Proteins nachweisbar.

Obwohl *DdlmpC* konstitutiv exprimiert wird, scheint es so zu sein, daß mit fortschreitender Entwicklung mehr Transkript gebildet wird. Der Proteinlevel bleibt jedoch gleich. Es läßt sich dennoch festhalten, daß der Antikörper von DdLmpC ab der späten Kulminationsphase mehrere, fast gleich große, Banden detektiert. Entweder kreuzreagiert der Antikörper mit erst in dieser Entwicklungsphase gebildeten Proteinen, oder DdLmpC tritt nun in verschiedenen Subpopulationen auf, die unterschiedliche Modifikationen (z.B. ein unterschiedlicher Grad an Glykosylierung) widerspiegeln.

Da sowohl DdLmpB als auch DdLmpC im gesamten Zyklus nachweisbar sind, läßt dies die Spekulation zu, daß diese Proteine nicht nur bei der Endozytose eine Rolle spielen. Sehr nahe liegt da zumindest für DdLmpC die Möglichkeit einer Beteiligung an dem erst kürzlich auch für *D. discoideum* beschriebenen Prozeß der Makroautophagozytose (Otto et al., 2003). Dies erinnert ein wenig an die Lamp-Proteine der Maus. Für diese Proteine ist eine Rolle am Lysosomen und am Autophagosomen beschrieben (Eskelinen et al., 2002).

4.2 Biochemische Charakterisierung der Interaktion zwischen

YopO und Aktin

Im zweiten Teil der Arbeit wurde die beschriebene Interaktion zwischen YopO und Aktin biochemisch genauer untersucht. Es konnte festgestellt werden, daß G-Aktin und nicht F-Aktin für die Aktivierung der YopO-Kinase verantwortlich ist. Nichtmuskel-Aktin ist im Vergleich zum Muskel-Aktin ein deutlich besserer Aktivator von YopO. Obwohl die aktivierte Kinase *in vivo* das Aktin-Zytoskelett beeinflusst, ist Aktin *in vitro* kein Substrat von YopO. Mittels Fluoreszenzspektroskopie konnte gezeigt werden, daß sowohl die aktive Kinase als auch die inaktive Kinase YopO K269A die Polymerisierung von Aktin behindern. Für eine mutmaßliche Aktin-Binderegion von 20 Aminosäuren am C-terminalen Ende konnte kein Effekt beobachtet werden. Desweiteren wurde der Einfluß von aktinbindenden Proteinen, aktinmodifizierenden Substanzen und YopO-bindenden GTPasen auf die Aktivierung der Kinase durch Aktin untersucht.

4.2.1 Bindung und Aktivierung der Kinase YopO durch Aktin

Unabhängig voneinander konnten Dukuzumuremyi et al. (2000) und Juris et al. (2000) nachweisen, daß die translozierte Kinase YopO zunächst inaktiv ist und daß Faktoren der Wirtszelle für die Aktivierung der Kinase notwendig sind. Nach derzeitigem Kenntnisstand geht man von zwei verschiedenen Aktivatoren aus. Zum einen ist im Serum ein bisher nicht bestimmter, hitzesensitiver Faktor enthalten, der die Kinase konzentrationsabhängig zur Autophosphorylierung stimuliert; dem Faktor konnte eine Größe von 100-300 kDa zugewiesen werden (Dukuzumuremyi et al., 2000). Zum zweiten wurde Aktin als der gesuchte intrazelluläre Aktivator identifiziert (Juris et al., 2000).

In der vorliegenden Arbeit konnte in Kosedimentationsexperimenten keine stabile Interaktion zwischen Aktin und YopO nachgewiesen werden. Dagegen gaben Emissionsspektren Hinweise darauf, daß zumindest eine schwache und kurzzeitige Interaktion der nicht-aktivierten Kinase YopO mit G-Aktin stattfindet. Da der Puffer im Kosedimentationsexperiment, der zur Polymerisierung des Aktins verwendet wurde, Mg^{2+} und ATP enthält, lagen Bedingungen vor, die eine Aktivierung der Kinase durch Autophosphorylierung erlaubten, wofür auch die auftretende unscharfe Bande von YopO spricht. Nachfolgende Kinase-Assays konnten zeigen, daß nur G-Aktin für die Stimulierung der Aktivierung verantwortlich ist. Dies widerspricht der Annahme von Juris et al. (2000), der sowohl G-Aktin als auch F-Aktin als Stimulatoren vermutete. Überraschenderweise wurde die Kinase-"dead"-Mutante YopO-K269A zum Teil mit F-Aktin kosedimentiert. Dies kann bedeuten, daß die

inaktive Kinase sowohl mit F-Aktin wie auch mit G-Aktin interagieren kann und die Kinase nach ihrer Aktivierung die Fähigkeit der Bindung an F-Aktin verliert. Eine andere Möglichkeit ist, daß die inaktive Kinase zusammen mit G-Aktin Aggregate bildet, die bei 50.000 g zum Teil pelletiert werden können. Dabei könnte der Komplex aus mehreren Molekülen der nicht-aktivierten Kinase und aus monomerem bzw. oligomerem Aktin bestehen.

Die letzten 20 Aminosäuren von YopO zeigen Homologien zu Coronin, einem F-Aktin-bindenden Protein. Eine Deletion dieser 20 Aminosäuren hatte *in vivo* zur Folge, daß das Zytoskelett der mit YopO- Δ 710-infizierten Zelle unbeeinflusst blieb (Juris et al., 2000). Deshalb wurde postuliert, daß diese Region für die Aktinbindung verantwortlich ist. Die Kinasedomäne ist hingegen am N-Terminus lokalisiert (Galyov et al., 1993). Vorstellbar wäre ein Modell, bei dem der N- und C-Terminus der inaktiven Kinase dicht beeinander liegen. Diese räumliche Anordnung könnte verhindern, daß die Kinase sich selbst phosphorylieren und somit aktivieren kann. Die Aktinbindung verursacht vermutlich eine Konformationsänderung im Molekül, die zur Folge hat, daß die bis dahin blockierte Kinasedomäne frei liegt. Dadurch kann die Autophosphorylierung erfolgen, die zur Aktivierung der Kinase führt. Würde dieses Modell stimmen, dann müsste eine Deletion der letzten 20 Aminosäuren zu einer konstitutiven Aktivierung führen. In den durchgeführten Kinase-Assays konnte jedoch niemals eine Phosphorylierung dieser Deletionsmutante (YopO- Δ 710) beobachtet werden. Da Galyov et al. (1993) nachgewiesen haben, daß die Autophosphorylierung der Kinase nur an Serin-Resten erfolgt, kann ausgeschlossen werden, daß durch die Deletion der letzten 20 Aminosäuren eine Phosphorylierungsstelle entfernt wurde. Daraus kann geschlossen werden, daß die Entfernung der Coronin-homologen Region nicht ausreichend ist, um die Kinase zu aktivieren.

Einen Hinweis darauf, daß die letzten 20 Aminosäuren von YopO nicht direkt an der Aktinbindung beteiligt sind, findet man bei einer vor kurzem veröffentlichten Untersuchung über Coronin3. Spoerl et al. (2002) wiesen nach, daß der C-terminale Bereich, mit dem YopO Homologien aufweist, weniger für die Bindung an F-Aktin als für eine Trimerisierung von Coronin3 wichtig ist. Erst durch die Trimerisierung des Proteins wird demzufolge eine stabile Interaktion mit F-Aktin ermöglicht.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lassen vermuten, daß die Homologien zwischen Coronin und dem C-Terminus von YopO in der Literatur überinterpretiert werden. So konnte bei einer gleichzeitigen Inkubation der Deletionsmutanten mit dem Wildtyp in Gegenwart von G-Aktin festgestellt werden, daß mit steigender Konzentration von YopO- Δ 710 bei

gleichbleibender Konzentration des Wildtyps YopO eine deutliche Abnahme der Autophosphorylierung der Kinase erfolgte. Dies deutet darauf hin, daß trotz der Deletion der letzten 20 Aminosäuren eine Dimerisierung oder Oligomerisierung der YopO-Konstrukte stattfand. Durch die Verwendung einer steigenden Konzentration von YopO- Δ 710 wurde die Wahrscheinlichkeit einer YopO-YopO-Dimerisierung/Oligomerisierung herunter-, und die einer YopO-YopO- Δ 710-Dimerisierung/Oligomerisierung heraufgesetzt. Würde eine Dimerisierung/Oligomerisierung der YopO-Konstrukte nicht stattfinden, dann müßte trotz der steigenden Konzentration der Deletionsmutanten das Phosphorylierungssignal des Wildtyps unbeeinflusst bleiben.

Da auch mit der Kinase-"dead"-Mutante und dem Wildtyp keine Reduzierung des Phosphorylierungssignals von YopO festgestellt werden konnte, läßt sich die Wichtigkeit der deletierten Sequenz für die Aktivierung der Kinase ableiten. Ferner zeigt sich aber auch, daß trotz der Dimerisierung/Oligomerisierung die Autophosphorylierung *in cis* erfolgt. Allerdings kann nicht ausgeschlossen werden, daß nach einer ersten essentiellen *cis*-Autophosphorylierung weitere Serine *trans*-phosphoryliert werden. Aufgrund der Homologien geht man davon aus, daß YopO von der kodierenden Sequenz einer eukaryontischen Ser/Thr-Kinase abstammt (Galyov et al.,1993). Obwohl viele eukaryontische Kinasen dimerisieren und sich *cis*- und *trans*-autophosphorylieren, konnte in der Literatur kein Beispiel für eine ausschließliche *cis*-Phosphorylierung bei einer nicht-monomeren Kinase gefunden werden. Zusammenfassend läßt sich sagen, daß für die Aktivierung der Kinase zwei Dinge essentiell sind: a) die Dimerisierung/Oligomerisierung von YopO; b) jede Untereinheit des Dimers/Oligomers bindet ein Aktin-Molekül.

4.2.2 Der Einfluß von YopO auf die Aktin-Polymerisierung

Etwas widersprüchlich waren die Aussagen von Juris et al. (2000) und Dukuzumuremyi et al. (2000) bezüglich des Einflusses von YopO auf das Aktin-Zytoskelett *in vivo*. Der wesentliche Unterschied lag in der Beschreibung des induzierten Phänotyps der Wirtszelle durch die mutierte Kinase. Dukuzumuremyi et al. (2000) stellten keinen Unterschied zum durch die aktive Kinase hervorgerufenen Phänotyps fest. Für Juris et al. (2000) hingegen ist der Einfluß der mutierten Kinase auf das Zytoskelett der Wirtszelle im Vergleich zum Wildtyp weniger dramatisch.

Um den Einfluß der Kinase auf den Verlauf einer Aktinpolymerisierung *in vitro* zu studieren, wurden Fluoreszenzspektroskopieuntersuchungen durchgeführt. Es zeigte sich, daß sowohl der Wildtyp YopO wie auch die inaktive Kinase YopO-K269A einen hemmenden Einfluß auf

die Polymerisierung des Aktins besitzen. Dabei fällt der Effekt des Wildtyps deutlich drastischer aus. Die nur langsame Polymerisierung des Aktins in Gegenwart von YopO läßt vermuten, daß die Kinase auch nach ihrer Aktivierung mit Aktin verbunden bleibt und dadurch eine sterische Blockade zum Einbau des Monomers bildet. Für YopO stehen mit fortschreitender Polymerisierung immer weniger G-Aktin-Moleküle als Interaktionspartner zur Verfügung. Dadurch steigt die Wahrscheinlichkeit einer Interaktion zwischen der Kinase und den restlich vorhandenen G-Aktin-Molekülen und behindert damit die Polymerisierung. Für die "dead"-Kinase steigt die Wahrscheinlichkeit einer Interaktion mit G-Aktin weniger stark, da sie sowohl mit G-Aktin wie auch mit F-Aktin interagieren kann, wie im Kosedimentationsexperiment gezeigt wurde. Deshalb fällt die Behinderung der Polymerisierung, durch die Bindung an G-Aktin, weniger gravierend aus.

4.2.3 Der Einfluß aktinbindender Proteine und Substanzen auf die Aktivierung der Kinase YopO durch Aktin

Es stellte sich die Frage, inwieweit ein G-Aktin bindendes Protein wie Profilin I in der Lage ist, die Aktivierung der YopO-Kinase durch G-Aktin zu behindern. Durchgeführte Untersuchungen konnten jedoch auch im 2-fachen Überschuß zu G-Aktin keine negative Beeinflussung feststellen. Von Profilin I ist bekannt, daß es an die Subdomänen 1 und 3 von Aktin bindet (Schutt et al., 1993). Unter anderem katalysiert Profilin den ADP/ATP-Austausch am monomeren Aktin. Diese ADP/ATP-Bindestelle liegt entgegengesetzt zur Profilin-Bindestelle. Da die Bindung von Profilin I an G-Aktin offenbar keinen Einfluß auf die Aktivierung von YopO durch G-Aktin hat, wäre es denkbar, daß YopO an den Subdomänen 2 und 4 bindet. Dadurch wäre die ADP/ATP-Bindestelle blockiert und die Polymerisierung von Aktin wäre behindert. Alternativ könnte man spekulieren, daß die Bindungsaffinität von G-Aktin zu YopO größer ist als die zwischen G-Aktin und Profilin I.

Um die Beobachtung zu unterstreichen, daß nur G-Aktin als Aktivator der Kinase YopO in Frage kommt, wurden Kinase-Assays in Gegenwart der Substanzen Phalloidin und Cytochalasin D durchgeführt. Obwohl Cytochalasin D meist für eine Stabilisierung von G-Aktin *in vitro* verwendet wird, kann durch ein 1:1-Verhältnis (Cytochalasin D : G-Aktin) der gegenteilige Effekt erreicht werden. Die Förderung der Bildung von Aktin-Dimeren und -Trimeren führt zur verstärkten F-Aktin-Bildung (Cooper, 1987). Es konnte gezeigt werden, daß die 1:1-Zugabe von Cytochalasin D zu G-Aktin und YopO die Aktivierung der Kinase deutlich behindert. Obwohl eine *in vitro* Polymerisierung des Aktins nicht dazu führt, daß sämtliches G-Aktin filamentiert, kann das Heptapeptid Phalloidin verwendet werden, um das Gleichgewicht weiter zu Gunsten von F-Aktin zu verschieben. Die Zugabe von Phalloidin zu

F-Aktin und YopO hatte die Aufhebung des ohnehin schwachen Phosphorylierungssignals der Kinase zur Folge. Es muß jedoch darauf hingewiesen werden, daß Phalloidin in der Nähe der ADP/ATP-Bindestelle an F-Aktin bindet (Cooper, 1987). Bezugnehmend auf die bei Profilin angeführte Spekulation könnte somit auch eine Behinderung der YopO-Bindung an F-Aktin vorliegen.

Dennoch wurden Anhaltspunkte gefunden, die auch F-Aktin unter bestimmten Voraussetzungen erlauben, YopO zu aktivieren. Cortexillin I ist ein aktinbindendes Protein, welches in der Lage ist, Filamentstränge des Aktins antiparallel querzuzernetzen und dadurch zu bündeln (Faix et al., 1996). Dabei bindet ein Cortexillin-Dimer im Abstand von 3-4 Aktinuntereinheiten. Interessanterweise hatte die Zugabe von Cortexillin I zu F-Aktin eine stimulierende Wirkung auf die Aktivierung der Kinase. Vermutlich führt die Quervernetzung des Aktins durch Cortexillin I zu einer geringen räumlichen Verdrehung der gebundenen Aktinuntereinheiten. Dies könnte dann eine Bindung von YopO an diesen Untereinheiten erlauben. Dennoch konnte nicht die gleiche Intensität des Phosphorylierungssignales detektiert werden wie es für das monomere Aktin der Fall war. Dies könnte bedeuten, daß an F-Aktin gebundenes YopO nicht den gleichen Phosphorylierungsgrad aufweist. Zudem kann keine Aussage darüber getroffen werden, ob YopO in Gegenwart von Cortexillin I an F-Aktin mit der gleichen Stärke bindet wie an G-Aktin.

4.2.4 YopO, Aktin und die basischen Substrate

Trotz intensiver Suche konnte bisher kein eukaryontisches Zielprotein der aktivierten Kinase ausfindig gemacht werden. Dennoch hat man festgestellt, daß die durch HeLa-Zellextrakt aktivierte Ser/Thr-Kinase YopO eine Affinität zu basischen Substraten besitzt und sie phosphorylieren kann. MBP und Histon-TypIII sind als Substrate besonders geeignet (Juris et al., 2000). Basische Substrate scheinen aber auch z.T. einen modifizierenden Einfluß auf F-Aktin zu besitzen. Im Kinase-Assay konnte gezeigt werden, daß MBP wie erwartet in Gegenwart von G-Aktin phosphoryliert wird. Auch Casein, ein nicht so gutes Substrat der Kinase, wurde phosphoryliert. Überraschenderweise war jedoch das Ergebnis für Histon-TypIII negativ. Alle drei Substrate waren hingegen ähnlich wie Cortexillin I in der Lage, F-Aktin so zu beeinflussen, daß YopO binden und aktiviert werden konnte. Ein additiver Effekt durch die zusätzliche Zugabe von Cortexillin I konnte bei Histon-TypIII und Casein beobachtet werden. Erwähnenswert ist die bei Histon-TypIII und Casein beobachtete schwache Phosphorylierung von Aktin durch YopO. Dies deutet darauf hin, daß die Interaktion von YopO mit F-Aktin die Folge einer veränderten Konformation des Aktins widerspiegelt. Unklar bleibt, ob diese Phosphorylierung von Aktin als ein Artefakt zu

begreifen ist. Unter keinen anderen Bedingungen konnte eine Phosphorylierung von Aktin beobachtet werden. Bemerkenswert ist, daß auch schon Juris et al. (2000) Hinweise darauf fanden, daß Aktin durch die Kinase phosphoryliert wird. Wäre dies tatsächlich der Fall, würde es bedeuten, daß YopO auf mindestens zwei Wegen Einfluß auf das Aktin-Zytoskelett nimmt: zum einen, indem es G-Aktin bindet, und zum anderen, daß die aktivierte Kinase durch Phosphorylierung des Aktins modifizierend wirkt und eventuell so die Stabilität der Filamente beeinflusst.

4.2.5 YopO, Aktin und die GTPasen

Vieles spricht dafür, daß YopO noch über einen weiteren Weg Einfluß nimmt auf das Aktin-Zytoskelett. Neben dem Coronin-homologen Bereich, der für die Aktinbindung verantwortlich sein könnte, wurde am C-Terminus der Kinase eine Rho-GTPase-Bindedomäne beschrieben. Rho-GTPasen spielen eine zentrale regulatorische Rolle bei Prozessen, in denen das Aktin-Zytoskelett beteiligt ist. Dies schließt Prozesse wie Phagozytose und die Expression pro-inflammatorischer Cytokine mit ein.

Dukuzumuremyi et al. (2000) konnten nachweisen, daß an diese Bindedomäne von YopO Rac und RhoA, aber nicht CDC42 binden können. Obwohl sowohl die GTP- wie auch die GDP-gebundene Form mit YopO interagieren kann, scheint RhoA-GDP eine gering höhere Bindungsaffinität zur Kinase zu besitzen. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß die Bindung der GTPasen an YopO bis auf eine Ausnahme keinen Einfluß auf die Aktivierung der Kinase durch Aktin besitzen. Die beobachtete Ausnahme RhoA-GDP in Gegenwart von Muskel-Aktin ist interessant, weil sie die stärkste GTPase-Bindung an YopO darstellt. Wenn eine stärkere GTPase-Bindung an YopO zu einer Beeinträchtigung der Aktivierung der Autophosphorylierung durch Aktin führt, liegen vermutlich sterische Ursachen vor. In diesem Zusammenhang muß darauf verwiesen werden, daß die Aktivierung der Kinase durch Nichtmuskel-Aktin in Gegenwart von RhoA-GDP nicht beeinflusst war.

Nichtmuskel-Aktin, sowohl aus *Dictyostelium* wie auch aus Blutplättchen, ist ein 10-fach besserer Aktivator im Vergleich zum Muskel-Aktin. Da *Yersinien* Nichtmuskel-Zellen befallen, ist dieses Resultat wichtig. Aufgrund der hohen Konservierung der Aminosäuresequenz ist Muskel-Aktin in der Lage, mit YopO zu interagieren und die Kinase zu aktivieren. Daß diese Interaktion allerdings nicht optimal ist, ist unter anderem auch bei der Zugabe von RhoA-GDP zu beobachten. Diese Beobachtung spricht auch eher gegen die Möglichkeit, daß sich zwischen YopO, G-Aktin und GTPase ein Tertiärkomplex bildet. Vermutlich führt die Bindung von G-Aktin an YopO zu einer Konformationsänderung, die die Ablösung einer schwächer gebundenen GTPase zur Folge hat.

5 Literaturverzeichnis

- Adachi, H., Hasebe, T., Yoshinaga, K., Otha, T. und Sutoh, K. (1994). Isolation of *Dictyostelium discoideum* cytokinesis mutants by restriction enzyme-mediated integration of the blasticidin S resistance marker. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **205**:1808-1814.
- Aepfelbacher, M. und Heesemann, J. (2001). Modulation of Rho GTPases and the actin cytoskeleton by *Yersinia* outer proteins (Yops). *Int. J. Med. Microbiol.* **291**:269-276.
- Aguilar, R.C., Boehm, M., Gorshkova, I., Crouch, R.J., Tomita, K., Saito, T., Ohno, H. und Bonifacino, J.S. (2001). Signal-binding specificity of the mu4 subunit of the adaptor protein complex AP-4. *J. Biol. Chem.* **276**:13145-13152.
- Barz, C., Abahji, T.N., Trulzsch, K. und Heesemann, J. (2000). The *Yersinia* Ser/Thr protein kinase YpkA/YopO directly interacts with the small GTPases RhoA and Rac-1. *FEBS Lett.* **482**:139-143.
- Black, D.S. und Bliska, J.B. (2000). The RhoGAP activity of the *Yersinia pseudotuberculosis* cytotoxin YopE is required for antiphagocytic function and virulence. *Mol. Microbiol.* **37**:515-527.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye-binding. *Anal. Biochem.* **72**:248-254.
- Buttner, D. und Bonas, U. (2002). Port of entry - the type III secretion translocon. *Trends Microbiol.* **10**:186-192.
- Buczynski, G., Grove, B., Nomura, A., Kleve, M., Bush, J., Firtel, R.A. und Cardelli, J. (1997). Inactivation of two *Dictyostelium discoideum* genes, DdPIK1 and DdPIK2, encoding proteins related to mammalian phosphatidylinositol 3-kinases, results in defects in endocytosis, lysosome to postlysosome transport, and actin cytoskeleton organization. *J. Cell Biol.* **136**:1271-1286.
- Claviez, M., Pagh, K., Maruta, H., Baltés, W., Fisher, P. und Gerisch, G. (1982). Electron microscopic mapping of monoclonal antibodies on the tail region of *Dictyostelium* myosin. *EMBO J.* **1**:1017-1022.
- Cooper, J.A., Walker, S.B. und Pollard, T.D. (1983). Pyrene actin: documentation of the validity of a sensitive assay for actin polymerization. *J. Muscle Res. Cell Motil.* **4**:253-262.
- Cooper, J.A. (1987). Effects of cytochalasin and phalloidin on actin. *J. Cell Biol.* **105**:1473-1478.

- Cornelis, G.R. und Wolf-Watz, H. (1997). The *Yersinia* Yop virulon: a bacterial system for subverting eucaryotic cells. *Mol. Microbiol.* **23**:861-867.
- Cornelis GR. (2002). *Yersinia* type III secretion: send in the effectors. *J. Cell Biol.* **158**:401-408.
- Cornelis GR. (2002). The *Yersinia* Ysc-Yop 'Type III' weaponry. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **3**:742-754.
- Cosson, P., Zulianello, L., Join-Lambert, O., Faurisson, F., Gebbie, L., Benghezal, M., Van Delden, C., Curty, L.K. und Kohler, T. (2002). *Pseudomonas aeruginosa* virulence analyzed in a *Dictyostelium discoideum* host system. *J. Bacteriol.* **184**:3027-3033.
- Crombie, R. und Silverstein, R. (1998). Lysosomal integral membrane protein II binds thrombospondin-1. Structure-function homology with the cell adhesion molecule CD36 defines a conserved recognition motif. *J. Biol. Chem.* **273**:4855-4863.
- de Chasse, B., Dubois, A., Lefkir, Y. und Letourneur, F. (2001). Identification of clathrin-adaptor medium chains in *Dictyostelium discoideum*: differential expression during development. *Gene* **262**:115-122.
- DeLozanne, A. und Spudich, J.A. (1987). Disruption of the *Dictyostelium* myosin heavy chain gene by homologous recombination. *Science.* **236**:1086-1091.
- Denecker, G., Totemeyer, S., Mota, L.J., Troisfontaine, P., Lambermont, I., Youta, C., Ackermann, M. und Cornelis, G.R. (2002). Effect of low- and high-virulence *Yersinia enterocolitica* strains on the inflammatory response of human umbilical vein endothelial cells. *Infect. Immun.* **70**:3510-3520.
- Dukuzumuremyi, J.M., Rosqvist, R., Hallberg, B., Akerstrom, B., Wolf-Watz, H. und Schesker, K. (2000). The *Yersinia* protein kinase A is a host factor inducible RhoA/Rac-binding virulence factor. *J. Biol. Chem.* **275**:35281-35290.
- Egelhoff, T.T., Brown, S.S., Manstein, D.J. und Spudich, J.A. (1989). Hygromycin as a selectable marker in *Dictyostelium discoideum*. *Mol. Cell Biol.* **9**:1965-1968.
- Eitel, J. und Dersch, P. (2002). The YadA protein of *Yersinia pseudotuberculosis* mediates high-efficiency uptake into human cells under environmental conditions in which invasion is repressed. *Infect. Immun.* **70**:4880-4891.
- Eskelinen, E.L., Tanaka, Y. und Saftig, P. (2003). At the acidic edge: emerging functions for lysosomal membrane proteins. *Trends Cell Biol.* **13**:137-145.
- Faix, J., Gerisch, G. und Noegel, A.A. (1992). Overexpression of the csA cell adhesion molecule under its own cAMP-regulated promoter impairs morphogenesis in *Dictyostelium*. *J. Cell Sci.* **102**:203-214.

- Febbraio, M., Hajjar, D.P. und Silverstein, R.L. (2001). CD36: a class B scavenger receptor involved in angiogenesis, atherosclerosis, inflammation, and lipid metabolism. *J. Clin. Invest.* **108**:785-791.
- Francis, M.S., Lloyd, S.A. und Wolf-Watz, H. (2001). The type III secretion chaperone LcrH cooperates with YopD to establish a negative, regulatory loop for control of Yop synthesis in *Yersinia pseudotuberculosis*. *Mol. Microbiol.* **42**:1075-1093.
- Galan, J.E. (2001). *Salmonella* interactions with host cells: type III secretion at work. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **17**:53-86.
- Galyov, E. E., Hakansson, S., Forsberg, A. und Wolf-Watz, H. (1993). A secreted protein kinase of *Yersinia pseudotuberculosis* is an indispensable virulence determinant. *Nature* **361**:730-732.
- Glöckner, G., Eichinger, L., Szafranski, K., Pachebat, J.A., Bankier, A.T., Dear, P.H., Lehmann, R., Baumgart, C., Parra, G., Abril, J.F., Gugo, R., Kumpf, K., Tunggal, B., das *Dictyostelium* Genome Sequencing Consortium, Cox, E., Quall, M.A., Platzer, M., Rosenthal, A. und Noegel, A. (2002). Sequence and analysis of chromosome 2 of *Dictyostelium discoideum*. *Nature* **418**:79-85.
- Hacker, U., Albrecht, R. und Maniak, M. (1997). Fluid-phase uptake by macropinocytosis in *Dictyostelium*. *J. Cell Sci.* **110**:105-12.
- Hakansson, S., Galyov, E.E., Rosqvist, R. und Wolf-Watz, H. (1996). The *Yersinia* YpkA Ser/Thr kinase is translocated and subsequently targeted to the inner surface of the HeLa cell plasma membrane. *Mol. Microbiol.* **20**:593-603.
- Haller, J.C., Carlson, S., Pederson, K.J. und Pierson, D.E. (2000). A chromosomally encoded type III secretion pathway in *Yersinia enterocolitica* is important in virulence. *Mol. Microbiol.* **36**:1436-1446.
- Hamid, N., Gustavsson, A., Andersson, K., McGee, K., Persson, C., Rudd, C.E. und Fallmann, M. (1999). YopH dephosphorylates Cas and Fyn-binding protein in macrophages. *Microbiol. Pathog.* **27**:231-242.
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *E. coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**:557-580.
- Haugwitz, M., Noegel, A.A., Rieger, D., Lottspeich, F. und Schleicher, M. (1991). *Dictyostelium discoideum* contains two profilin isoforms that differ in structure and function. *J. Cell Sci.* **100**:481-489.

- Haugwitz, M., Noegel, A.A., Karakesisoglou, J. und Schleicher, M. (1994). *Dictyostelium* amoebae that lack G-actin-sequestering profilins show defects in F-actin content, cytokinesis, and development. *Cell* **79**:303-314.
- Hoening, S., Sandoval, I.V. und von Figura, K. (1998). A di-leucine-based motif in the cytoplasmic tail of LIMP-II and tyrosinase mediates selective binding of AP-3. *EMBO J.* **17**:1304-1314.
- Hoicyk, E. und Blobel, G. (2001). Polymerization of a single protein of the pathogen *Yersinia enterocolitica* into needles punctures eukaryotic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**:4669-4674.
- Holmes, D.S. und Quigley, M. (1981). A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal. Biochem.* **114**:193-197.
- Iriarte, M., Sory, M.-P., Boland, A., Boyd, A.P., Mills, S.D., Lambermont, I. und Cornelis, G.R. (1998). TyeA, a protein involved in control of Yop release and in translocation of *Yersinia* Yop effectors. *EMBO J.* **17**:1907-1918.
- Isberg, R.R. und Tran Van Nhieu, G. (1994). Binding and internalization of microorganisms by integrins receptors. *Trends Microbiol.* **2**:10-14.
- Janssen, K.-P., Rost, R., Eichinger, L. und Schleicher, M. (2001). Characterization of CD36/LIMPII homologues in *Dictyostelium discoideum*. *J. Biol. Chem.* **276**:38899-38910.
- Juris, S.J., Rudolph, A.E., Huddler, D., Orth, K. und Dixon, J.E. (2000). A distinctive role for the *Yersinia* protein kinase: actin binding, kinase activation, and cytoskeleton disruption. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**:9431-9436.
- Karakesisoglou, I., Janssen, K.-P., Eichinger, L., Noegel, A.A. und Schleicher, M. (1999). Identification of a supressor of the *Dictyostelium* profilin-minus phenotype as a CD36/LIMPII homologue. *J. Cell Biol.* **145**:167-181.
- Keenan, R.J., Freymann, D.M., Stroud, R.M. und Walter, P. (2001). The signal recognition particel. *Annu. Rev. Biochem.* **70**:755-775.
- Knecht, D.A. und Loomis, W.F. (1987). Antisense RNA inactivation of myosin heavy chain expression in *Dictyostelium discoideum*. *Science* **236**:1081-1086.
- Kouyama, T. und Mihashi, K. (1981). Fluorimetry study of N-(1-pyrenyl)iidoacetamide-labelled F-actin. Local structural change of actin protomer both on polymerization and on binding of heavy meromyosin. *Eur. J. Biochem.* **114**:33-38.
- Kreis, T. und Vale, R. (1999) "Guidebook to the Cytoskeletal and Motor Proteins." *Oxford University Press*. 2. Auflage. New York.

- Kuspa, A. und W.F. Loomis. 1992. Tagging developmental genes in *Dictyostelium* by restriction enzyme-mediated integration of plasmid DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**:8803-8807.
- Lämmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**:680-685.
- Lee, H., Woodman, S.E., Engelman, J.A., Volonte, D., Galbiati, F., Kaufman, H.L., Lublin, D.M. und Lisanti, M.P. (2001). Palmitoylation of caveolin-1 at a single site (Cys-156) controls its coupling to the c-Src tyrosine kinase: targeting of dually acylated molecules (GPI-linked, transmembrane, or cytoplasmic) to caveolae effectively uncouples c-Src and caveolin-1 (TYR-14). *J. Biol. Chem.* **276**:35150-35158.
- Leiting, B. und Noegel, A.A. (1991). The ble gene of *Streptoalloteichus hindustanus* as a new selectable marker for *Dictyostelium discoideum* confers resistance to phleomycin. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **180**:1403-1407.
- Loomis, W.F. Jr. (1969). Developmental regulation of alkaline phosphatase in *Dictyostelium discoideum*. *J. Bacteriol.* **100**:417-422.
- Loomis, W.F. und Kuspa, A. (1984). Biochemical and genetic analysis of pre-stalk specific acid phosphatase in *Dictyostelium*. *Dev. Biol.* **102**:498-503.
- Loomis, W.F. (1996). Genetic networks that regulate development in *Dictyostelium* cells. *Microbiol. Rev.* **60**:135-150.
- Lowry, O.H., Rosebraugh, N.J., Farr, A.L. und Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**:265-275.
- Malchow, D., Nägele, B., Schwarz, H. und Gerisch, G. (1972). Membrane-bound cyclic AMP phosphodiesterase in chemotactically responding cells of *Dictyostelium discoideum*. *Eur. J. Biochem.* **28**:136-142.
- Maniak, M. (2001). Fluid-phase uptake and transit in axenic *Dictyostelium* cells. *Biochim. Biophys. Acta* **1525**:197-204.
- Manstein, D.J., Titus, M.A., De Lozanne, A. und Spudich, J.A. (1989). Gene replacement in *Dictyostelium*: Generation of myosin null mutants. *EMBO J.* **8**:923-932.
- Morrison, A., Marschalek, R., Dingermann, T. und Harwood, A.J. (1997). A novel, negative selectable marker for gene disruption in *Dictyostelium*. *Gene* **202**:171-176.
- Murao, K., Terpstra, V., Green, S.R., Kondratenko, N., Steinberg, D. und Quehenberger, O. (1997). Characterization of CLA-I, a human homologue of rodent scavenger receptor SR-BI, as a receptor for high density lipoprotein and apoptotic thymocytes. *J. Biol. Chem.* **272**:17551-17557.

- Navazo, M.D., Daviet, L., Savill, J., Ren, Y., Leung, L.L. und McGregor, J.L. (1996). Identification of a domain (155-183) on CD36 implicated in the phagocytosis of apoptotic neutrophils. *J. Biol. Chem.* **271**:15381-15385.
- Nellen, W., Silan, C. und Flirtel, R.A. (1984). DNA-mediated transformation in *Dictyostelium discoideum*: Regulated expression of an actin gene fusion. *Mol. Cell. Biol.* **4**:2890-2898.
- Neuhaus, E.M. und Soldati, T. (1999). Molecular mechanisms of membrane trafficking. What do we learn from *Dictyostelium discoideum*? *Protist* **150**:235-243.
- Neuhaus, E.M. und Soldati, T. (2000). A myosin I is involved in membrane recycling from early endosomes. *J. Cell Biol.* **150**:1013-1026.
- Neuhaus, E.M., Almers, W. und Soldati, T. (2002). Morphology and dynamics of the endocytic pathway in *Dictyostelium discoideum*. *Mol. Biol. Cell* **13**:1390-1407.
- Neyt, C. und Cornelis, G.R. (1999). Role of SycD, the chaperone of the *Yersinia* Yop translocators YopB and YopD. *Mol. Microbiol.* **31**:143-156.
- Noegel, A., Welker, D.L., Metz, B.A. und Williams, K.L. (1985). Presence of nuclear associated plasmids in the lower eukaryote *Dictyostelium discoideum*. *J. Mol. Biol.* **185**:447-450.
- O'Halloran, T.J. und Anderson, R.G. (1992). Clathrin heavy chain is required for pinocytosis, the presence of large vacuoles, and development in *Dictyostelium*. *J. Cell Biol.* **118**:1371-1377.
- Ohno, H., Aguilar, R.C., Yeh, D., Taura, D., Saito, T. und Bonifacino, J.S. (1998). The medium subunits of adaptor complexes recognize distinct but overlapping sets of tyrosine-based sorting signals. *J. Biol. Chem.* **273**:25915-25921.
- Pardee, J.D. und Spudich, J.A. (1982). Purification of muscle actin. *Methods Cell. Biol.* **24**:271-289.
- Parkhill, J., Wren, B.W., Thomson, N.R., Titball, R.W., Holden, M.T.G., Prentice, M.B., Sebahia, M., James, K.D., Churcher, C., Mungall, K.L., Baker, S., Basham, D., Bentley, S.D., Brooks, K., Cerdeño-Tárraga, A.M., Chillingworth, T., Cronin, A., Davies, R.M., Davis, P., Dougan, G., Feltwell, T., Hamlin, N., Holroyd, S., Jagels, K., Karlyshev, A.V., Leather, S., Moule, S., Oyston, P.C.F., Quail, M., Rutherford, K., Simmonds, M., Skelton, J., Stevens, K., Whitehead, S. und Barrell, B.G. (2001). Genome sequence of *Yersinia pestis*, the causative agent of plague. *Nature* **413**:523-527.

- Pettersson, J., Nordfelth, R., Dubinina, E., Bergman, T., Gustafsson, M., Magnusson, K.E. und Wolf-Watz, H. (1996). Modulation of virulence factor expression by pathogen target cell contact. *Science* **273**:1231-1233.
- Raper, K.B. (1935). *Dictyostelium discoideum*, a new species of slime mold from decaying forest leaves. *J. Agr. Res.* **50**:135-147.
- Rauchenberger, R., Hacker, U., Murphy, J., Niewohner, J. und Maniak, M. (1997). Coronin and vacuolin identify consecutive stages of a late, actin-coated endocytic compartment in *Dictyostelium*. *Curr. Biol.* **7**:215-218.
- Rigotti, A., Trigatti, B.L., Penman, M., Rayburn, H., Herz, J. und Krieger, M. (1997). A targeted mutation in the murine gene encoding the high density lipoprotein (HDL) receptor scavenger receptor class B type I reveals its key role in HDL metabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**:12610-12615.
- Rodionov, D.G., Honing, S., Silye, A., Kongsvik, T.L., von Figura, K. und Bakke, O. (2002). Structural requirements for interactions between leucine-sorting signals and clathrin-associated adaptor protein complex AP3. *J. Biol. Chem.* **277**:47436-47443.
- Rupper, A. und Cardelli, J. (2001). Regulation of phagocytosis and endo-phagosomal trafficking pathways in *Dictyostelium discoideum*. *Biochim. Biophys. Acta* **1525**:205-216.
- Ruscetti, T., Cardelli, J.A., Niswonger, M.L. und O'Halloran, T.J. (1994). Clathrin heavy chain functions in sorting and secretion of lysosomal enzymes in *Dictyostelium discoideum*. *J. Cell Biol.* **126**:343-352.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. und Maniatis, T. (1989). "Molecular Cloning". *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, Cold Spring Harbor, New York.
- Sandoval, I.V., Martinez-Arca, S., Valdueza, J., Palacios, S. und Holman G.D. (2000). Distinct reading of different structural determinants modulates the dileucine-mediated transport steps of the lysosomal membrane protein LIMP2 and the insulin-sensitive glucose transporter GLUT4. *J. Biol. Chem.* **275**:39874-39885.
- Schneider, N., Schwartz, J.M., Kohler, J., Becker, M., Schwarz, H. und Gerisch, G. (2000). Golvesin-GFP fusions as distinct markers for Golgi and post-Golgi vesicles in *Dictyostelium* cells. *Biol. Cell* **92**:495-511.
- Schutt, C.E., Myslik, J.C., Rozycki, M.D., Gooneskere, N. und Lindberg, U. (1993). The structure of crystalline profilin-beta-actin. *Nature* **365**:810-816.
- Shao, F., Merritt, P.M., Bao, Z., Innes, R.C. und Dixon, J.E. (2002). A *Yersinia* effector and a *Pseudomonas* avirulence protein define a family of cysteine proteases functioning in bacterial pathogenesis. *Cell* **109**:575-588.

- Skriwan, C., Fajardo, M., Hagele, S., Horn, M., Wagner, M., Michel, R., Krohne, G., Schleicher, M., Hacker, J. und Steinert, M. (2002). Various bacterial pathogens and symbionts infect the amoeba *Dictyostelium discoideum*. *Int. J. Med. Microbiol.* **291**:615-624.
- Southern, E.M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98**:503-517.
- Souza, G.M., Mehta, D.P., Lammertz, M., Rodriguez-Paris, J., Wu, R., Cardelli, J.A. und Freeze, H.H. (1997). *Dictyostelium* lysosomal proteins with different sugar modifications sort to functionally distinct compartments. *J. Cell Sci.* **110** :2239-2248.
- Spoerl, Z., Stumpf, M., Noegel, A.A. und Hasse, A. (2002). Oligomerization, F-actin interaction and membrane association of the ubiquitous mammalian coronin 3 are mediated by its carboxyl terminus. *J. Biol. Chem.* **277**:48858-48867.
- Spudich, J.A. und Watt, S. (1971). The regulation of rabbit skeletal muscle contraction. I. Biochemical studies of the interaction of the tropomyosin-troponin complex with actin and the proteolytic fragments of myosin. *J. Biol. Chem.* **246**:4866-4871.
- Suggs, S.V., Wallace, R.B., Hirose, T., Kawashima, E.H. und Itakura, K. (1981). Use of synthetic oligonucleotides as hybridization probes: isolation of cloned cDNA sequences for human beta 2-microglobulin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**:6613-6617.
- Temesvari, L.A., Seastone, D.J. und Cardelli, J.A. (1996). Cloning and characterization of a *Dictyostelium discoideum* cDNA encoding a protein related to the medium chain subunit of clathrin-associated adaptor complexes. *Gene* **183**:47-51.
- Temesvari, L., Zhang, L., Fodera, B., Janssen, K.P., Schleicher, M. und Cardelli, J.A. (2000). Inactivation of *ImpA*, encoding a LIMPII-related endosomal protein, suppresses the internalization and endosomal trafficking defects in profilin-null mutants. *Mol. Biol. Cell* **11**:2019-2031.
- Thilo, L. (1985). Quantification of endocytosis-derived membrane traffic. *Biochim. Biophys. Acta* **822**:243-266.
- Towbin, H., Staehelin, T. und Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**:4350-4354.
- Uittenbogaard, A., Shaul, P.W., Yuhanna, I.S., Blair, A. und Smart, E.J. (2000). High density lipoprotein prevents oxidized low density lipoprotein-induced inhibition of endothelial nitric-oxide synthase localization and activation in caveolae. *J. Biol. Chem.* **275**:11278-11283.

- Vega, M.A., Segui-Real, B., Garcia, J.A., Cales, C., Rodriguez, F., Vanderkerckhove, J. und Sandoval, IV. (1991). Cloning, sequencing, and expression of a cDNA encoding rat LIMP II, a novel 74-kDa lysosomal membrane protein related to the surface adhesion protein CD36. *J. Biol. Chem.* **266**:16818-16824.
- Vega, M.A., Rodriguez, F., Segui, B., Cales, C., Alcalde, J. und Sandoval, I.V. (1991). Targeting of lysosomal integral membrane protein LIMP II. The tyrosine-lacking carboxyl cytoplasmic tail of LIMP II is sufficient for direct targeting to lysosomes. *J. Biol. Chem.* **266**:16269-16272.
- Von Heijne, G. (1986). Net N-C charge imbalance may be important for signal sequence function in bacteria. *J. Mol. Biol.* **192**:287-290.
- Watts, D.J. und Ashworth, J.M. (1970). Growth of *myxameobae* of the cellular slime mould *Dictyostelium discoideum* in axenic culture. *Biochem. J.* **119**:171-174.
- Wegner, A. (1976). Head to tail polymerization of actin. *J. Mol. Biol.* **108**:139-150.
- Weiner, O.H., Murphy, J., Griffiths, G., Schleicher, M. und Noegel, A.A. (1993). The actin-binding protein comitin (p24) is a component of the Golgi apparatus. *J. Cell Biol.* **123**:23-34.
- Williams, C. und Newell, G. (1976). A genetic study of aggregation in the cellular slime mold *Dictyostelium discoideum* using complementation analysis. *Genetics* **82**:287-307.
- Witke, W., Nellen, W. und Noegel, A. (1987). Homologous recombination in the *Dictyostelium* alpha-actinin gene leads to an altered mRNA and lack of the protein. *EMBO J.* **6**:4143-4148.
- Woestyn, S., Allaoui, A., Wattiau, P. und Cornelis, G.R. (1994). YscN, the putative energizer of the *Yersinia* Yop secretion machinery. *J. Bacteriol.* **176**:1561-1569.
- Yanisch-Perron, C., Vieira, J. und Messing, J. (1985). Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* **33**:103-119.

Abbildungsverzeichnis

	<u>Seite</u>
Abb. 1: Phylogenetische Analyse der CD36/LIMPII-Superfamilie	5
Abb. 2: YpkA-Überexpression in HeLa-Zellen	10
Abb. 3: Aminosäuresequenz von his-DdLmpC	44
Abb. 4: Expression und Reinigung des rekombinanten Proteins his-DdLmpC	45
Abb. 5: Aminosäuresequenzen von DdLmpA, DdLmpB und DdLmpC	46
Abb. 6: Spezifität der polyklonalen Antiseren 7656 und 7654 (Verdünnung 1:50.000)	47
Abb. 7: Spezifität der polyklonalen Antiseren 7657 und 7655 (Verdünnung 1:50.000) in <i>D. discoideum</i> -Homogenaten	48
Abb. 8: Vergleich der Expression von DdLmpB und DdLmpC in AX2 und RB2-Zellen	49
Abb. 9: Analytische Protease-Behandlung	50
Abb. 10: Membranfraktionierung im Zuckergradienten	52
Abb. 11: Subzelluläre Verteilung von DdLmpB und DdLmpC in der Immunfluoreszenz	53
Abb. 12: Immunfluoreszenz-Untersuchungen mit TRITC-Dextran	54
Abb. 13: Entwicklungsregulation von DdLmpA, DdLmpB und DdLmpC	55
Abb. 14: Southern-Blot mit genomischer DNA aus verschiedenen DdLmpB-negativen Klonen, einem DdLmpB-positiven Klon sowie aus AX2-Wildtypzellen	57
Abb. 15: Kosedimentation von YopO und YopO K269A mit Aktin	60
Abb. 16: G-Aktin als Aktivator von YopO <i>in vitro</i>	62
Abb. 17: Aktivierung der YopO-Kinase in Anwesenheit verschiedener aktinbindender Proteine und chemischer Substanzen	63
Abb. 18: Aktivierung der YopO-Kinase in Anwesenheit von Profilin I und Cortexillin I	64
Abb. 19: MBP als Substrat der aktivierten YopO-Kinase	65
Abb. 20: Histon-TypIII als Substrat der aktivierten YopO-Kinase in Gegenwart von F- Aktin	67
Abb. 21: Casein als Substrat der aktivierten YopO-Kinase	68
Abb. 22: Nichtmuskelaktin ist ein ca. 10-fach besserer Aktivator von GST-YopO als Muskelaktin (Teil 1)	69
Abb. 23: Nichtmuskelaktin ist ein ca. 10-fach besserer Aktivator von GST-YopO als Muskelaktin (Teil 2)	70

	<u>Seite</u>
Abb. 24: Der Einfluß verschiedener GTPasen auf die Aktivierung von YopO	71
Abb. 25: Die Zugabe der inaktiven Mutante YopO K269A zum Wildtyp reduziert beim 4-fachen Überschuß das Phosphorylierungssignal von GST-YopO	72
Abb. 26: Die Zugabe der Deletions-Mutante YopO Δ 710 zum Wildtyp reduziert bei steigender Konzentration das Phosphorylierungssignal von GST-YopO	73
Abb. 27: Fluoreszenzspektroskopische Untersuchungen	75
Abb. 28: Verschiedene biochemische Mechanismen regulieren die Makropinozytose und Phagozytose in <i>Dictyostelium</i> (nach Cardelli, 2001)	80

ABKÜRZUNGEN

A		DNA	Desoxyribonukleinsäure ("Desoxyribonucleinacid")
A	Ampere	dNTPs	Desoxy-Nukleosidtriphosphate
Abb.	Abbildung(en)	DTT	1,4-Dithio-D,L-threitol
<i>ad.</i>	auf	E	
A	Adenin	EDTA	Ethylendinitrilotetraessigsäure
ADP	Adenosindiphosphat	EGFP	"enhanced green fluorescence protein"
Ak	Antikörper	EGTA	Ethylen-glycol-bis [2-amino- ethylether]- N,N,N',N'-tetra- essigsäure
APS	Ammoniumperoxodisulfat	<i>et al.</i>	<i>et altera</i> (und andere)
ATP	Adenosintriphosphat	F	
AS	Aminosäure(n)	F-Aktin	filamentöses (polymerisiertes) Aktin
autokl.	autoklaviert	G	
B		G	Guanin
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolyl- phosphat-p-toluidinsalz	g	Gramm oder Vielfaches der Erdbeschleunigung
bid.	bidestilliert	G-Aktin	globuläres (monomeres) Aktin
Bp	Basenpaar(e)	GDP	Guanosindiphosphat
BSA	Rinderserumalbumin ("Bovine Serum Albumin")	GlcNAc	N-Acetylglucosamin
C		GTP	Guanosintriphosphat
C	Cytosin	GTPase	Guanosintriphosphatase
c	Konzentration	H	
cAMP	zyklisches Adenosinmono- phosphat ("cyclic Adenosine- triphosphate")	h	Stunde
CD	"cluster of differentiation"	HeLa	Zelllinie aus einem Zervix- Karzinom (von Henrietta Lacks isoliert)
cDNA	komplementäre DNA ("complementary DNA")	His-Tag	Peptid mit 6 Histidin-Resten, bindet an Ni ²⁺ -NTA-Säule
°C	Grad Celsius	HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazid - N'-ethansulfonsäure
Ci	Curie	H ₂ O	Wasser
cm	Zentimeter	I	
COS	"CV-1; origin; SV40"	IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalacto- Pyranosid
C-term.	carboxyterminal	IL-8	Interleukin 8
Cy3	Carboxymethylindocyanin	<i>in vitro</i>	im Reagenzglas
D		<i>in vivo</i>	im lebenden Organismus
Da	Dalton		
DAPI	4,6-diamidino-2-phenylindole		
DEP	Diethylpyrocarbonat		
DdLmp	"lysosomal membrane protein" aus <i>Dictyostelium discoideum</i>		
DMSO	Dimethylsulfoxid		

K		pAk	polyklonaler Antikörper
kB	Kilobasen	PCR	Polymerase-Kettenreaktion ("Polymerase Chain Reaction")
kDa	Kilodalton	PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5- diphosphat
kg	Kilogramm	pmol	Picomol
Konz.	Konzentrat	PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
kV	Kilovolt	R	
L		RNA	Ribonukleinsäure ("Ribonucleinacid")
Lcr	"low Ca ²⁺ response"	RNase	Ribonuklease
LB	Luria Bertani	RT	Raumtemperatur
l	Liter	S	
LIMP	"lysosomal integral membrane protein"	s	Sekunde(n)
LMW	"Low Molecular Weight"	SDS	Natriumdodecylsulfat ("Sodium Dodecyl Sulfate")
M		T	
M	molar, Mol/Liter	T	Thymin oder Temperatur
mA	Milliampere	t	Zeit
mAk	monoklonaler Antikörper	TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylen- diamin
MAPK	"mitogen-activated protein kinase"	T _m	Mischzeit
MBP	"myelin basic protein"	TNF- α	"tumor necrotic factor α "
mg	Milligramm	Tris	Tris-(hydroxymethyl-) aminomethan
μ F	Mikrofarad	TRITC	Tetramethyl-rhodamine- isothiocyanate
μ l	Mikroliter	tRNA	transfer-RNA
μ M	mikromolar	TTS	Typ-III Sekretionssystem
μ m	Mikrometer	U	
min	Minute(n)	U	Uracil oder Einheit (Unit)
ml	Milliliter	ÜN	über Nacht
mM	millimolar, Millimol/Liter	UpM	Umdrehungen pro Minute
mm	Millimeter	UV	Ultraviolett
MW	Molekulargewicht	V	
N		V	Volt
N	Asparagin	Vol	Volumen/Volumina
NBT	Nitro Blue Tetrazolium	(^v / _v)	Volumenprozent (^{volume} / _{volume})
NF- κ B	"nuclear factor κ B"	W	
nm	Nanometer	(^w / _v)	Gewichtsprozent (^{weight} / _{volume})
NP-40	Nonylphenylpolyethylenglycol	Y	
N-term.	aminoterminal	Y.	<i>Yersinia</i>
O		Yad	" <i>Yersinia adhesin</i> "
OD	Optische Dichte		
P			
<i>p.a.</i>	<i>per analysis</i> (zur Analyse)		
PAGE	Polyacrylamidgelelektropho- rese		

Yop	" <i>Yersinia</i> outer proteins"
YpkA	" <i>Yersinia</i> protein kinase A"
Ysc	"Yop secretion"

Außerdem

∅	Durchmesser
~	etwa
×	fach, z.B. „2 ×“ = zweifach; mal, z.B. „2 ×“ = zweimal
>	größer
≥	größer-gleich
≅	ist/sind ungefähr gleich
<	kleiner
≤	kleiner-gleich
#	Nummer
Ω	Ohm
%	Prozent

Lebenslauf

René Rost

Persönliche Daten

Geburtstag und -ort: 27.05.1974 in Leipzig

Familienstand: ledig

Schulbildung

09/80 - 07/90 Polytechnische Oberschule (POS), Waren/Müritz

09/91 - 06/94 Staatliches Gymnasium, Waren/Müritz

06/94 *Allgemeine Hochschulreife*

Universität und Forschung

10/94 - 09/96 Studium der Biologie an der Universität Rostock

07/96 - 08/96 *Diplom-Vorprüfung*

10/96 - 09/99 Studium der Biologie an der Universität Greifswald

07/98 - 09/98 *Diplom-Hauptprüfung* (Hauptfach: Bakteriengenetik;
Nebenfach 1: Virologie; Nebenfach 2: Mikro- und
Molekularbiologie)

12/98 - 09/99 Diplomarbeit in der Gruppe von Prof. Dr. H. Herrmann am
Institut für Genetik und Biochemie, Universität Greifswald.
Titel: "Untersuchungen zum aeroben Phenylacetatabbau in
Azoarcus evansii"

seit 10/99 Promotion in der Gruppe von Prof. Dr. M. Schleicher am A.-
Butenandt-Institut für Zellbiologie, LMU München; Betreuung
durch Prof. Dr. H. MacWilliams, Zoologisches Institut, LMU.

Danksagung

Mein erster Dank gilt Herrn Prof. Dr. Michael Schleicher dafür, daß ich die Möglichkeit hatte, die Promotion am Institut in diesem Umfeld durchzuführen. Ich bedanke mich für die Betreuung und für die unzähligen Diskussionen wissenschaftlicher und nicht-wissenschaftlicher Natur.

Bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Harry MacWilliams für die Vertretung meiner Arbeit vor der Fakultät für Biologie.

Herrn Prof. Dr. Manfred Schliwa danke ich für die konstruktive Kritik bei den Seminaren.

Ein großer Dank geht an:

Daniela (hmmm, deine Sticheleien werde ich wohl schnell vermissen; aber auch deine intensiven und fach(frau)lichen Anleitungen im Labor und deine amüsanten Ratschlägen in (fast?) allen Mann-Frau-Lebenslagen) und Gülni (dangge Kollegin für den schier unerschöpflichen Nachschub an YopO-Konstrukten! Gruß dem Außenminister und der Ernsthaftigkeit des Seins. *zwinkert*).

Ein tausendfacher Dank an Christian und Andreas (Uups, aehm...Andi? Christian? Hier stimmt was nich..).

Danken möchte ich weiterhin allen (ehemaligen) Leuten der Schleicher-Gruppe: Lars, Marc, Klaus, Annika, Rajesh, Jibi, PD Dr. Hans, Annette, Stefan S., Stefan T., Axel, Hyun-Ju, Dr. Ludwig Eichinger, Dr. Thomas Giebing und Soo Sim (jeep, wir waren schon ein lustiger, irrwitziger Haufen - schluchz). Auch den übrigen Mitgliedern des Instituts für Zellbiologie, allen voran die gesamte Schliwa-Gruppe, möchte ich danken für die bleibenden angenehmen Erinnerungen.

Größten Dank schulde ich Holger, einem Versprechen und Hamlets Monolog.

Natürlich gilt der letzte Dank dem Heinzelmännchen MWS und den unzähligen Tageskarten gastronomischer Einrichtungen für die Aufrechterhaltung des Energiehaushaltes.

