

Zusammenfassung

D. discoideum ist ein gut geeigneter Modell-Organismus, um sowohl grundsätzliche zelluläre Prozesse als auch Wirt-Pathogen Interaktionen zu untersuchen. Infektionsstudien von *D. discoideum* mit *S. typhimurium* brachten Autophagie als möglichen abwehrrlevanten Prozess hervor. Sowohl das Kern-Autophagogen *atg8* als auch ein sehr ähnliches Gen, welches wir *atg8-like* benannten, war hochreguliert nach Infektion mit *S. typhimurium* und *M. marinum*. ATG8 ist ein bekannter Autophagosommarker, der eine C-terminale Modifikation durchläuft, bei dem das Protein mit PE in der Autophagosomenmembran verknüpft wird. Die Protein Sequenzen von ATG8 und ATG8-like sind zu 54 % identisch. Phylogenetische Analysen zeigten, daß beide Proteine eine nahe Verwandtschaft zueinander und zu ATG8 von *Acanthamoeba*, Pilzen und Pflanzen haben, während die Verwandtschaft zu LC3/GABARAP der Tiere weniger groß war. Wir entschieden uns, ATG8 und ATG8-like weiter zu untersuchen. Um mehr über ihre zelluläre Funktion zu erfahren stellten wir polyklonale Antikörper und verschiedene *D. discoideum* Mutanten her, die mRFP-ATG8 oder mRFP-ATG8-like exprimierten, oder mRFP-ATG8 und GFP-ATG8 oder GFP-ATG8-like im AX2 Wildtyp, ATG9⁻ und AAG co-exprimierten. Mit Hilfe dieser Werkzeuge wurden RFP- und GFP-trap Co-IP Experimente durchgeführt, gefolgt von massenspektrometrischer Analyse. Wir fanden eine große Anzahl gemeinsamer potentieller Interaktionspartner für ATG8 und ATG8-like, wie z.B. ATG7 und ATG3, die beide als E1- und E2-ähnliche Enzyme in die Modifizierung von ATG8 involviert sind. Dieses Resultat, das konservierte C-terminale Glycin, an dem die proteolytische Spaltung stattfindet, sowie die massenspektrometrische Analyse legen nahe, daß ATG8 und ATG8-like in derselben Weise modifiziert werden wie ATG8 aus Hefen und Säuger-LC3. Die statistische Analyse der Co-Expressionsstämme führte zu dem Ergebnis, daß ATG8-like hauptsächlich mit neuen, kleinen Autophagosomen assoziiert, während ATG8 hauptsächlich mit großen Autophagosomen assoziiert. Außerdem fanden wir heraus, daß sowohl ATG8 als auch ATG8-like mit Ubiquitin und ATG9 partiell ko-lokalisieren. Letzteres wurde in Lebend-Zell Studien mit den AAG/mRFP:ATG8 und AAG/mRFP:ATG8-like Stämmen beobachtet. Es zeigte sich eine hochdynamische und kurzweilige Ko-lokalisierung zwischen ATG9 und ATG8 bzw. ATG8-like. ATG9 erschien zuerst an den Vesikeln, gefolgt von ATG8-like und ATG8. ATG8 könnte, ähnlich wie GABARAP, eine Funktion beim Versiegeln von

Autophagosomen haben. Daher nehmen wir an, daß ATG8-like und nicht ATG8 das echte LC3 Ortholog in *D. discoideum* darstellt.