

**Charakterisierung
des *Yersinia* Effektorproteins YopE
und der mitochondrialen GTPase Miro
in *D. discoideum***

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität zu Köln



vorgelegt von

Georgia Vlahou

aus Köln

2008

Berichtersteller/in: Prof. Dr. Angelika A. Noegel
Prof. Dr. Siegfried Roth

Tag der mündlichen Prüfung: 09.02.09

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Oktober 2005 bis Dezember 2008 unter der Anleitung von Prof. Dr. Angelika A. Noegel und der Betreuung von PD Dr. Francisco Rivero Crespo am Biochemischen Institut der Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln angefertigt.

Für meine Familie

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis _____	I
Abkürzungsverzeichnis _____	V
I Einleitung _____	1
1. Dictyostelium discoideum als Modellorganismus _____	1
1.2 Die Ras Superfamilie _____	2
1.3 Lokalisation der GTPasen _____	4
2. Yersinia _____	8
2.1 Virulenzeigenschaften von <i>Yersinia</i> _____	8
2.2 <i>Yersinia outer protein</i> YopE _____	9
3. Die Miro GTPasen _____	10
3.1 Die Mitochondrien _____	13
3.1.1 Mitochondrialer Transport _____	14
4. Zielsetzung _____	15
4.1 <i>Yersinia outer protein</i> YopE _____	15
4.2 <i>D. discoideum</i> Miro _____	16
II Material und Methoden _____	17
1 Material _____	17
1.1 Kits _____	17
1.2 Enzyme, Antikörper und Inhibitoren _____	17
1.2.1 Enzyme für die Molekularbiologie _____	17
1.2.2 Primäre Antikörper _____	18
1.2.3 Sekundäre Antikörper _____	18
1.2.4 Inhibitoren _____	18
1.3 Antibiotika _____	19
1.4 Fluoreszenzfarbstoffe _____	19
1.5 Radiochemikalien _____	19
1.6 Medien und Puffer _____	19
1.6.1 Bakterienmedien Sambroock et al., 1989 _____	19
1.6.2 Medien und Puffer für <i>D. discoideum</i> Kultur _____	20
1.6.4 Puffer und andere Lösungen _____	21
1.7 Biologisches Material _____	22
1.7.1 Bakterienstämme _____	22

1.7.2 <i>Dictyostelium discoideum</i> Stämme	23
1.8 Plasmide	23
1.9 Oligonukleotide	23
1.9.1 Oligonukleotide für das <i>gemA</i> Knockoutkonstrukt	23
1.9.2 Oligonukleotide für den <i>gemA</i> PCR Screen	23
1.9.3 Oligonukleotide für die <i>gemA</i> Sonde	24
2 Methoden	24
2.2.1 Kultivierung von <i>D. discoideum</i>	24
2.3 Molekularbiologische Methoden	26
2.3.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> im Mikromaßstab (Birnboim und Doly 1979)	26
2.3.2 In vitro Rekombination von DNA	29
2.3.3 Polymerase-Kettenreaktion (Saiki <i>et al.</i> 1988)	30
2.3.4 Reverse Transkription-Polymerasekettenreaktion	32
2.3.5 Elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten (Sambrook <i>et al.</i> 1989)	32
2.3.6 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	33
2.3.7 Transformation von <i>E. coli</i> Zellen	33
2.3.8 Transformation von <i>D. discoideum</i> Zellen durch Elektroporation	34
2.4 Biochemische Methoden	36
2.4.1 Erstellung von Gesamtprotein aus <i>Dictyostelium</i> Zellen	36
2.4.2 Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen im SDS-Polyacrylamidgel (SDS-PAGE)(Laemmli 1970)	36
2.4.3 Westernblotanalyse anhand des HalbtrockenVerfahrens (Towbin <i>et al.</i> 1979)	37
2.2.4 Southernblotanalyse	39
2.4.5 Proteinbestimmung nach Lowry	40
2.5 Zellbiologische Methoden	41
2.5.1 Expression und Aufreinigung von Fusionsproteinen	41
2.5.2 Zellfraktionierung	44
2.5.3 Nocodazol-Behandlung	45
2.5.4 Aktinpolymerisierung (Hall <i>et al.</i> 1988)	45
2.5.5 Phagozytose Assay (Maniak <i>et al.</i> 1995)	46
2.5.6 Endozytose Assay (Vogel <i>et al.</i> 1980, Hacker <i>et al.</i> 1997)	47

2.5.7 Exozytose Assay (Rauchenberger <i>et al.</i> 1997)	47
2.5.8 Phototaxis Assay (Wallraff und Wallraff 1997)	47
2.5.9 Chemotaxis Assay (Gerisch und Keller 1981)	47
2.6 Mitochondrienspezifische Methoden	48
2.6.1 Messung des Sauerstoffverbrauchs	48
2.6.2 Messung des mitochondrialen Transmembranpotentials	48
2.6.3 ATP Bestimmung	49
2.6.4 Messung der Reaktiven Sauerstoffspezies (ROS)	49
2.6.5 Messung des Glukoseverbrauchs	50
2.7 Immunologische Methoden	50
2.7.1 Vorbereitung der <i>D. discoideum</i> Zellen	50
2.7.2 Methanol Fixierung	50
2.7.3 Paraformaldehyd (PFA)-/Pikrinsäurefixierung	51
2.7.4 Immunfärbung von fixierten Zellen	51
2.8 Mikroskopie	52
2.8.1 Mikroskopie von fixierten Präparationen	52
2.8.2 Mikroskopie auf Agarplatten	52
2.9 Generierung eines monoklonalen Antikörpers gegen <i>D. discoideum</i> Miro	52
2.9.1 Expression des Antigens	52
2.9.2 Fusion	53
2.9.3 Auswahl der Klone (<i>Screening</i>)	53
2.10 Analyse am Computer	54
III Ergebnisse	55
3.A Die Effekte des YopE Proteins auf das Aktinzytoskelett	55
3.1 Expressionsmuster von <i>Yersinia</i> Yop Effektoren	55
3.2 YopE assoziiert mit intrazellulären Membrankompartimenten	57
3.3 YopE inhibiert das Wachstum von <i>D. discoideum</i>	60
3.4 Zytokinese in GFP-YopE exprimierenden Zellen	61
3.5 Inhibierung der Phagozytose durch YopE	62
3.6 YopE Expression resultiert in einem veränderten F-Aktin Gehalt sowie in einer veränderten Aktinpolymerisierung als Antwort auf cAMP	66
3.7 YopE blockiert teilweise die Effekte von RacH	70
3.8 Verminderte Rac1 Aktivierung in YopE Zellen	72
3.B Charakterisierung des mitochondrialen Membranproteins Miro	75

3.9 Sequenzvergleich der Miro Homolge	75
3.10 Subzelluläre Lokalisation von Miro	76
3.11 Generierung und Charakterisierung der <i>gemA</i> Mutante	79
3.11.1 Nachweis des <i>gemA</i> -Knockouts	79
3.11.2 Wachstum von <i>gemA</i> -KO Zellen	85
3.11.3 Zytokinese ist in <i>gemA</i> defizienten Zellen nicht beeinträchtigt	88
3.11.4 Phagozytose, Pinozytose und Exozytose von <i>gemA</i> Knockoutzellen	88
3.11.5 Phototaxis ist nicht beeinträchtigt in <i>gemA</i> defizienten Zellen	90
3.11.6 Zellmotilität und Chemotaxis von <i>gemA</i> -KO Mutanten	91
3.11.7 Entwicklung unter Phosphatpufferbedingungen	92
3.11.8 Entwicklung auf Phosphatagarplatte	93
3.11.9 Aktinverteilung in <i>gemA</i> defizienten Zellen	95
3.12 Mitochondrienspezifische Experimente	96
3.12.1 Größe und Morphologie der Zellen sowie Mitochondrien sind in <i>gemA</i> defizienten Zellen nicht beeinträchtigt	96
3.12.2 Die mitochondriale Masse ist deutlich geringer in <i>gemA</i> Nullzellen	96
3.12.3 Die ATP Konzentration ist in <i>gemA</i> defizienten Zellen signifikant erniedrigt	97
3.12.4 Der Sauerstoffverbrauch ist signifikant erhöht in <i>gemA</i> Mutanten	98
3.12.5 Der Glukoseverbrauch von <i>gemA</i> Mutanten ist signifikant geringer	99
3.12.6 Das mitochondriale Transmembranpotential ist in <i>gemA</i> Mutanten nicht verändert	100
3.12.7 Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) Produktion	101
3.13 Rolle des Miro in der mitochondrialen Dynamik	102
3.13.1 Mitochondrienverteilung in <i>gemA</i> defizienten Zellen nach Nocodazolbehandlung	102
3.13.2 Lokalisation der Mitochondrien an den Mikrotubuli	104
IV Diskussion	106
Literaturverzeichnis	119
Zusammenfassung	126
Summary	128
Erklärung	VII
Danksagung	VIII
Lebenslauf	IX

Abkürzungsverzeichnis

³² P	radioaktives Phosphoratom
A	Adenin
AS	Aminosäure (n)
<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
β-ME	Beta-Mercaptoethanol
Bp	Basenpaar(e)
BSA	Rindersrumalbumin
Bsr	Blasticidinresistenzgen
ca.	zirka
C	Cytosin
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CD	CRIB-Domäne
cDNA	komplementäre DNA
CRIB	Cdc42/Rac interaktive Bindung
DCFH-DA	Dichlorofluoresceindiacetat
Dd	<i>Dictyostelium discoideum</i>
<i>D. discoideum</i>	<i>Dictyostelium discoideum</i>
DEPC	Diethylpyrocarbonat
Dm	<i>Drosophila melanogaster</i>
<i>D. melanogaster</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	2-Desoxyribonukleotid-5'-phosphat
DTT	Dithiotreitol
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EF	calciumbindende Domäne
EGTA	Ethylenglycol-bis(b-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetat
ER	endoplasmatisches Retikulum
EtOH	Ethanol
EtBr	Ethidiumbromid
F-Aktin	Filamentäres Aktin
FITC	Fluorescein-5-isothiocyanat
g	Gramm, Erdbeschleunigung
G	Guanin
G418	Geneticin 418
GAP	GTPase-aktivierendes Protein
GDP	Guanosindiphosphat
GED	GTPase-Effektor-Domäne
GEF	GDP/GTP exchange factor (GDP/GTP-Austauschfaktor)
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
GTP	Guanosintriphosphat

Hs	<i>Homo sapiens</i>
<i>H. sapiens</i>	<i>Homo sapiens</i>
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-ethansulfonsäure
IPTG	Isopropylthiogalaktosid
JC-1	(5,5',6,6'-Tetrachloro-1,1',3,3'-Tetraethylbenzimidazolylcarbocyanin Jodid
<i>K. aerogenes</i>	<i>Klebsiella aerogenes</i>
Kb	Kilobasenpaar(e)
KDa	Kilodalton
M	molar
MeOH	Methanol
min	Minuten
MOPS	Morpholino-propansulfonsäure
mRNA	Boten-RNA
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PAK	p21 aktivierte Kinase
PBS	Phosphat-gepufferte Natriumchloridlösung
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
PMSF	Phenylmethylsulfonylchlorid
PIPES	Piperazin-1,4-bis-2-ethansulfonsäure
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
Sc	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
TAE-Puffer	Tris-Acetat-EDTA-Puffer pH 8,5
TBE-Puffer	Tris-Borat-EDTA-Puffer pH 8,3
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TRITC	Tetramethylrhodaminisothiocyanat
TX-100	Triton X-100
UpM	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolettes Licht
vol.	Volumen
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl-b-D-galactopyranosid
z.B.	zum Beispiel

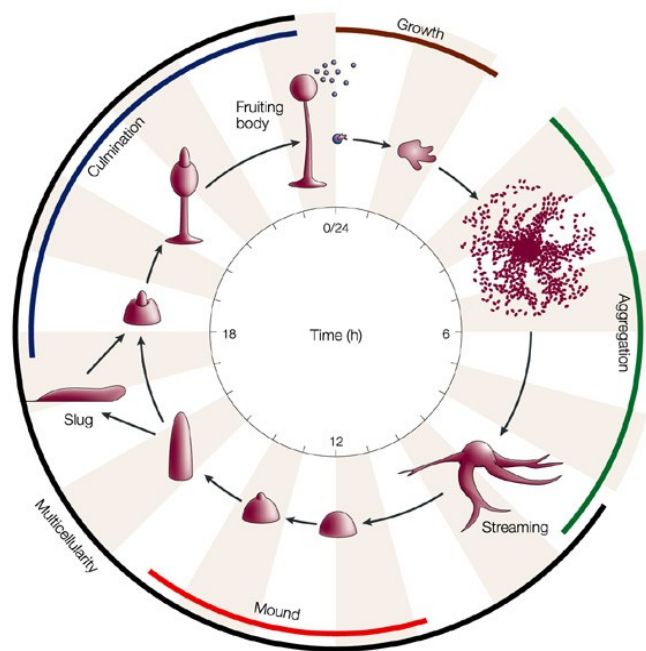
Chemische Elemente und Verbindungen, physikalische Größen und Einheiten werden entsprechend den internationalen Richtlinien abgekürzt.

I Einleitung

1. Dictyostelium discoideum als Modellorganismus

Dictyostelium discoideum ist ein amöboid lebender Protist der Klasse der Acrasiomyceten, der erstmals 1935 von Raper beschrieben wurde. *D. discoideum* erfüllt als eigenständiger Organismus weit vielfältigere Funktionen als die Einzelzellen eines Mehrzellers. Aufgrund dieses Funktionsspektrums eignet er sich insbesondere zur Untersuchung grundlegender zellulärer Prozesse wie Zytokinese, Zellmotilität, Phagozytose, Endozytose, Chemotaxis, zellulärem Transport und Signaltransduktion sowie zur Untersuchung der Entwicklung und Zelldifferenzierung. Die im Waldboden lebende Amöbe ernährt sich durch Phagozytose von Bakterien und vermehrt sich unbegrenzt durch einfache mitotische Zellteilung. Der Entzug der Nahrungsquelle induziert einen morphogenetischen Entwicklungs- und Differenzierungsprozess. Die Zellen sezernieren dabei cAMP als Chemoattraktans, das als Signal zur Koordination der Zellwanderungsbewegung dient und dadurch die Aggregationsphase einleitet. Diese ist dadurch gekennzeichnet, dass sich ca. 100.000 Zellen zu einem Pseudoplasmodium zusammenlagern. In der anschließenden Migrationsphase differenzieren sich die Zellen in Prästiel- und Präsporzellen was letztendlich in die Kulminierungsphase mit der Ausbildung eines Fruchtkörpers endet. Die Prästielzellen differenzieren dabei zu einem sog. Sorophor und bilden die Achse des Fruchtkörpers, während Präsporzellen an ihrer Spitze einen Sporenkopf entwickeln, der als Sorokarp bezeichnet wird. Sowohl Sorophor als auch Sorokarp sind von einer Zellwand umgeben, in die, zur Verstärkung, Zellulose eingelagert ist. Die vom reifen Sorokarp ausgeschütteten Sporen können auskeimen und Amöben freisetzen und leiten somit einen neuen Zyklus ein. Dabei sterben die Zellen des Sorophors ab. Diese einfache Form der Zelldifferenzierung lässt also bereits eine Segregation in generative und vegetative Funktionen erkennen (Abb. I-1) Durch Mutationen freilebender Wildtypstämme lässt sich *D. discoideum* leicht unter Laborbedingungen in axenischen Medien kultivieren (Sussman und Sussman, 1969) und ist dadurch einem großen Spektrum molekularbiologischer und biochemischer Untersuchungsmöglichkeiten zugänglich (Kessin 2006). Das 34.000 kb große Genom enthält ca. 12.500 Gene, von denen viele homolog zu den Genen in höheren Eukaryonten sind (Eichinger *et al.* 2005). Die Isolierung

und Charakterisierung von Mutanten wird durch das haploide Genom sowie durch die Entwicklung eines Transformationssystems geeigneter Vektoren und Methoden zur Mutantenselektion bewerkstelligt (Nellen *et al.* 1984, Howard *et al.* 1988, Leiting und Noegel 1988, Rivero 2006). Darüber hinaus wird *Dictyostelium* immer häufiger für biomedizinische Forschung verwendet (Williams *et al.* 2006).



Nature Reviews | Molecular Cell Biology

Abb. I-1: *D. discoideum* Entwicklung Die morphogenetische Entwicklung von *D. discoideum*, beginnt mit einer einzelnen, vegetativen Amöbe bis zur Bildung eines reifen Fruchtkörpers, der den Sorus an der Spitze des Stiels mit Sporen trägt. Der gesamte Prozess vom Nahrungsentzug der vegetativen Zellen bis zur Ausbildung des reifen Fruchtkörpers beträgt 24 Stunden. Folgende Entwicklungsstadien werden durchlaufen: Wachstum (Growth), Aggregation (Aggregation), Zellströme (Streaming), Hügel (Mound), multizelluläres Stadium (Multicellularity), Kulminierung (Culmination) und Fruchtkörper (Fruiting body) (Chisholm und Firtel 2004)

1.2 Die Ras Superfamilie

Die Gründungsmitglieder der Ras Superfamilie K-Ras, H-Ras und N-Ras wurden in den frühen 1980er Jahren als onkogen mutiert in humanen Tumoren verschiedener Herkunft identifiziert (Krontiris und Cooper 1981, Perucho *et al.* 1981, Shih *et al.* 1981). Die onkogenen Eigenschaften dieser Proteine haben zum Interesse an der Untersuchung der biologischen Rolle von verwandten Proteinen geführt. In nahezu allen Aspekten fungiert die Ras Superfamilie als Kontrollelement des Zellverhaltens. Mitglieder dieser Familie agieren als molekulare Schalter und alternieren zwischen einem aktiven GTP-gebundenen

und einem inaktiven GDP-gebundenen Stadium (Takai *et al.* 2001). In humanen Zellen umfasst die Ras Superfamilie mehr als 150 Mitglieder, die in sechs Unterfamilien unterteilt werden: Ras, Rab, Arf, Ran, Rho und Miro (Abb. I-2.) Arf Proteine regulieren Mikrotubulidynamiken und gemeinsam mit Rab Proteinen sind sie am intrazellulären Vesikeltransport beteiligt, während Ran Proteine den nukleozytoplasmatischen Transport und die mitotischen Spindel- und Kernhüllenordnung beeinflussen (Takai *et al.* 2001). Rho GTPasen sind in eine Vielzahl von zellulären Funktionen involviert, die in der Umordnung des Aktinzytoskeletts resultieren (Hall 1998, Aspenstroem und Saras 2004). Zusätzlich beeinflussen Rho GTPasen die Zellzyklusprogression, das Zellüberleben und die Gentranskription (Arellano *et al.* 1999). Erst kürzlich sind die Miro Proteine als Regulatoren der mitochondrialen Dynamik identifiziert worden (Fransson *et al.* 2006). Da die Charakterisierung des Miro Teil dieser Arbeit ist, befindet sich in Abschnitt I.3 eine detaillierte Beschreibung des Proteins.

Im *Dictyostelium* Genom existieren 119 Gene, die für eine sehr große Anzahl an kleinen GTPasen kodieren, inklusive aller Mitglieder der mittlerweile sechs Unterfamilien: Ras, Rac/Rho, Arf/Sar1, Rab, Ran und Miro.

Die *Dictyostelium* Rho GTPasen sind in die Regulierung der Aktinpolymerisierung, Zellmorphologie, Endozytose, Zytokinese, Zellpolarität und Chemotaxis involviert.

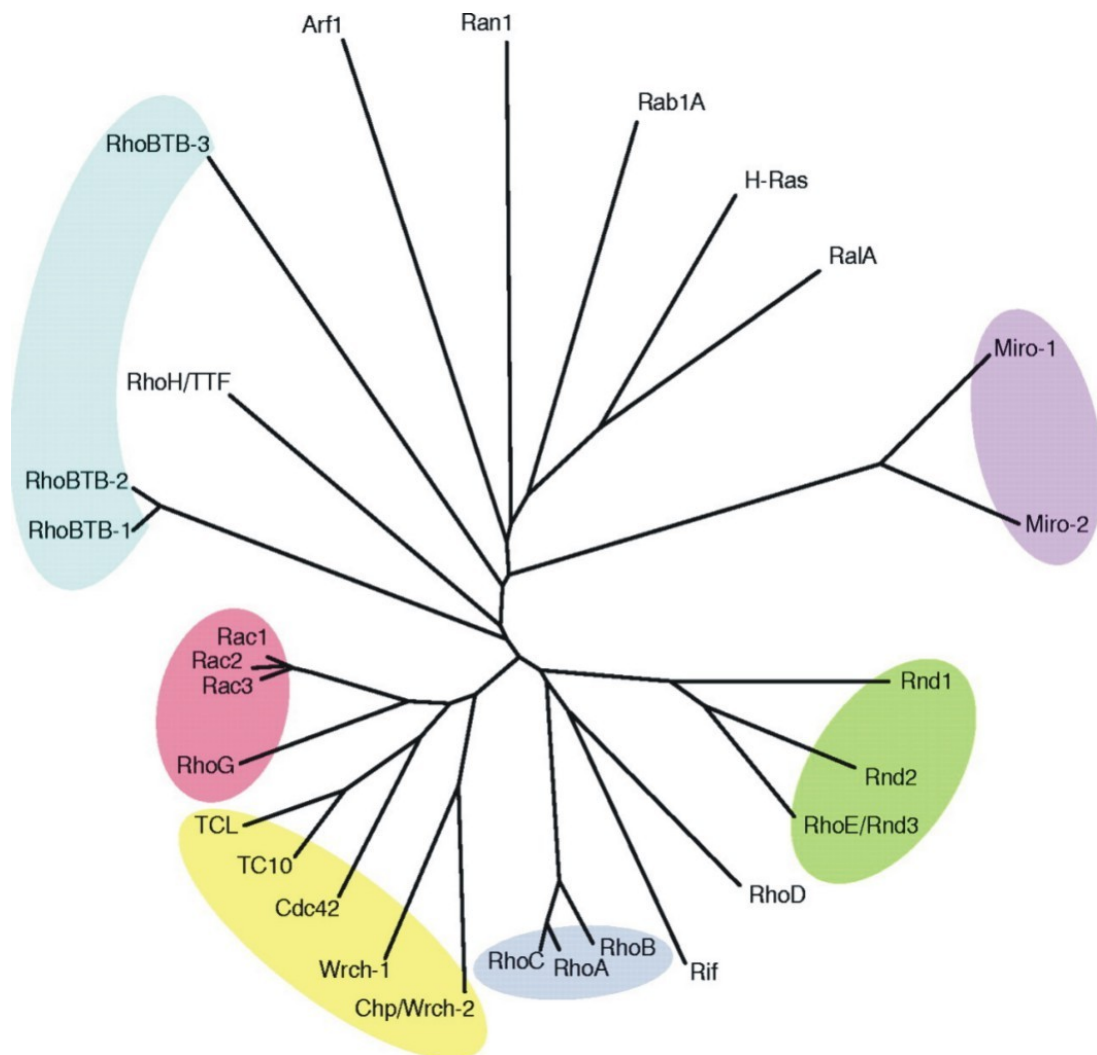


Abb. I-2: Phylogenetischer Baum der Rho GTPasen Familie und Mitglieder anderer Ras Superfamilie GTPasen. Die Rho Familie wird in Säugern in sechs Hauptzweige unterteilt: RhoA-verwandt, Rac-ähnlich, Cdc42-verwandt, Rnd Proteine, RhoBTB Proteine und Miro Proteine, die mittlerweile eine eigene Unterfamilie bilden. Abbildung nach (Wennerberg *et al.* 2005)

1.3 Lokalisation der GTPasen

Mit Ausnahme von Ran GTPasen ist die Membranassoziation eine Voraussetzung für die Funktion aller Mitglieder der Ras Superfamilie (Wennerberg *et al.* 2005). Viele Ras-ähnliche Proteine agieren an der Plasmamembran, andere lokalisieren an spezifischen, intrazellulären Membrankompartimenten. Die Proteine der Ras Superfamilie sind an den Membranen durch ihre posttranslational modifizierten Lipidresten angeheftet (Seabra und James 1998, Pechlivanis und Kuhlmann 2006). Das erste Translationsprodukt der meisten Ras und Rho GTPasen endet mit einem CAAX (C, Cystein; A, Aliphatische Aminosäure; X, jede Aminosäure) Motiv. Nach der Synthese an freien Polysomen im Zytoplasma dient eine GTPase

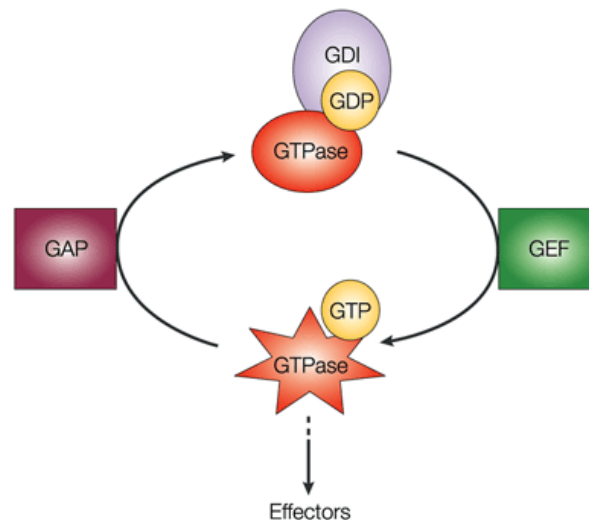
als Substrat für ein Paar Transferasen, die eine Cholesterol-ähnliche Isoprenoidgruppe an den Cysteinrest im CAAX Motiv anheftet (McTaggart 2006). Ras Proteine sind mit einem 15-Kohlenstoff-Farnesyl und Rho GTPasen mit einem 20-Kohlenstoff-Geranylgeranyl prenyliert. Die Prenylierung bringt die Proteine zum Endoplasmatischen Retikulum (ER), wo der AAX Teil proteolytisch entfernt und das freiliegende Cystein carboxymethyliert wird.

In das *Targeting* der CAAX-Proteine sind bestimmte Motive involviert (ten Klooster und Hordijk 2007). Einige Rho und Ras Proteine besitzen ein oder zwei Cysteinreste, die dem CAAX-Motiv vorgelagert sind. Dieses wird palmitoyliert und dient als sekundäres, membrangerichtetes Motiv, während in anderen Proteinen ein polybasischer Lysin/Argininabschnitt hilft, das korrekte Ziel festzustellen (Hancock *et al.* 1990, Adamson *et al.* 1992, Williams 2003). Die Arf Proteine besitzen N-terminal einen Glycinrest statt eines CAAX Motives, der durch Myristinsäure modifiziert wird (D'Souza-Schorey und Stahl 1995). Rab Proteine werden an zwei C-terminalen Zysteinresten Geranyl-geranyliert (Farnsworth *et al.* 1994).

1.3.1 Regulierung der GTPasen der Ras Superfamilie

Die Aktivität der GTPasen ist durch eine Vielzahl von Regulatorproteinen, den Guaninnukleotidaustauschfaktoren (*engl. GEFs*) und den GTPase-aktiverenden Proteinen (*engl. GAPs*) kontrolliert. Rho und Rab GTPasen werden des Weiteren durch eine dritte Klasse von Regulatoren, den Guaninnukleotid-dissoziationsfaktoren (*engl. GDI*), reguliert. Als Antwort auf extrazelluläre Stimulusaktivierung durch verschiedene Zelloberflächenrezeptoren werden die typischen Ras-ähnlichen GTPasen durch GEFs an den Zellmembranen aktiviert. GEFs fördern die Aktivierung der GTPasen durch Katalysierung der Abgabe von GDP. Bei höheren intrazellulären GTP-Konzentrationen wird die Mehrzahl von Proteinen mit GTP wieder aufgeladen und dadurch wieder in das aktive Stadium versetzt. Nach GTP-Bindung durchlaufen die GTPasen einen Konformationswechsel, die die Interaktion und Aktivierung mit nachgeschalteten Effektoren erlauben. Der GTPase Signalweg wird durch ein GAP beendet, das die normalerweise sehr niedrige intrinsische Fähigkeit der GTPasen, GTP zu hydrolysieren, steigert. In einer ruhenden Zelle werden Rho und Rab GTPasen durch zytosolische Komplexe mit einem GDI aufrechterhalten (Abb I-3). GDIs

blockieren die Abgabe von GDP und verdecken den prenylierten C-terminalen Schwanz der GTPase, der für die Membranlokalisierung notwendig ist (Keep *et al.* 1997). Es wird angenommen, dass GDIs die spezifische Auslieferung der Rho GTPasen an begrenzte Membranen, durch Interaktion mit bisher noch unbekanntem Rezeptoren, vermitteln (Dransart *et al.* 2005). Der Rho GTPase/GDI Komplex löst sich am Membraninterface auf. Dieser Schritt wird durch Interaktionen mit Proteinen ausgelöst, die als GDI-Displazierungsfaktoren (*engl. GDFs*) bezeichnet werden und/oder durch kinasevermittelte Phosphorylierung von GDI (Takahashi *et al.* 1997, Mehta *et al.* 2001, DerMardirossian *et al.* 2004). Nach Beendigung seiner Funktion und GTP-Hydrolyse, reassoziert die Rho GTPase mit dem GDI und kann anschließend von der Membran extrahiert werden. Es wird angenommen, dass die Phosphorylierung der Rho GTPasen ein Mechanismus ist, der die GDI-Bindung induziert (Ellerbroek *et al.* 2003). Ebenfalls können GDIs mit GTP-gebundenen GTPasen interagieren und sowohl die Hydrolyse als auch die Interaktion mit Effektoren inhibieren (Faure *et al.* 1999)).



Nature Reviews | Molecular Cell Biology

Abb. I-3: Der GTPase-Zyklus. Die Ras Familienproteine sind unabhängig von ihrem Aktivitätsstatus mit der Membran assoziiert. Die Interaktion mit einem spezifischen Guanidinaustauschfaktor (GEF) induziert den GDP-GTP-Austausch und aktiviert dadurch die GTPase. Dies ermöglicht die Interaktion mit Effektorproteinen und aktiviert diese Proteine. Interaktionen mit einem spezifischen GTP-aktivierenden Protein (GAP) induziert die Hydrolyse von GTP und inaktiviert die GTPase. Rho GTPasen werden von der Membran durch Guanidindissoziationsinhibitoren (GDIs) extrahiert. Die GDIs stabilisieren die inaktive GDP-gebundene Phase der GTPasen. Die Interaktion der GTPase mit GDI wird durch GDI assoziierende Faktoren (GDF) aufgehoben (nicht gezeigt), dies ermöglicht die Relokalisation der GTPase an die Membran. Abbildung nach (Coleman *et al.* 2004)

RhoGAPs (Peck *et al.* 2002, Moon und Zheng 2003) und RhoGEFs (Erickson und Cerione 2004, Buchsbaum 2007) sind typische multifunktionale Proteine, die eine Vielzahl von Domänen umfassen. Es wurden über 80 humane Gene, die für RhoGAPs kodieren, ermittelt (Bernards 2003). Die RhoGEF Familie ist ebenfalls sehr groß, sie wird durch 69 Mitglieder der Dbl Familie und durch 11 Mitglieder der erst kürzlich entdeckten Dock Familie (Rossman und Sondek 2005) repräsentiert. Nur für Rho, Rac und Cdc42 gibt es mehr als 50 verschiedene Effektoren, die identifiziert wurden (Van Aelst und D'Souza-Schorey 1997, Aspenstrom 1999). Zwei RhoGDIs wurden bisher in *D. discoideum* gefunden, RhoGDI1 und RhoGDI2 (Rivero *et al.* 2002). RhoGDI1 ist ein typisches RhoGDI und interagiert mit mehreren Rho GTPasen (Rac1a/b/c, RacB, RacC and RacE), während RhoGDI2, das in den späten Stadien der Entwicklung exprimiert wird, eher abweicht. Es fehlt der N-terminale, regulatorische Arm, der für die Interaktionen mit der GTPase verantwortlich ist, dadurch sind keine Interaktionen mit Rho GTPasen möglich. Die Vermutung besteht, dass RhoGDI2 unabhängig von der Bindung an Rho GTPasen, in Protein-Protein Interaktionen involviert ist. Abgesehen von einer Regulierung durch GAPs, GEFs und GDIs, sind verschiedene Rho GTPasen auf der Ebene der Transkription und Translation hochreguliert (Wennerberg und Der 2004).

In *Dictyostelium* kodieren 46 Gene für Proteine, die eine RhoGAP Domäne besitzen. In vielen Proteinen treten RhoGAP Domänen in Kombination mit anderen Signalproteinen auf, sowie RasGEF (in RasGEF-D und zwei RasGEF-ähnliche Proteine) (Wilkins *et al.* 2005), RhoGEF oder einer Serin/Threonin Kinase. Im Falle der RhoGEF Domäne kodieren 45 Gene für Proteine in *D. discoideum*. In einigen Proteinen erscheint die RhoGEF Domäne ebenfalls in Kombination mit anderen Signaldomänen, wie RhoGAP, RasGAP, RasGEF, ArfGAP oder einer Proteinkinase. Drei RhoGEFs sind bisher identifiziert worden, die mit Rho GTPasen interagieren und in der Chemotaxis, in die Aktinorganisation, sowie in die Zellmorphologie involviert sind.

Die meisten Mitglieder der Ras Superfamilie ändern ihre Konformation nach Bindung hauptsächlich in zwei Bereichen, den sogenannten Schalter I und Schalter II. In den Rho GTPasen erstreckt sich die Schalter I Region vom Aminosäurerest 26 bis 45 (Rac1 Nummerierung), während die Schalter II Region

die Reste 59 bis 76 einspannt (Rac1 Nummerierung). Die Schalter I Region spielt eine entscheidende Rolle bei der Interaktion mit vielen Effektorproteinen und wird daher als Effektorregion bezeichnet (Wittinghofer und Nassar 1996). Die Schalterregionen können auch als Andockstellen für GEFs (Gao *et al.* 2001) und GDIs (Hoffman *et al.* 2000) fungieren.

2. *Yersinia*

Die gram-negativen Bakterien der Gattung *Yersinia* gehören der Familie der *Enterobacteriaceae* an und umfassen 11 Spezies, von denen drei humanpathogen sind (Perry und Fetherston 1997, Sulakvelidze 2000). *Y. pestis*, das verursachende Agens der Pest, wird durch Flohbisse und Aerosole verbreitet, während das enteropathogene *Y. pseudotuberculosis* ein durch Nahrung und Trinkwasser übertragenes Pathogen ist. Es kann gastrointestinale Infektionen bei gesunden Menschen hervorrufen (Naktin und Beavis 1999). *Y. pestis* weist im Vergleich zu *Y. pseudotuberculosis* ein verkleinertes Genom auf und ist ein striktes Pathogen. Dabei ist es vom infizierten Wirt und von einer Vielzahl an essentiellen Nährstoffen wie Aminosäuren und Nukleotidvorläufern abhängig (Parkhill *et al.* 2001, Chain *et al.* 2004). *Y. enterocolitica* ist entfernt mit *Y. pestis* verwandt, und kann ähnliche Krankheiten wie *Y. pseudotuberculosis* im Menschen verursachen (Bottone 1997). Darm bewohnende *Yersinien* verursachen Yersiniose, eine fieberhafte Darmentzündung (Carter 1975). Nicht-pathogene *Yersinien* wurden aus der Nahrung und dem Wasser von kranken und gesunden Menschen isoliert (Du *et al.* 2002).

2.1 Virulenzeigenschaften von *Yersinia*

Die drei humanpathogenen Spezies von *Yersinia* teilen einige gemeinsame Virulenzdeterminanten, obwohl sie sehr unterschiedliche Krankheiten beim Menschen verursachen können. Ihre Motilität kann die Infektiosität durch *Yersinia* erhöhen (Young *et al.* 2000). Die Bindung an die extrazelluläre Matrix und den eukaryontischen Zellen wird durch verschiedene bakterielle Zelloberflächenadhäsine ermöglicht. Dabei dient das Typ III Sekretionssystem (T3SS) aus Toxinen und Antiwirtseffektorproteinen dazu, die sogenannten *Yersinia outer proteins* (Yops), in die Zielzellen einzuführen und dadurch die Aktivierung des Immunsystems zu verhindern (Viboud und Bliska 2005, Shao 2008, Zhang *et al.* 2008). Alle pathogenen *Yersinia* Stämme enthalten ein gemeinsames,

untereinander austauschbares Virulenzplasmid von ungefähr 70 Kb, das sowohl für die Komponenten des T3SS als auch für die tranlokalisierten Yops kodiert (Palmer *et al.* 1998).

2.2 *Yersinia outer protein YopE*

Yersinia enterocolitica ist ein wichtiges humanes Pathogen, das eine Vielfalt an extraintestinalen klinischen Syndromen wie z.B. die systemische Arthritis hervorrufen kann. Die Hauptstrategie von *Yersinia* besteht darin, das Wirtsimmunsystem zu umgehen, die Phagozytose durch Zellen des Wirtseigenen Immunsystems zu vermeiden und die Minderung der entzündlichen Reaktionen (DeLeo und Hinnebusch 2005). Für diesen Zweck translokalisiert *Yersinia* mehrere sogenannter *Yersinia Outer Proteins* (Yops) in die Wirtszelle durch das Typ III Sekretionssystem (Foultier *et al.* 2003, Marenne *et al.* 2003, Trosky *et al.* 2008). Die Yop Effektorproteine (Abb. I-4) greifen durch verschiedene eukaryontische Zellsignalwege ein und/oder zerstören das Zytoskelett durch einen speziellen Weg. YopH ist eine Phosphotyrosinphosphatase, die die Komponenten der Fokaladhäsionskomplexe in Säugerzellen inaktiviert (Deleuil *et al.* 2003) und die Apoptose von infizierten T-Zellen induziert (Bruckner *et al.* 2005). Dennoch scheint YopH eine ausgeprägtere Rolle für die Pathogenese von *Y. pestis* und *Y. enterocolitica* zu spielen als für *Y. pseudotuberculosis* (Trulzsch *et al.* 2004, Viboud und Bliska 2005).

YopE, ein weiteres *Yersinia* Effektorprotein, welches das Zytoskelett von Säugerzellen angreift, ist ein GTPase aktivierendes Protein (GAP). *In vitro* ist YopE ein GAP für Rho, Rac und Cdc42 (Black und Bliska 2000, Von Pawel-Rammingen *et al.* 2000). YopE zerstört das Aktinzytoskelett (Aepfelbacher 2004) und inhibiert entzündliche Reaktionen (Viboud *et al.* 2003, Schotte *et al.* 2004). Infektionstudien in Mäusen haben gezeigt, dass YopE ein sehr wichtiger Virulenzfaktor für die Pathogenese aller pathogenen Yersinien darstellt (Viboud und Bliska 2005).

Zwei andere Yop Effektoren, YopJ and YopM, beeinträchtigen die Signaltransduktionswege im Zytosol oder Nukleus. YopJ ist eine Zysteinprotease, die die MAPK and NF- κ B Signalwege inhibiert und dadurch die Apoptose in Makrophagen fördert (Zhang *et al.* 2005, Zhou *et al.* 2005). YopM besteht hauptsächlich aus Leucin-reichen Wiederholungen und hat keine offensichtliche enzymatische Aktivität. Interessanterweise akkumuliert YopM im Nukleus, obwohl

kein erkennbares nukleäres Lokalisationssignal vorhanden ist (Benabdillah *et al.* 2004).

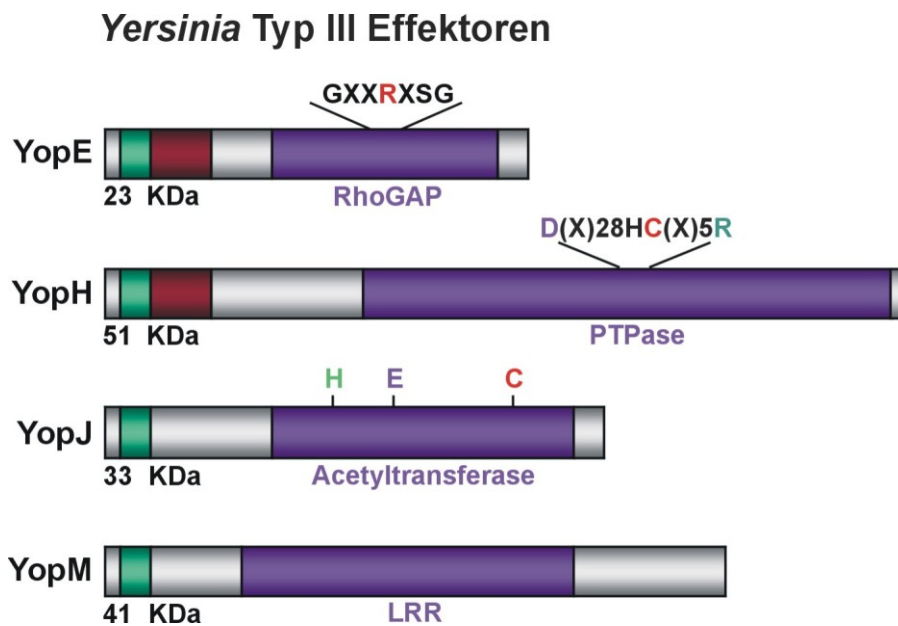


Abb. I-4: Domänenstruktur von vier *Yersinia* Typ III Effektoren. Die funktionellen Effektor-domänen (blau), die Typ III Sekretionsregion (grün) und die Chaperon-bindenden Domänen (rot) sind dargestellt. Die katalytischen Motive oder Reste sind für YopE, YopH und YopJ hervorgehoben. Abbildung modifiziert nach F. Shao, *Current Opininion in Microbiology*, 2008

3. Die Miro GTPasen

Die Miro GTPasen (Mitochondrial Rho) wurden in einem *Screen* für neue Ras-ähnliche GTPasen identifiziert (Fransson *et al.* 2003). In früheren Studien wurde den Miro Proteinen eine Rolle an der Regulierung der mitochondrialen Morphologie und eventuell der Apoptose zugeschrieben (Fransson *et al.* 2003, Frederick *et al.* 2004). In *H. sapiens* wurden bisher zwei Gene, *miro1* und *miro2*, identifiziert, die für Miro Proteine kodieren. Sie besitzen zwei GTPase Domänen, die von einem Paar kalziumbindender EF-Hände flankiert werden und weisen eine C-terminale Transmembrandomäne auf. (Abb. I-5) Da die N-terminale GTPase Domäne Ähnlichkeiten mit anderen Rho GTPasen besitzt, wurden sie anfänglich als Rho GTPasen klassifiziert (Fransson *et al.* 2003). Allerdings wurden die Miro Proteine aufgrund der unterschiedlichen strukturellen und funktionellen Eigenschaften einer separaten Unterfamilie, der Miro Unterfamilie, zugeordnet (Wennerberg und Der 2004, Boureux *et al.* 2007). Bisher ist die Funktion der zweiten GTPase noch unbekannt. Den Miro Proteinen fehlt die Rho spezifische

Insertion, diese Besonderheit unterscheidet die Rho Familie von ihren Ras Verwandten. Darüber hinaus fehlt ihnen die Schalter II Domäne (G3 Motiv) und es fehlt die für Rho GTPasen typische CAAX-Box. Stattdessen besitzen sie am C-terminus eine Transmembranregion, die für die Verankerung der Miro Proteine in die äußere mitochondriale Membran essentiell ist. Die übrigen Domänen sind zum Zytosol exponiert. Die spezifische Struktur von Miro impliziert, dass diese Proteine unterschiedlich reguliert werden als andere Ras-ähnliche GTPasen.

Proteine der Miro Familie (Abb. I-6) fungieren als potentielle Regulatoren in der mitochondrialen Dynamik in verschiedenen Wegen. Das *S. cerevisiae* Miro, Gem1p, ist essentiell für die Erhaltung der tubulären, mitochondrialen Morphologie, allerdings scheint es keine Rolle in den Teilungs- und Fusionsereignissen der Mitochondrien zu spielen. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass für die einwandfreie Funktion das vollständige Protein notwendig ist (Frederick *et al.* 2004, Frederick *et al.* 2008).

In *D. melanogaster* führt eine starke Überexpression von Miro zu einer gestörten mitochondrialen Verteilung. Des Weiteren führt das Fehlen von dMiro zu einer beeinträchtigten, larvalen Fortbewegung und ebenfalls zu einer gestörten mitochondrialen Verteilung in Nerven und Muskeln. Es wird angenommen, dass Miro eine kontrollierende Funktion im anterograden Transport der Mitochondrien und in ihrer korrekten Verteilung innerhalb der Nervenenden einnimmt (Guo *et al.* 2005).

In *A. thaliana* sind zwei Orthologe der Miro GTPasen charakterisiert worden. Die EMB2473/MIRO1 Mutante weist abnormal verlängerte oder röhrenförmige Mitochondrien auf, die zur Zerstörung der kontinuierlichen Strömung der Mitochondrien in den wachsenden Pollenschlauch führen. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass Miro1 eine entscheidende Rolle im Prozess der Embryogenese spielt, während Mutationen im MIRO2 Gen keinen offensichtlichen Einfluss auf die Pflanzenentwicklung ausüben (Yamaoka und Leaver 2008).

In *D. discoideum* wurde bisher ein Gen, *gemA*, identifiziert, welches für ein 658 Aminosäuren langes Protein, kodiert. Das *Dictyostelium* Miro zeigt ebenfalls, die für alle Miro Proteine charakteristische Domänenarchitektur.



Abb. I-5: Domänenstruktur von Miro. Miro Proteine bestehen aus einer N-terminalen GTPase, zwei EF-Hände Domänen, die Kalzium binden können, einer weiteren zweiten GTPase und einer C-terminalen Transmembranregion, die das Protein an die äußere mitochondriale Membran verankert.

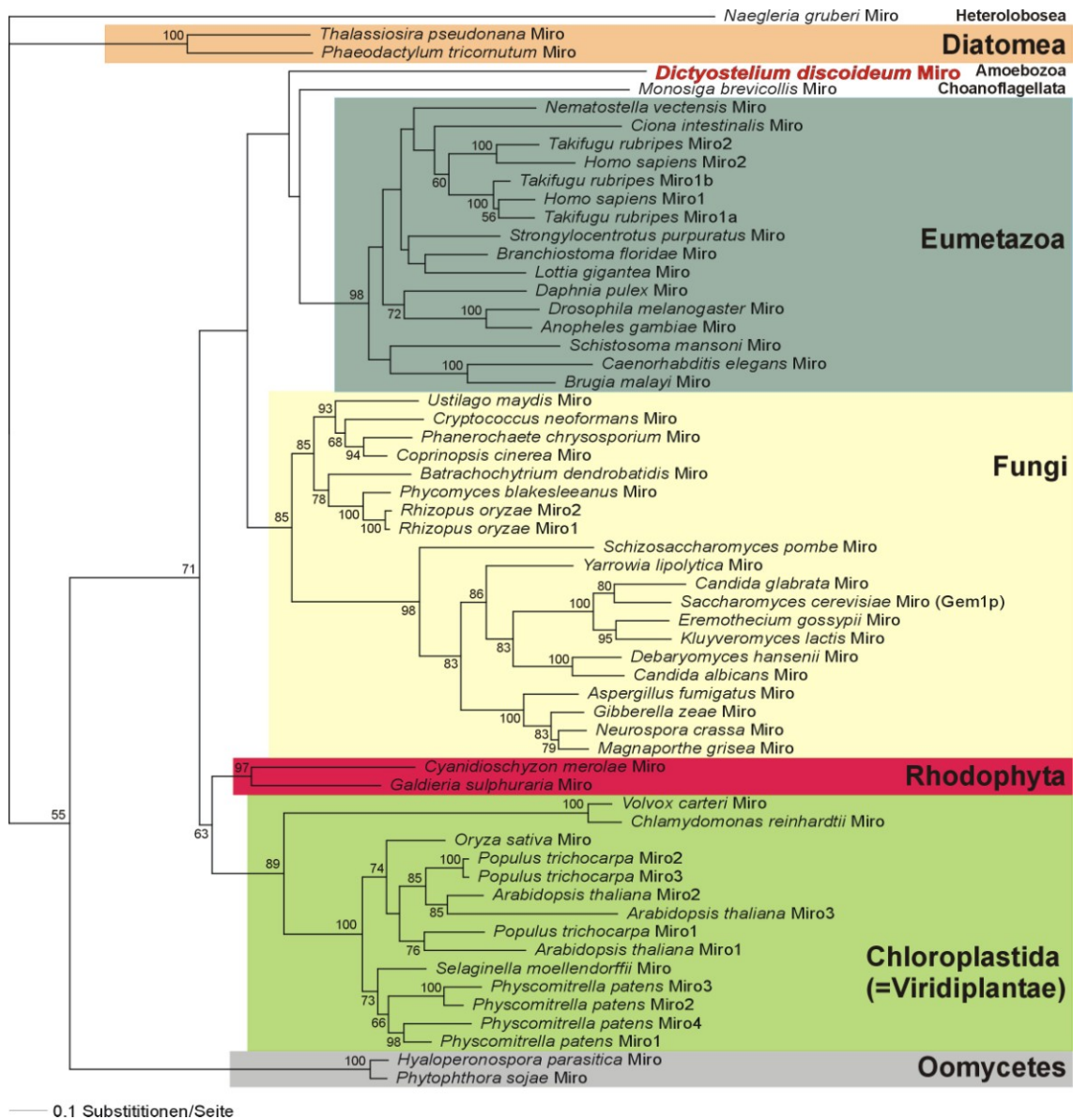


Abb. I-6 Maximale Wahrscheinlichkeit des phylogenetischen Baums der Miro Proteine. Die Bootstrap-Werte basieren auf 100 Replikanten. Das *D. discoideum* Miro ist mit den Miro Proteinen der Opisthokonten verwandt. Abb. freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. M. Elias, Charles University Prague, Czech Republik

3.1 Die Mitochondrien

Mitochondrien spielen Schlüsselrollen in vielen grundlegenden biologischen Prozessen. Ihre Hauptaufgabe besteht darin, Energie von Nährstoffmolekülen zu dem energiebringenden Molekül ATP zu konvertieren, so dass es zellulären Reaktionen zugeführt werden kann. Ebenfalls sind Mitochondrien in die Kalziumhomeostase sowie in die Apoptose involviert (Fransson *et al.* 2003). Eine beeinträchtigte, mitochondriale Funktion kann zu einer Vielzahl von verschiedenen Krankheiten führen (Schapira 1998, DiMauro 2004, Marin-Garcia und Goldenthal 2008).

Mitochondrien sind von zwei spezialisierten Membranen umgeben, einer glatten äußeren Membran und einer gewundenen, inneren Membran. Diese zwei Membranen grenzen den funktionell unterschiedlichen Intermembranraum (der Raum zwischen der äußeren und inneren Membran) von der Matrix (der Bereich, der durch die innere Membran umgeben ist) ab. Die innere Membran besitzt viele Einstülpungen (auch Cristae genannt), die mit dem Intermembranraum durch schmale, tubuläre Anschlussstellen verknüpft sind. Die Cristae können den Oberflächenbereich, in dem die ATP Produktion stattfindet, ausweiten. Mitochondrien, die sehr hohe Mengen an Energie verbrauchen, besitzen mehr Cristae als typische Mitochondrien.

Mitochondrien enthalten DNA, die für eine ausgewählte Menge an mitochondrialen Proteinen kodiert, wobei der Hauptanteil an mitochondrialen Proteinen im Kern kodiert wird. Die mitochondriale DNA (mtDNA) ist zirkulär und befindet sich in der Matrix. Das mitochondriale Genom von *D. discoideum* (Abb. I-7) beträgt 55564 Bp mit einem A + T Anteil von 72,6%. Die identifizierten Gene bestehen aus ribosomalen RNAs (rnl and rns), 18 tRNAs, und zehn Untereinheiten des NADH-Dehydrogenasekomplexes (nad1, 2, 3, 4, 4L, 5, 6, 7, 9 und 11) Des Weiteren sind ein Apocytochrom b (cytb), drei Untereinheiten der Cytochromoxidase (cox1/2 und 3), vier Untereinheiten des ATP-Synthasekomplexes (atp1, 6, 8 und 9), 15 ribosomale Proteine und fünf ORFs vorhanden. Besonderheiten der mitochondrialen DNA von *D. discoideum* sind unter anderem, dass alle Gene auf einem Strang der DNA kodiert werden und ein universeller genetischer Code verwendet wird. Weiterhin besitzt das *cox1* Gen kein Terminierungscodon und ist mit dem abwärts ligenden *cox2* Gen fusioniert. Die 13 Gene für die ribosomalen Proteine und die vier ORF Gene bilden eine 15,4 Kb große Ansammlung mit

verschiedenen Genen, die sich überlappen. Des Weiteren ist die Anzahl der tRNAs, die im Genom kodiert sind, nicht ausreichend für die Unterstützung der Synthese mitochondrialer Proteine (Ogawa *et al.* 2000).

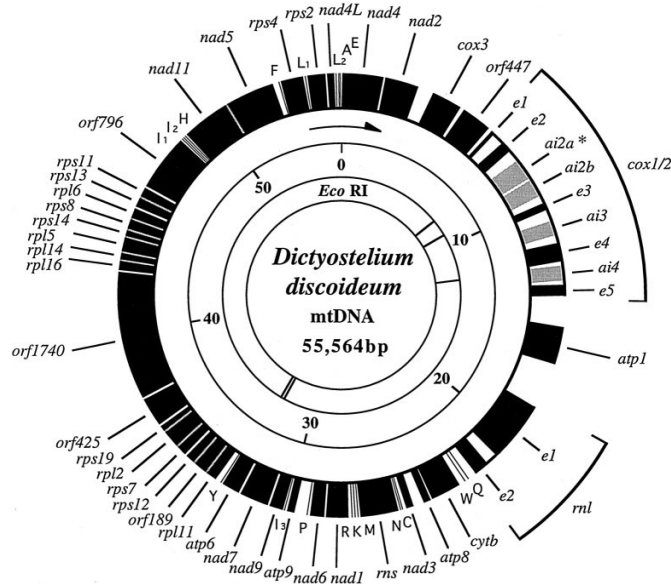


Abb. I-7: Physikalische und genetische Karte der *D. discoideum* mtDNA. Hergeleitete Gene, Exons (e) und *open reading frames* (ORFs) sind als schwarze Boxen angezeigt. Introns mit intronischen ORFs (gepunktete Blöcke) werden als schwarze Boxen dargestellt. Die dünnen Balken deuten die tRNA Gene durch ihre korrespondierende Aminosäure im Ein-Buchstaben-Code an und intergenische Schattierung die überlappenden Gene. Die Pfeile zeigen die Richtung der Transkription an. Die inneren Kreise geben eine Größenskala (in Kb) und die EcoRI Restriktionsstellen an. (Stern: Gen, das durch intronische ORF kodiert wird, ist eine seitenspezifische DNA Endonuklease) Abbildung nach S. Ogawa, *Molecular Genetics and Genomics*, 2000

3.1.1 Mitochondriale Transport

Das mitochondriale Transportsystem unterscheidet sich in den verschiedenen Spezies. Mitochondrien werden entlang zytoskeletaler Elemente verankert und transportiert. In Säugerzellen wird der mitochondriale Transport durch Mikrotubuli vermittelt, (Rapp *et al.* 1996, Wiemer *et al.* 1997), während in Pflanzen und in bestimmten Pilzen, inklusive der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*, der Transport hauptsächlich durch Aktinflamente vermittelt wird (Hoepfner *et al.* 2001). In *Schizosaccharomyces pombe* hingegen, scheint die mitochondriale Beweglichkeit Motorunabhängig und durch die Mikrotubulidepolymerisierung angetrieben zu werden (Yaffe *et al.* 2003). Es wird ebenfalls angenommen, dass Intermediärfilamente mit Mitochondrien assoziieren können. Für *Dictyostelium* wird

angenommen, dass der mitochondriale Transport entlang der Mikrotubuli stattfindet, ähnlich dem, der Säugerzellen (Fields *et al.* 2002).

In *Drosophila* sowie im Menschen konnte gezeigt werden, dass die Miro Proteine die mitochondriale Bewegung durch das Mikrotubulisystem regulieren (Guo *et al.* 2005, Fransson *et al.* 2006). Das *Drosophila* Miro zeigt eine Bindung mit dem Adapterprotein Milton, das erstmals in *Drosophila* identifiziert wurde (Gorska-Andrzejak *et al.* 2003). Es bildet dabei einen Komplex mit der schweren Kette des Kinesins aus (Rice und Gelfand 2006). Eine Interaktion von humanem Miro mit dem Milton verwandten Kinesin-bindenden Proteinen OIP106 and GRIF1 konnte ebenfalls gezeigt werden. Dies führte zur Vermutung, dass die Miro GTPasen eine Verbindung zwischen den Mitochondrien und dem Transportsystem der Mikrotubuli herstellt (Fransson *et al.* 2006). Biochemische sowie genetische Untersuchungen belegen, dass die Kinesinrekrutierung und der mitochondriale Transport unabhängig von der leichten Kette des Kinesins (*engl. KLC*) stattfindet. Die KLC antagonisiert mit der Assoziation von Milton an der schweren Kette des Kinesins (*engl. KHC*). Dadurch entsteht eine direkte Interaktion zwischen Milton und Miro, diese kann die Rekrutierung von Milton zu den Mitochondrien beeinflussen. Dadurch können Milton und Miro einen essenziellen Proteinkomplex ausbilden, der die KHC mit den Mitochondrien verbindet. Ein, von der leichten Kette des Kinesins unabhängiger, anterograder Transport der Mitochondrien kann somit stattfinden (Glater *et al.* 2006, Rice und Gelfand 2006).

4. Zielsetzung

4.1 *Yersinia outer protein YopE*

Die soziale Amöbe *D. discoideum* ist für die Analyse der Funktion von Virulenzfaktoren so wie es für *Legionella pneumophila* (Hagele *et al.* 2000), *Pseudomonas aeruginosa* (Cosson *et al.* 2002) *Mycobacterium spp* (Solomon *et al.* 2003) und *Vibrio cholerae* (Pukatzki *et al.* 2006) gezeigt werden konnte. Der Vorteil dieser sozialen Amöbe als neuer Wirtsmodellorganismus für die Pathogenese liegt in ihrer Fähigkeit zu phagozytieren, was den Organismus in nahe Beziehung zu professionellen Säugerphagozytieren bringt. Die notwendigen Komponenten für die Reorganisation des Zytoskeletts während der Phagozytose sind vom einfachen Eukaryonten bis hin zum Menschen hochkonserviert. Da das

Zytoskelett eines der Hauptziele der Pathogene ist, kann *D. discoideum* eine gute Alternative für die Analyse der zellulären Aspekte der Pathogenese sein.

Um herauszufinden, ob *Dictyostelium* ein passendes Modell für die *Yersinia* Virulenzfaktoren darstellt, wurde YopE, YopH, YopJ und YopM von *Yersinia pseudotuberculosis de novo* innerhalb der sozialen Amöbe exprimiert. Deren Effekte sollen auf das vegetative Wachstum, die Phagozytose und die Zytokinese hin untersucht werden. Des Weiteren soll deren Einfluss auf die F-Aktinmenge und Verteilung, die Antwort der Aktinpolymerisierung nach Stimulierung mit cAMP sowie die Chemotaxis der Amöbe erforscht werden. Ein weiterer wichtiger Aspekt ist die Beantwortung der Frage, ob *D. discoideum* Rho GTPasen ein Ziel für YopE wie es in Säugerzellen gezeigt wurde, sind (Aili *et al.* 2006).

4.2 *D. discoideum* Miro

Mit Hilfe des Modellorganismus *D. discoideum* sollen die biochemischen und funktionellen Aspekte von Miro untersucht werden. Dabei soll mit Hilfe von GFP-Fusionskonstrukten die Lokalisation von Miro in *D. discoideum* aufgezeigt werden. Weiterhin soll anhand einer *gemA* defizienten Zelllinie die Rolle von Miro in Aktinzytoskelett-spezifischen Versuchen wie Wachstum, Endo-und Exozytose, Chemotaxis sowie Entwicklung untersucht werden. Weiterhin ist von Interesse, die mitochondriale Funktion von Miro in Mitochondrien-spezifischen Studien zu erforschen und einen möglichen Zusammenhang des Proteins im Transport der Mitochondrien entlang des *D. discoideum* Mikrotubulinnetzwerkes aufzuzeigen.

II Material und Methoden

1 Material

Alle, in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien der Qualität *pro analysis* (p.a.) und Enzyme, wurden von den Firmen Biozym, Fluka bzw. Sigma, Gibco™ bzw. Invitrogen, Life Technologies, Merck und New England Biolabs (NEB), VWR oder Roche bezogen. Falls von weiteren Firmen Chemikalien, Enzyme oder andere Verbrauchsmaterialien genutzt wurden, werden diese an entsprechender Stelle aufgeführt. Verwendete Lösungen und Puffer, die im Folgenden nicht aufgeführt sind, wurden nach (Sambrook und Russell 2001) hergestellt.

1.1 Kits

Die in dieser Arbeit verwendeten kommerziell erhältlichen Kits sind nach Herstellerangaben unter Verwendung der angegebenen oder mitgelieferten Hilfsmittel, Lösungen und Chemikalien eingesetzt worden.

High Pure PCR Preparation	Roche
Nucleobond AX	Macherey-Nagel
NucleoSpin Extract II	Macherey-Nagel
High pure PCR Product Purification Kit	Roche
pGEM-Teasy™ Vector System	Promega
RNeasy Midi Kit	Quiagen
Mitochondria Staining Kit	Sigma
ENLITEN ATP Assay System	Promega
Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrat	Pierce

1.2 Enzyme, Antikörper und Inhibitoren

1.2.1 Enzyme für die Molekularbiologie

Alkalische Phosphatase (CIP)	Roche
Desoxyribonuklease I (DNase I)	Roche
Klenow Fragment (DNA Polymerase)	Roche
Lysozym	Sigma
Proteinase K	Sigma
Ribonuklease H (RNase H)	Roche
Ribonuklease A (RNase A)	Sigma

T4 DNA Ligase	Roche
Taq-Polymerase	Roche
M-MLV Reverse Transkriptase	Promega
Restriktionsendonukleasen	Amersham, NEB, Jena Bioscience

1.2.2 Primäre Antikörper

Maus anti-Aktin monoklonaler Antikörper Act 1-7	(Simpson <i>et al.</i> 1984) Maus
anti-GFP monoklonaler Antikörper K3-184-2	(Noegel <i>et al.</i> 2004)
Maus anti-Rac1 monoklonaler Antikörper 273-100-2	(Dumontier <i>et al.</i> 2000)
Maus csA 33-294 monoklonaler Antikörper	(Bertholdt <i>et al.</i> 1985)
Maus anti- <i>pspA</i> (<i>mud1</i>) monoklonaler Antikörper	(Kreff und Weijer 1989)
Maus anti-K72-642-1 monoklonaler Antikörper	diese Arbeit
Maus anti-K72-642-2 monoklonaler Antikörper	diese Arbeit
Maus anti-myc monoklonaler Antikörper	A.A. Noegel (n. v.)
Maus anti-PDI monoklonaler Antikörper	(Monnat <i>et al.</i> 1997)
Maus anti-Comitin monoklonaler Antikörper	(Weiner <i>et al.</i> 1993)
Maus anti-VatA monoklonaler Antikörper	(Jenne <i>et al.</i> 1998)
Maus anti-Vakuolin monoklonaler Antikörper	(Jenne <i>et al.</i> 1998)
Ratte anti-Tubulin monoklonaler Antikörper	(Wehland <i>et al.</i> 1983)

1.2.3 Sekundäre Antikörper

Ziege anti-Maus-IgG, Peroxidase-Konjugat	Sigma
Ziege anti-Kaninchen-IgG, Peroxidase-Konjugat	Sigma
Ziege anti-Maus-IgG, Cy3 Konjugat	Sigma
Ziege anti-Maus-IgG, Alexa Fluor 488 Konjugat	Invitrogen
Ziege anti-Ratte-IgG, Alexa Fluor 488 Konjugat	Invitrogen

1.2.4 Inhibitoren

Protease Inhibitor Cocktail	Sigma
PMSF	Sigma
Nocodazol	Sigma

1.3 Antibiotika

Folgende Antibiotikallösungen werden in den angegebenen Konzentrationen verwendet. Alle Antibiotika wurden in H₂O gelöst, sterilfiltriert und bei -20 °C gelagert.

Ampicillin	Grünenthal
Blasticidin S	Biomedicals
Kanamycin	Sigma
Chloramphenicol	Sigma
Dihydrostreptomycinsulfat	Sigma
Geneticin (G418)	Sigma
Tetrazyklin	Sigma

1.4 Fluoreszenzfarbstoffe

MitoTracker Red	Invitrogen
MitoTracker Green	Invitrogen
DCFH-DA	Invitrogen

1.5 Radiochemikalien

Zur radioaktiven Markierung doppelsträngiger DNA wurde Adenosin 5' [α -³²P]-triphosphat (10 mCi/ml) der Firma Amersham verwendet.

1.6 Medien und Puffer

Die Herstellung sämtlicher Lösungen wurde mit entionisiertem Wasser aus einer Reinstwasseranlage von Millipore durchgeführt.

Für die Arbeiten mit RNA wurde DEPC behandeltes Wasser verwendet und die Oberflächen mit „RNase Away“ behandelt.

Puffer und Lösungen, die hier nicht verzeichnet sind, finden sich unter den jeweiligen Methoden.

1.6.1 Bakterienmedien Sambroock et al., 1989

LB-Medium

10 g Bacto-Trypton

5 g Hefeextrakt

5 g (85,5 mmol) NaCl

pro 1 Liter Wasser, pH-Wert mit NaOH auf 7,4 einstellen.

SOC-Medium:

20 g Bacto-Trypton

5 g Hefextrakt

0,5 g NaCl

20 mM Glukose

auf 1 l mit Wasser auffüllen.

Zur Herstellung von Agarplatten wird den Medien 0,9 % (w/v) Agar und bei Bedarf 100 mg/l Ampicillin oder 50 mg/l Kanamycin zugesetzt. Die Medien werden anschliessend autoklaviert.

Für die Blau/Weiss Selektion von *E. coli* Transformanten werden 10 µl 0,1 M IPTG und 30 µl X-gal Lösung (2% in Dimethylformamid) auf die Platte verteilt und diese bei 37 °C inkubiert, mindestens 30 min vor Anwendung.

1.6.2 Medien und Puffer für *D. discoideum* KulturAX2-Medium, pH 6,7 (Claviez *et al.*, 1982):

7,15 g Hefeextrakt

14,3 g Pepton (Proteose)

18,0 g Maltose

0,486 g KH₂PO₄

0,616 g Na₂HPO₂ x H₂O

mit H₂O auf 1 Liter auffüllen

Phosphatagarplatten, pH 6,0:

9 g Agar mit Soerensenphosphatpuffer pH 6,0 auf 1 Liter auffüllen

Salzlösung (Bonner, 1947):

10 mM NaCl

10 mM KCl

2,7 mM CaCl₂

SM Agarplatten, pH 6,5 (Sussman, 1951):

9 g Agar

10 g Pepton

10 g Glukose

1 g Hefeextrakt

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

2,2 g KH_2PO_4

1 g K_2HPO_4

mit H_2O auf 1 Liter auffüllen

Soerensenphosphatpuffer, pH 6,0 (Malchow, 1972):

2 mM Na_2HPO_4

14,6 mM KH_2PO_4

1.6.4 Puffer und andere Lösungen10x NCP-Puffer, pH 8,0:

12,1 g Tris/HCl

87,0 g NaCl

5,0 ml Tween 20

2,0 g Natriumchlorid

mit H_2O auf 1 Liter auffüllen

PBG, pH 7,4:

0,5 % Rinderserumalbumin

0,1% Gelatine (Kaltwasserfischhaut)

in 1x PBS, pH 7,4

1x PBS, pH 7,4:

8,0 g NaCl

0,2 g KH_2PO_4

1,15 g Na_2HPO_4

0,2g KCl

mit H_2O auf 1 Liter auffüllen, autoklavieren und auf pH 7,4 einstellen

1,2 M Phosphatpuffer, pH 6,8:

1,2 M Na_2HPO_4 , pH 9,1 wird mit 1,2 M NaH_2PO_4 , pH 4,0 im Verhältnis von 2:1 gemischt.

TE Puffer, pH 8,0:

10 mM Tris/HCl, pH 8,0

1 mM EDTA, pH 8,0

10x TAE Puffer, pH 8,3:

2 M Tris

16,6 M Eisessig

50 mM EDTA

10 x TBE-Puffer (pH 8,3):

0,9 M Tris

0,9 M Borsäure

20 M EDTA

TBS-Puffer:

150 mM NaCl

50 mM TrisHCl, pH 7,4

10x MOPS (pH 7.0/ pH 8.0):

41.9 g MOPS

3 M Na-Acetat

0.5 M EDTA

mit H_2O auf 1 Liter auffüllen

1.7 Biologisches Material

1.7.1 Bakterienstämme

E. coli: XL1 blue (Bullock *et al.*, 1987)

K. aerogenes: (Williams und Newell, 1976)

1.7.2 *Dictyostelium discoideum* Stämme

AX2-214: ein axenisch wachsendes Derivat des Wildtyp-Stammes NC-4, allgemein als AX2 bezeichnet (Raper, 1935).

1.8 Plasmide

pGEM Teasy™	Promega
pQE-30	Quiagen
pBs-Bsr	nicht veröffentlicht
pDEX-GFP-RH	diese Arbeit
MB38-gfp	diese Arbeit
MB38-gfp-yopE	diese Arbeit
pDEX-GFP-Rach	(Somesh <i>et al.</i> 2006)
pDEXbsr- myc-yopE	diese Arbeit

1.9 Oligonukleotide

Für die Polymerasekettenreaktion eingesetzten Oligonukleotide werden von der Firma MWG-Biotech AG in Ebersberg bezogen.

Miro-fwd/R	5'-GAA TTC ATG AAA AAT AAC ATA AAG GTT ATT TTA ATT G
Miro-rev/B	5'-GGA TCC TTA TTT TTT AGC TAA ATA TTT ACT TAA AAG
Miro™-fwd	5'-GGA TCC AAT TCC ATT TAT CAC GAG ATG
Miro™-rev	5'-GAA TTC TTA TTT TTT AGC TAA ATA TTT ACT TAA AAG
mycYopE-fwd	5'-GAA TTC AAA ATG GAA CAA AAA TTA ATT TCA GAA GAA GAT TTA ATG AAA ATA TCA TCA TTT ATT TCT ACA TC
YopE-rev	5'-AAG CTT TTA CAT CAA TGA CAG TAA TTT CTG

1.9.1 Oligonukleotide für das *gemA* Knockoutkonstrukt

MiroKO/A-fwd	5'-TTT AGA AGC TTT GGA TTG TGA AAA GAT GG (HindIII)
MiroKO/B-rev	5'-CTG CAG AGT AAA CTA TTA CAA TTG CAT CAG C (PstI)
Miro™(C)-fwd	5'-GGA TCC AAT TCC ATT TAT CAC GAG ATG (BamHI)
MiroKO/D-rev	5'-TCT AGA TCT CTA ATA CCA TCA TTA TTA GTA AGG GTC TAG ACT (XbaI)

1.9.2 Oligonukleotide für den *gemA* PCR Screen

MiroKO-fwd	5'-AAA GAG TAT CAA AAT GCT GAA TCC
MiroKO-rev	5'-GATGGGATTAATTAATTTGTAATC 3' (Bsr actin15promoter-r)

Miro-fwd/B	5'-GGA TCC ATG AAA AAT AAC ATA AAG GTT ATT TTA ATT GG
Miro-rev/R	5'-GAA TTC TTA TGC ACG TTC ACA TCC TTC AGT C (GTPase 1)
RhoGDI rev/R	5'-GAA TTC TTA ATC ATC ATC CTT CCA GCT AGA TTT AAT 3'
RhoGDI uni/RB	5'-GAA TTC GGA TCC ATG TCA GAT AAT CAC GAA

1.9.3 Oligonukleotide für die *gemA* Sonde

Miro-probe-f	5'-GAA CAA CGA TGA ATA CCT TAA TAA TAC C
Miro-probe-r	5'-TAA ATT AGT TTC TCT ATG AAT TGT TTC G

2 Methoden

2.2.1 Kultivierung von *D. discoideum*

2.2.1.1 Anzucht von *D. discoideum* auf SM Agarplatten

Dictyostelium Zellen werden auf SM-Agarplatten ausplattiert, die mit *Klebsiella aerogenes* überzogen sind und werden bei 21 °C für drei bis vier Tage inkubiert, bis sich auf dem Bakterienuntergrund *D. dictyostelium* Kolonien („Plaques“) bilden. Um einzelne Klone von *Dictyostelium* zu erhalten, werden 50-200 Zellen in 100 µl Soerensenphosphatpuffer resuspendiert und auf mit *Klebsiella* überzogenen SM-Agarplatten ausgestrichen. Nach der Inkubation bei 21 °C für 3-4 Tage werden einzelne Klone mit sterilen Pipettenspitzen gepickt und in eine Petrischale mit AX2-Medium transferiert, welches Dihydrostreptomycin (10 µg/ml) und andere erforderliche Antibiotika (abhängig von der Mutante) enthält.

2.2.1.2 Entwicklung von *D. discoideum* auf Phosphatagarplatten

Die mit Soerensenphosphatpuffer mediumfrei gewaschenen Zellen werden auf eine Zelldichte von 2×10^7 Zellen/ml in Soerensenphosphatpuffer resuspendiert. Je 5 ml dieser Suspension mit insgesamt 1×10^8 Zellen werden auf eine Phosphatagarplatte ausplattiert, die Zellen 15 min absitzen lassen, der überschüssige Puffer abgenommen und die Zellen bei 21 °C inkubiert. Unter diesen Bedingungen durchlaufen die Zellen einen Entwicklungszyklus, der nach ungefähr 24 h mit der Ausbildung eines Fruchtkörpers beendet ist.

2.2.1.3 Entwicklung von *D. discoideum* in Suspensionskultur

Der Entwicklungs- und Differenzierungsprozess bei *D. discoideum* wird durch Nahrungsentzug induziert, der von der Expression entwicklungsregulierter Gene begleitet wird. Zellen werden in Schüttelkultur auf eine Zelldichte von $2\text{-}3 \times 10^6$ Zellen/ml kultiviert, durch Zentrifugation bei 2.000 Upm (Sorvall RT7 Zentrifuge) für 2 min bei 4 °C pelletiert und zweimal in gleichem Volumen kaltem Soerensenphosphatpuffer gewaschen, um alle Nahrungskomponenten, die sich im Kulturmedium befinden, zu entfernen.

Für die Entwicklung in Suspensionskultur wachsen die Zellen in Soerensenphosphatpuffer zu einer Zelldichte von 1×10^7 Zellen/ml, bei 160 Upm und 21 °C, auf dem Schüttler heran.

2.2.1.4 Anzucht von *D. discoideum* in Flüssigkultur

Durch Inokulation von Sporen oder Amöben von *K. aerogenes* Rasen auf SM-Agarplatten können der AX2-Wildtypstamm sowie seine Transformanten in AX2-Flüssigmedium kultiviert werden. Bei der Kultivierung der Transformanten ist die Zugabe des entsprechenden Antibiotikums zur Resistenz notwendig. Erfolgt die Kultivierung von SM-Agarplatten wird Dihydrostreptomycin (10 µg/ml) hinzugefügt, um restliche *K. aerogenes* zu entfernen. In Schüttelkultur beträgt die Generationszeit bei 21 °C und 160 Upm ca. 9-10 Tage. Eine weitere Möglichkeit ist, die Zellen in Petrischalen in AX2-Medium zu kultivieren. Hierbei wird das Medium ein- bis zweimal pro Woche gewechselt und bei den Transformanten das entsprechende Selektionsmedium hinzugesetzt.

2.2.1.5 Aufbewahrung von *D. discoideum*

D. discoideum Zellen wachsen in AX2-Medium zu einer Dichte von $4\text{-}5 \times 10^6$ Zellen/ml heran. 900 µl der dichtgewachsenen Kultur wird auf Eis überführt und mit 100 µl Pferdeserum und 100 µl DMSO versetzt. Nach Überführung in Kryoröhrchen (1ml) werden die Aliquots für 30 min auf Eis inkubiert, gefolgt von einer weiteren Inkubation bei -20 °C für mindestens 2 Stunden. Anschließend werden die Aliquots bei -80 °C gelagert. Um die gefrorenen *Dictyostelium* Zellen wiederzubeleben, wird ein Aliquot aus dem -80 °C-Fach entnommen und sofort im 37 °C Wasserbad aufgetaut. Um DMSO zu entfernen werden die Zellen in einem Falconröhrchen überführt, das 10 ml AX2 Medium enthält und bei 2000 Upm (Sorvall RT7 Zentrifuge) für 2 min bei 4 °C abzentrifugiert. Das Zellpellet wird in 250 µl AX2 Medium resuspendiert und die Zellsuspension auf einer SM-Agarplatte

ausgestrichen, die mit *Klebsiella* überzogen ist. Die Platten werden bei 21 °C inkubiert bis *Dictyostelium* Zellen anfangen zu wachsen.

2.3 Molekularbiologische Methoden

2.3.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* im Mikromaßstab (Birnboim und Doly 1979)

2.3.1.1 "Birnboim-Methode"

Hierbei werden 2-4 ml einer *E.coli*-Übernachtskultur in LB-Medium mit Ampicillin abzentrifugiert und das Pellet in 300 µl P1-Puffer resuspendiert. Anschließend werden 300 µl P2-Puffer zur Lyse zugesetzt, sanft gemischt und für 5 min bei RT inkubiert. Bakterielle RNA wird während dieser alkalischen Lyse der Zellmembran durch die anwesende RNaseA abgebaut, alternativ kann die RNase beim Verdau hinzugefügt werden. Nach Zugabe von 300 µl P3-Puffer werden die Proben erneut vorsichtig gemischt und für 5 min auf Eis inkubiert. Anhand dieses Neutralisationspuffers ist die Fällung von genomischer DNA, Proteinen und anderen Zellbestandteilen möglich. Das Lysat wird anschließend für 10 min bei 14.000 Upm zentrifugiert, der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und 0,8 ml Isopropanol zugesetzt. Die Plasmid-DNA wird dadurch gefällt und bei 14.000 Upm für 20 min bei 4 °C erneut pelletiert. Mit 70 % Ethanol wird die DNA gewaschen, mit Hilfe des „Speedvac concentrator“ getrocknet und in 20-100 µl 10 mM Tris/HCl, pH 8-8.5 gelöst.

P1-Puffer

150 mM Tris/HCl pH 8,0

10 mM EDTA

100 µg RNaseA/ml

P2-Puffer

0,2 M NaOH

1 % SDS

P3-Puffer

3 M Kaliumacetat, pH 5,5

2.3.1.2 Isolierung von Plasmid-DNA im Makromaßstab gemäß Macherey und Nagel

Das NucleoBond AX 100-Kit von der Firma Macherey-Nagel wird zur Gewinnung von bis zu 100 µg sauberer Plasmid-DNA aus *E. coli*-Kulturen verwendet. Das Prinzip dieser Reinigung basiert auf einer chromatographischen Trennung mittels einer Silica-Säule, auf die das Zelllysat geladen wird und mit verschiedenen Puffern eine sequentielle Elution der verschiedenen Bestandteile erreicht wird. Hierbei werden 20-50 ml einer *E. coli*-Übernachtskultur in LB-Medium, das

Ampicillin enthält, 5 min bei 12.000 Upm und 4 °C sedimentiert. Das Pellet wird mit 4 ml RNase-haltigen S1-Puffer resuspendiert und nach Zugabe von 4 ml S2-Puffer wird die Lösung vorsichtig gemischt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Bei diesen Reaktionsschritten werden infolge der SDS- und Alkalibehandlung die Zellmembranen aufgebrochen und die RNA durch die RNase verdaut. Anschließend werden 4 ml S3-Puffer zur Fällung von Proteinen, chromosomaler DNA und anderer Zellbestandteile hinzugesetzt und erneut 5 min auf Eis inkubiert. Nach Äquilibrierung der AX 100 Säule mit 2,5 ml N2-Puffer wird das zuvor filtrierte Lysat auf die Säule gegeben, dabei bindet die Plasmid-DNA an die Säulenmatrix und wird dann durch Zugabe von 10 ml N3-Puffer von überflüssigen Zellbestandteilen gereinigt. Es folgen zwei Waschschriffe mit jeweils 5 ml N3-Puffer, danach wird die Plasmid-DNA durch 5 ml N5-Puffer eluiert und anhand von 3,5 ml Isopropanol präzipitiert. Es folgt eine 30 minütige Zentrifugation bei 12.000 Upm und 4 °C, der Überstand wird abgekippt, mit 400 µl TE-Puffer die Glaswand des Corex-Röhrchens gut abgespült bzw. gewaschen, um die ganze DNA zu erhalten und anschließend in ein Reaktionsgefäß überführt. Zur Fällung werden 40 µl 3M Natriumacetat, pH 5,5 und 1 ml 100% Ethanol hinzugefügt, 20 min bei -20 °C inkubiert und anschließend erneut 30 min bei 13.000 Upm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wird abpipettiert und es erfolgt eine Waschung mit 100-200 µl 70% Ethanol. Nach kurzer Zentrifugation wird die pelletierte Plamid-DNA getrocknet und in 200 µl H₂O gelöst. Die Plasmid-DNA wird bei -20°C gelagert.

2.3.1.3 Aufreinigung von Gesamt-RNA aus *D. discoideum* Zellen gemäß Qiagen

Zur Gewinnung von bis zu 35 µg sauberer Gesamt-RNA aus *D. discoideum* Zellen wird das Qiagen „RNeasy“-Kit verwendet. Für eine RT-PCR werden die Zellen von einer konfluenten Petrischale mit 350 µl RLN (4 °C) geerntet. Der Zellüberstand nach Zentrifugation bei 300 g für 2 min wird mit 600 µl RLT-Puffer, der die Zellen aufschließt und gleichzeitig RNasen inhibiert, versetzt. Nach Zugabe von 430 µl 70%-igem Ethanol wird die Lösung auf die RNeasy-Säulen gegeben und bei 8.000 x g für 15 s zentrifugiert. Nach mehrmaligen Waschschriffen (700 µl RW1-Puffer und 2 x 500 µl RPE-Puffer) wird die Säule durch 2-minütige Zentrifugation bei 8.000 x g getrocknet. Die Elution der Gesamt-RNA erfolgt mit 50 µl RNase-freiem

Wasser bei 8.000 x g für 1 min. Die RNA wird bis zu ihrer Verwendung bei -80 °C gelagert.

2.3.1.4 Präparation genomischer DNA aus *D. discoideum* mittels des High Pure PCR Preparation Kit

D. discoideum Zellen, die auf Platte und unter Standardbedingungen gewachsen sind, werden durch Zentrifugation für 3-4 min bei 1600 Upm pelletiert und durch Resuspension auf eine Zelldichte von 2×10^7 (für die Reinigung erforderliche Menge) in Soerensenpuffer von *K. aerogenes* befreit. Nach Wiederholung der Zentrifugation wird das Pellet in 150 µl Soerensenpuffer resuspendiert und 200 µl Bindungspuffer sowie 40 µl Proteinase K (20µg) hinzugefügt. Das Gemisch wird für 10 min bei 70 °C inkubiert, anschließend wird 100 µl Isopropanol zugesetzt und gut gemischt. Die Proben werden dann auf High Pure Filterröhrchen pipettiert und für 10 min bei 8000 Upm zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wird 500 µl Inhibitor Removal Puffer zugesetzt und erneut zentrifugiert. Der Vorgang wird zweimal wiederholt, wobei hier nun 500 µl Waschpuffer hinzugefügt werden. Der Überstand wird erneut entfernt und das Filterröhrchen in ein neues Eppendorfreaktionsgefäß überführt. Anhand des auf 70 °C vorgewärmten Elutionspuffers (200 µl) und der anschließenden Zentrifugation wird dann die DNA gewonnen. Die eluierte DNA wird entweder bei 2-8 °C oder bei -15 bis -25 °C für die spätere Analyse gelagert.

2.3.1.5 Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA

Die Konzentration von DNA wird spektralphotometrisch bei $\lambda = 260$ nm bestimmt, dabei entspricht eine OD von 1 einer Konzentration von 50 µg/ml dsDNA. Unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors ergibt sich folgende Beziehung:

$$\text{DNA-Konzentration } [\mu\text{g/ml}] = E_{260} \times 50 \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

Der Grad der Verunreinigung mit Proteinen und Phenolen lässt sich mit Hilfe des Quotienten OD_{260}/OD_{280} abschätzen. Beträgt der Wert des Quotienten 1,8 oder mehr, kann die DNA-haltige Lösung als rein angesehen werden.

Zusätzlich ist es möglich die jeweiligen Konzentrationen von Plasmid-DNA und genomischer DNA in einer Agarose-Gelelektrophorese abzuschätzen. Diese werden durch Ethidiumbromid unter UV-Licht sichtbar gemacht und ermöglichen so eine Abschätzung der Menge durch Vergleich mit bekannten Konzentrationen.

2.3.2 In vitro Rekombination von DNA

2.3.2.1 Restriktion von DNA

Die Restriktion von DNA mit Restriktionsenzymen erfolgt unter den vom Hersteller empfohlenen Puffer- und Temperaturbedingungen. Restriktionsdauer und Volumen hängen von Art und Konzentration der DNA ab. Pro μg DNA werden generell 2-10 Enzymeinheiten (U) eingesetzt. Plasmid-DNA wird eine bis drei Stunden, genomische DNA über Nacht verdaut. Die Vollständigkeit der Restriktion wird im Agarosegel überprüft.

2.3.2.2 Auffüllreaktion einzelsträngiger DNA-5'-Enden

Viele Restriktionsenzyme erzeugen 5'- oder 3'-überstehende, einzelsträngige kohäsive Enden. In Gegenwart von Desoxyribonukleotiden können diese 5'-DNA-Überhänge mittels des Klenow-Fragments der DNA-Polymerase I aufgefüllt werden, während die Reparatur des 3'-Endes durch die Endonucleaseaktivität des Klenow-Fragments bewerkstelligt wird.

Reaktionsansatz für das Klenow-Enzym:

50 μl Restriktionsansatz:

4 mM dNTP

1 U Klenow-Enzym

DNA

Der Reaktionsansatz wird 30 min bei 37 °C inkubiert, anschließend wird die Reaktion durch zehnmütige Inkubation bei 65 °C und durch Zugabe von 1 μl 0,5 M EDTA gestoppt. Danach folgt eine Phenol/Chloroform Extraktion und Präzipitation der DNA mit 2 Vol. Ethanol.

2.3.2.3 Dephosphorylierung von DNA-5'-Phosphatgruppen

Um eine Selbstligation eines linearisierten Vektors zu verhindern, werden 5'-Phosphatgruppen mit alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm entfernt. Dafür werden in einem 50 μl Ansatz 5-10 μg linearisierte Vektor-DNA mit 1 U Alkalischer Phosphatase in CIP-Puffer 30 min bei 37 °C inkubiert. Die Dephosphorylierungsreaktion wird durch Inhibition der alkalischen Phosphatase durch zehnmütige Inkubation bei 65 °C gestoppt. Die dephosphorylierte DNA wird mit

Phenol/Chloroform extrahiert und anschließend mit 2 Vol. Ethanol und 1/10 Vol. 2 M Natriumacetat, pH 5.2 präzipitiert.

CIP-Puffer:

0,5 M Tris/HCl (pH 8,0)

10 mM MgCl₂

1 mM ZnCl₂

10 mM Spermidin

2.3.2.4 Ligation von DNA-Fragmenten

Die T4-DNA-Ligase katalysiert die Ausbildung einer Phosphodiesterbindung zwischen benachbarten 3'-Hydroxyl- und 5'-Phosphatenden in doppelsträngiger DNA, sowie auch in Einzelstrangbrüchen. Im Falle kohäsiver Enden wird das zu klonierende Fragment in mindestens fünffach molaren Überschuss, im Falle glatter Enden in mindestens zehnfachem Überschuss zum Vektor eingesetzt. Die Ligation erfolgt über Nacht bei ca. 8 °C in einem Volumen von 10 µl. Die verwendeten Vektoren werden jeweils vorher dephosphoryliert.

Ligationsansatz:

Linearisierte Vektor-DNA (200-400 ng)

DNA Fragment

4 µl 5x Ligationspuffer

1 µl 0,1 M ATP

2 µl 1,5 U T4 Ligase und Wasser um 20 µl zu erhalten

2.3.2.5 DNA Sequenzierung

Die Sequenzierungen erfolgen durch das Service-Labor des ZMMK (Zentrum für Molekulare Medizin Köln) auf einem ABI Prism 377 Sequencer der Firma Applied Biosystems. Neben speziellen Sequenzieroligonukleotiden für die jeweiligen Vektoren werden ebenfalls sequenzspezifische Oligonukleotide verwendet.

2.3.3 Polymerase-Kettenreaktion (Saiki *et al.* 1988)

Durch die Polymerase-Kettenreaktion können mit Hilfe spezifischer Oligonukleotide spezifische DNA-Abschnitte *in vitro* amplifiziert werden. Dazu wird ein Reaktionsgemisch aus doppelsträngiger DNA, Desoxyribonukleotiden, einer

thermostabilen Taq-DNA-Polymerase (Chien *et al.* 1976) sowie eines Oligonukleotidpaares, welches den zu amplifizierenden DNA-Abschnitt flankiert, einer kontinuierlich aufeinanderfolgenden Reihe von Denaturierung, Oligonukleotid-Hybridisierung und DNA-Elongation ausgesetzt. Die Wahl der spezifischen Oligonukleotide kann auch zur Modifikation des PCR-Produkts verwendet werden. So können z.B. mittels eines nicht hybridisierenden Nukleotidüberhangs an den Enden der Oligonukleotide Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen eingeführt werden. Die Hybridisierungstemperatur (TH) eines bestimmten Oligonukleotids wird anhand seiner Basenzusammensetzung wie folgt abgeschätzt (Suggs *et al.* 1981):

$$TH = 4 \times (G + C) + 2 \times (A + T) - 2$$

Mit einem programmierbaren „Thermocycler“ werden die PCR-Zyklen automatisch gesteuert. Die DNA wird anschließend aus dem Gel eluiert (2.3.6) und in der Regel als DNA-Probe zur radioaktiven Markierung (2.2.4.1) oder zur Ligation (2.3.2.4) verwendet. Die unten angegebenen Reaktionsparameter für Temperatur und Zeit beziehen sich jeweils auf Standardbedingungen. Für jede PCR müssen individuelle Parameter berücksichtigt werden. Die Hybridisierungstemperatur der Oligonukleotide wird so gewählt, dass sie ca. 2 °C unter der ermittelten Schmelztemperatur der Oligonukleotide liegen.

PCR-Ansatz:

2 µl (20 ng) Plasmid-DNA
2 µl (10 pmol/µl) 5'->3' Primer
2 µl (10 pmol/µl) 3'->5' Primer
5 µl 10 x PCR-Puffer
1 µl (3-4 U) Taq-Polymerase
2 µl (je 10 mM) dNTP-Mix
37 µl H₂O

Standard-PCR-Bedingungen:

Initiale Denaturierung: 95 °C, 3 min

I. Temperaturzyklus:

Denaturierung: 95 °C, 1 min

Primer-Hybridisierung: 58-66 °C, 30 s, x 25 PCR-Zyklen

- DNA-Elongation: 72 °C, 90 s
- II. Terminale Elongation: 72 °C, 10 min
 - III. abschliessende Kühlung auf 4 °C

10 x PCR-Puffer:

- 100 mM Tris/HCl (pH 8,3)
500 mM KCl
0,1 % (w/v) Gelatine

2.3.4 Reverse Transkription-Polymerasekettenreaktion

Die reverse Transkriptase (RT) ist ein Enzym, das RNA in DNA umschreiben kann. Für die RT-Reaktion wird Gesamt-RNA eingesetzt. Für die Umschreibung in cDNA werden randomisierte Hexanukleotide p(dN)₆ gewählt, die während der Reaktion an beliebigen Stellen der RNA binden und so die Synthese vieler cDNA-Stränge ermöglichen. Für die RT-Reaktion werden 1-5 µg RNA eingesetzt und nach dem folgenden Protokoll in cDNA umgeschrieben:

- 3 µg RNA
2 µl p(dN)₆ Hexanukleotide,
mit Wasser auf 15 µl auffüllen 5 min bei 70 °C inkubieren,
5 µl 5x Reaktions-Puffer
1,25 µl dNTP-Mix (10 mM)
1 µl RNAsin (40 U/µl)
1 µl M-MLV-Transkriptase (RNase H⁻)
1 h Inkubation bei 37 °C.

2.3.5 Elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten (Sambrook *et al.* 1989)

Die Auftrennung von DNA-Restriktionsfragmenten erfolgt aufgrund der vom Molekulargewicht abhängigen Laufgeschwindigkeit in einer Agarosegelmatrix. Je nach Verwendung und Auftrennungsziel werden 0,7-1,5-%ige Gele in TBE- oder TAE-Puffer verwendet. Nur für zu lösende Fragmente weniger als 1000 Bp werden 1% (w/v) Agarosegele in 1x TAE Puffer verwendet. Zur Herstellung eines Agarosegels wird die Agarose im jeweiligen Puffer aufgekocht, mit Ethidiumbromid versetzt und nach Abkühlung auf einem Gelträger verschiedener Größe (7,5 cm x 8 cm, 11,5 cm x 14 cm, 12,5 cm x 19 cm) mit Taschenformer gegossen. Die zu

untersuchenden DNA-Proben werden mit 1/10 Volumen Probenpuffer versetzt und in die Probenaschen geladen. Die DNA-Auftrennung erfolgt horizontal in Flachbett-Gelapparaturen. In Abhängigkeit von der Gelgröße, Laufdauer und Auftrennungseffizienz wird eine Spannung von 80 V bis 120 V angelegt. Nach elektrophoretischer Auftrennung der DNA kann ein Transilluminator (302 nm) die DNA sichtbar machen. Die Dokumentation erfolgt durch Fotografieren unter UV-Licht mit einem Videodokumentationsgerät (alpha Innotech). Die Größenbestimmung der DNA-Fragmente erfolgt jeweils im Vergleich mit einem geeigneten Größenstandard.

Probenpuffer:

15 % Ficoll 400

75 mM EDTA (pH 8,0 mit NaOH)

0,25 % Bromphenolblau

DNA-Größenmarker:

1 Kb DNA Leiter (Life Technologies): 12,216; 11,198; 10,180; 9,162; 8,144; 7,126; 6,108; 5,090; 4,072; 3,054; 2,036; 1,636; 1,018; 506; 396; 344; 298; 220; 201; 154; 134; 75 bp

2.3.6 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

DNA-Fragmente, die aus Restriktionsenzymverdau oder von PCR-Reaktionen stammen, werden im TAE-Agarosegel ihrer Größe entsprechend aufgetrennt. Das Gelstück, welches das gewünschte DNA-Fragment trägt, wird vorsichtig unter UV-Licht im Transluminator ausgeschnitten. Das DNA-Fragment wird anschließend unter Verwendung des Macherey-Nagel Gel Elutionskit (NucleoSpin Extract 2 in 1) aufgereinigt.

2.3.7 Transformation von *E. coli* Zellen

2.3.7.1 Erzeugung chemokompetenter *E. coli* Zellen (Inoue *et al.* 1990)

1 l LB-Medium wird mit 5 ml einer *E. coli* Übernachtskultur angeimpft und bei 37 °C und 250 Upm inkubiert und bis zu einer optischen Dichte von $OD_{600} = 0,4-0,5$ bei einer Wellenlänge von 600 nm herangezogen. Die Zellen werden 10 min auf Eis abgekühlt, durch Zentrifugation für 10 min bei 4000 Upm und 4 °C geerntet und zweimal mit je 50 ml eiskaltem Transformationspuffer gewaschen. Nach erneuter

Zentrifugation werden die Zellen in 20 ml Transformationspuffer resuspendiert und vorsichtig mit 1,5 ml DMSO (Endkonz. 7%) versetzt. Nach einer erneuten zehnminütigen Inkubation auf Eis werden Aliquots von 100 µl in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80 °C gelagert.

Transformation-Puffer, pH 6.7:

10 mM PIPES

55 mM MnCl₂

15 mM CaCl₂

250 mM KCl

Alle Reagenzien, außer MnCl₂, werden in KOH gelöst, danach wird MnCl₂ hinzugefügt und die Lösung steril filtriert.

2.3.7.2 Transformation von CaCl₂-kompetenten *E. coli* Zellen

50-200 µl CaCl₂-kompetente *E.coli* Zellen werden mit Plasmid-DNA (~50-100 ng einer Ligasereaktion) gemischt und für 20 min auf Eis inkubiert. Danach werden die Zellen für 45 s bei 42 °C im Wasserbad oder auf einem Heizblock inkubiert und sofort für 2 min auf Eis transferiert. Anschließend werden die Zellen mit 1 ml vorgewärmten LB-Medium vermischt und für mind. eine Stunde im 37 °C Brutschrank inkubiert. 100-200 µl des Transformationsgemisches wird dann auf die entsprechende Selektionsplatte ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2.3.7.3 Glycerolstocks von Bakterienkulturen

Die Glycerolstocks werden zur Langzeitaufbewahrung angelegt und verwendet. Die Kultur wächst über Nacht in LB-Medium mit oder ohne Selektionsantibiotika (abhängig von der Transformation der Bakterien). In einem 1,5 ml Eppendorfröhrchen werden 850 µl der über Nachtkultur zu sterilen 150 µl Glycerol pipettiert, gevortext und anschließend bei -80 °C eingefroren und gelagert.

2.3.8 Transformation von *D. discoideum* Zellen durch Elektroporation

Die Elektroporationsmethode für die Transformation von *Dictyostelium* Zellen wird nach de Hostos (de Hostos *et al.* 1993) durchgeführt, allerdings mit einigen Modifikationen.

D. discoideum Zellen wachsen axenisch in Schüttelkultur zu einer Dichte von 2×10^6 Zellen/ml heran und die für die Elektroporation erforderliche Menge an

Zellen (5×10^7 pro Transformation) wird in ein Falconröhrchen überführt. Die Zellsuspension wird 20 min auf Eis inkubiert und 2 min bei 2000 Upm (Sorvall RT7 Zentrifuge) bei 4 °C zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wird das Pellet in 30 ml kaltem Soerensenpuffer resuspendiert, erneut für 2 min bei 2000 Upm zentrifugiert und der Überstand wieder abgenommen. Anschließend wird das Pellet in 30 ml Elektroporationspuffer resuspendiert, 2 min bei 2000 Upm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Nach dem Waschen werden die Zellen in Elektroporationspuffer zu einer Dichte von 1×10^8 Zellen/ml resuspendiert. Für die Elektroporation werden 20-25 µg der Plasmid-DNA zu 500 µl der Zellsuspension hinzugefügt und der Zell-DNA Mix wird in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette überführt (2 mm electrode gap, Bio-Rad). Die Elektroporation wird mit dem Elektroporationseinheits-Set (Gene Pulser, Bio-Rad) 0.9 kV und 3 µF ohne den Pulscontroller durchgeführt. Nach der Elektroporation werden die Zellen sofort auf eine 10-mm Petrischale überführt und für 10 min bei 21 °C ruhen gelassen. Weiterhin wird eine Lösung, bestehend aus 3 ml Elektroporationspuffer, 4,5 µl 1 M CaCl_2 und 4,5 µl 1 M MgCl_2 , auf die Zellen tropfenweise pipettiert und anschließend bei 21 °C auf dem Schüttler bei 50 Upm für 15 min inkubiert. Danach werden 10 ml AX2-Medium und 100 µl Dihydrostreptomycinlösung (100mg/ml) in die Petrischale zugesetzt und bei 21 °C über Nacht inkubiert. Nach 2 Tagen wird das Medium durch ein Selektionsmedium ersetzt, welches Antibiotika enthält. Um stabile Transformanten zu erhalten wird das Selektionsmedium alle 24-48 Stunden ersetzt, bis die Kontrollplatte vollständig klar ist.

Elektroporationspuffer I:

170 ml 0,1 M KH_2PO_4

30 ml 0,1 M K_2HPO_4

17,12 g Saccharose

mit destilliertem H_2O auf 1 Liter auffüllen, auf pH 6.1 einstellen und autoklavieren

Elektroporationspuffer II:

150 µl 0,1 M MgCl_2

150 µl 0,1 M CaCl_2

10 ml Elektroporationspuffer

2.4 Biochemische Methoden

2.4.1 Erstellung von Gesamtprotein aus *Dictyostelium* Zellen

1×10^7 bis 5×10^8 *Dictyostelium* Zellen werden einmal in Soerensenpuffer gewaschen. Das Gesamtprotein wird durch Lyse der Pellets in 500 μ l 2x SDS Probenpuffer gewonnen und gleiche Mengen an Protein werden auf SDS-Polyacrylamidgele geladen.

2.4.2 Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen im SDS-Polyacrylamidgel (SDS-PAGE)(Laemmli 1970)

Die Größenauftrennung von Proteinen mittels SDS-PAGE wird unter denaturierenden Bedingungen in 10-15%igen Trenngelen durchgeführt. Zur Herstellung der Polyacrylamidgele werden Glasplatten in der Größe von 10 cm x 7.5 cm und Distanzscheiben von 0,75 und 1 mm Dicke verwendet. Die Probenaschen entstehen durch Einsatz von 9 -und 10-well Kämmen im Sammelgel. Die aufzutrennenden Proteinlösungen werden je nach Bedarf mit unterschiedlichen Mengen 2 x SDS-Probenpuffer versetzt und 10 min bei 95 °C inkubiert. In der Regel wird 10-15 μ l Zellextrakt in jede Probenasche geladen (2×10^5 Zellen/10 μ l SDS-Probenpuffer) und die Auftrennung erfolgt bei einer Spannung zwischen 80 und 140 V. Als Größenstandard wird ein Gemisch definierter Proteingrößen verwendet. Die Marker werden nach Anleitung des Herstellers zusammengesetzt. Die Elektrophorese wird in 1 x SDS-Puffer durchgeführt und ist beendet, wenn der Bromphenolblau-Farbstoff den Boden des Geles erreicht hat oder ausläuft. Danach können die aufgetrennten Proteine entweder durch Coomassie-Färbung oder durch Transfer auf eine Nitrozellulosemembran beobachtet werden.

5 x SDS-Probenpuffer:

2,5 ml 1 M Tris/HCl (pH 6,5)

4 ml 10%SDS

2 ml Glycerin

1 ml 14,3 M β -Mercaptoethanol

200 μ l Bromphenolblau

Laufpuffer:

0,25 M Tris
 1,9 M Glycin
 1% SDS

Molekülmassenstandards:

LMW-Marker (Pharmacia) [kDa]: 94; 67; 43; 30; 20,1; 14,4

<u>Trenngel:</u>	10%	12%	15%	18%	
<u>Sammelgel:</u>					5%
Acrylamid/Bisacrylamid (30:08) [ml]:	19,7	23,6	30	36	4,08
1.5 M Tris/HCl, pH 8.8 [ml]:	16	16	16	16	-
0.5 M Tris/HCl, pH 6.8 [ml]:	-	-	-	-	2,4
10% SDS [μ l]:	590	590	590	590	240
TEMED [μ l]:	23	23	23	23	20
10% APS [μ l]:	240	240	240	240	360
deionisiertes H ₂ O [ml]:	23,5	19,6	13,2	7,2	17,16

2.4.3 Westernblotanalyse anhand des Halbtrocken-Verfahrens (Towbin *et al.* 1979)

Die Übertragung von Proteinen aus SDS-Gelen auf Nitrozellulosemembranen wird mittels des Semi-dry-Transfer-Verfahrens durchgeführt (Proteine <80 kDa).

Der Vorteil dieses Verfahrens liegt bei der kurzen Transferdauer (15-25 min, 10 V) und im geringen Pufferverbrauch. Nach der Elektrophorese wird das SDS-Polyacrylamidgel kurz in Towbin-Puffer inkubiert und luftblasenfrei auf eine zunächst mit Wasser, dann mit demselben Puffer befeuchtete Nitrozellulosemembran und drei Lagen 3MM Whatman-Filterpapiere gelegt. Das Gel wird dann mit drei Lagen feuchten 3MM Whatman-Filterpapieren bedeckt. Dieser Aufbau wird zwischen die Elektroden der Semi-Dry-Apparatur (Biorad) gelegt. Der Transfer erfolgt für 15-25 min bei 10 V.

Zur Größenmarkierung des Proteinstandards, sowie zur Überprüfung des Proteintransfers wird die Membran mit Ponceau-Lösung (*Sigma*) gefärbt und anschließend wieder mit Wasser vorsichtig gewaschen und mit 1 x NCP entfärbt.

Towbin-Puffer:

39 mM Glycin,

48 mM Tris/HCl, pH 8.3

20% Methanol

2.4.3.1 Immunmarkierung von Westernblots (Towbin et al. 1979, Blake et al. 1984)

Zur Abdeckung unspezifischer Bindungsstellen werden die Nitrozellulosemembranen nach dem Proteintransfer zunächst für mindestens eine Stunde mit 5% Magermilchpulver in NCP-Puffer inkubiert. Bevor die Membran mit dem entsprechenden primären Antikörper (mind. 1 Stunde) inkubiert wird, wird diese kurz in NCP-Puffer gewaschen. Nach Waschen für 3x 5 min mit NCP-Puffer erfolgt die Inkubation mit dem Meerrettich-Peroxidase gekoppelten Ziege-anti-Maus-IgG-Antikörper oder Ziege-anti-Kaninchen-IgG-Antikörper als sekundären Antikörper (1 h, 1:10.000 in NCP Puffer/ 5% Milchpulver). Weiteres fünfmaliges Waschen mit NCP-Puffer entfernt nichtgebundene Antikörper. Die Detektion dieser Immunmarkierung erfolgt mittels Chemilumineszenz. Diese entsteht über Oxidation von Luminol durch die, an den sekundären Antikörper gekoppelte Meerrettich-Peroxidase. Dies führt zu einer Lichtreaktion bei 430 nm, die zu einer Schwärzung des Röntgenfilms an den entsprechenden Stellen führt. Die Membran wird 10-20 s in der ECL-Lösung inkubiert und ein Röntgenfilm für 10 s bis 30 min exponiert. Alternativ wurde das „*SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrat*“ Kit von der Firma Pierce nach Herstellerangaben verwendet.

ECL-Lösung:

2 ml 1 M Tris/HCl (pH 8,0)

200 µl (0,25 M in DMSO) 3-Aminonaphthylhydrazid (Luminol)

88 µl (0,1 M in DMSO) p-Cumarsäure

18 ml Wasser

6,2 µl 30% H_2O_2

2.4.3.2 Entfernung der Antikörper nach Immundetektion

Durch diese Methode werden primäre und sekundäre Antikörper von einer zuvor zur Immundetektion verwendeten Westernblotmembran entfernt. Dafür wird die Membran zweimal für 5 min in 0,1 M NaOH auf dem Schüttler geschwenkt und

anschließend zweimal für 10 min in 1x NCP-Puffer gewaschen. Die Membran steht nun zur Probing mit einem anderen primären Antikörper zur Verfügung.

Alternativ zur oben beschriebenen Methode ist das Re-Blot System von der Firma Chemicon ein ebenfalls effizientes und schnelles Verfahren zur Entfernung von Antikörpern, wobei die immobilisierten Proteine auf der Membran nicht geschädigt werden. Hierbei wird die Membran für 15 min in 10 ml Strippinglösung inkubiert und anschließend zweimal für 5 min mit 10 ml Blockierungspuffer gewaschen. Die Inkubation mit einem neuen Antikörper kann sofort im Anschluss stattfinden.

2.4.3.3 Coomassie-Blau Anfärbung von Polyacrylamidgelen (Neuhoff und Poehling 1980)

Nach der Elektrophorese werden die aufgetrennten Proteine durch Anfärben des Geles für 15-30 min mit Coomassieblau bei Raumtemperatur sichtbar. Anschließend wird die Färbung durch Schütteln in Entfärberlösung entfernt, wobei ein optimales Ergebnis dadurch erreicht wird, indem die Entfärbelösung mehrmals frisch zugesetzt wird, bis die Proteinbanden deutlich zu erkennen sind.

Färbelösung:

0,1% (w/v) Coomassie-Brilliant-Blau R 250

50% (v/v) Methanol

10% (v/v) Essigsäure

vor Gebrauch filtrieren

Entfärbelösung:

10% (v/v) Ethanol

7% (v/v) Essigsäure

2.2.4 Southernblotanalyse

Die als Southernblot bezeichnete Methode beschreibt den Transfer der im Agarosegel aufgetrennten DNA auf eine Nylonmembran. Anschließend folgt die Identifizierung spezifischer Fragmente durch Hybridisierung mit einer radioaktiv markierten DNA Sonde. Um später eine größenspezifische Zuordnung der radioaktiven Signale zu ermöglichen, wird vorab das Agarosegel nach elektrophoretischer Auftrennung der verdauten genomischen DNA im UV-Licht mit einem Lineal fotografiert. Danach wird die DNA im Gel 15 min (max. bis zur Gelbfärbung der Bromphenolblau-Bande) in 0,25 M HCl depuriniert und anschließend das Gel kurz in H₂O dest gewaschen. Dann wird die DNA im Gel ca. 30 min (bis zur Blaufärbung der Bromphenolblau-Bande) in Denaturierungspuffer inkubiert. Der Transfer der DNA mittels Kapillarmethode auf die

Nylonmembran (Roth) wird über Nacht in Denaturierungspuffer durchgeführt. Nach Transfer wird die DNA mittels *crosslinking* ($2 \times 700 \mu\text{J}/\text{cm}^2$) auf die Nylonmembran fixiert und anschließend einmal 10 min in 2x SSC Lösung gewaschen und zwischen Blot-Papier (Whatman) getrocknet.

Depurinierungspuffer

0,25 M HCl

Denaturierungspuffer

1,5 M NaCl

0,25 M NaOH

2.2.4.1 Radioaktive Markierung von DNA Sonden

Als Sonde dienen PCR-Produkte, die mittels PCR aus einem vollständigen Konstrukt und spezifischen Oligonukleotiden gewonnen werden. Die PCR-Produkte werden mittels High Pure PCR Purification Kit (Roche) aufgereinigt und die DNA-Konzentration (2.3.1.5) photometrisch bestimmt. Die radioaktive Markierung erfolgt mit 50 ng des gereinigten PCR-Produkts und 50 mCi Adenosin 5'-[α - ^{32}P]-triphosphat (10 mCi/ml; Amersham Pharmacia Biotech) mit dem Random Primed DNA Labeling Kit gemäß den Anleitungen des Vertreibers. Nicht eingebaute Nukleotide werden durch Zentrifugation (3.000 Upm, 2 min) über eine 1 ml Sephadex G-50-Säule in TE-Puffer abgetrennt.

Sephadex G-50-Säule:

30 g Sephadex G-50 werden in 250 ml TE-Puffer (pH 8,0) gegeben. Zur Präparation einer Chromatographiesäule wird Sephadex G-50 in eine 1 ml Einwegspritze, deren Auslassöffnung mit einem Pfropfen silanisierter Glaswolle verschlossen wird, gegeben. Durch 2-minütige Zentrifugation bei 1.000 Upm wird der Puffer abgetrennt und die Säule fest gepackt. Insgesamt wird so viel Sephadex G-50 benötigt, bis das Volumen der gepackten Säule 0,9 ml beträgt. Die Säule wird sofort verwendet.

2.4.5 Proteinbestimmung nach Lowry

Die Proteinbestimmung nach Lowry dient der quantitativen Bestimmung der Proteinkonzentration. Sie beruht auf zwei Reaktionen:

1. Bildung eines blau-violetten Komplexes zwischen Peptidbindung und Kupfer(II)-Ionen in alkalischer Lösung.

2. Bildung eines blauen Komplexes unter Reduktion von Heteropolysäuren (enthalten im Folin-Phenol) durch aromatische Aminosäuren unter Bindung von Mischoxiden.

Es werden zwei Lösungen sowie Standard-BSA-Proben verschiedener Konzentrationen angefertigt. Die Zellpellets werden mit 100 μ l Soerensenpuffer resuspendiert. 50 μ l der Proteinproben, der Blankprobe (H_2O oder Soerensenpuffer) sowie 50 μ l der Standardproben werden mit 1 ml Lösung I versetzt, gevortext und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend werden 100 μ l Lösung II hinzugefügt, ebenfalls gevortext und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubationszeit wird die optische Dichte der Proben bei $\lambda = 660$ nm gemessen. Die Werte der Standardproben ergeben die Eichkurve, aus der sich dann die Proteinkonzentrationen der verschiedenen Proteinproben ablesen oder berechnen lassen.

Lösung I:

2% $CuSO_4 \times 5 H_2O$

4% K-Na-Tartrat $\times 4 H_2O$

3% Na_2CO_3 in 0.1 M NaOH

Lösung II:

1 Vol Folinreagenz

2 Vol H_2O

Standardproben (mg/ml in H_2O)

[BSA]	μ l H_2O	μ l BSA
1	500	500
0.5	750	250
0.2	900	100
0.15	925	75
0.1	950	50
0.05	975	25
0.025	987.5	12.5
0.0125	993.75	6.25

2.5 Zellbiologische Methoden

2.5.1 Expression und Aufreinigung von Fusionsproteinen

Zellen des *E. coli* Stammes XL1 Blue werden mit einem Konstrukt transfiziert, das zur Expression von GST-PAK-CD führt.

2.5.1.1 Aufreinigung von Fusionsproteinen

In vorherigen Versuchen wurden die Bedingungen der Expression festgestellt, wobei die Expression des Fusionsproteins sowie die Effizienz der rekombinanten Klone untersucht wurden. Zellen aus 1 L Kulturen werden nach der Induktion pelletiert und bei -20 °C gelagert. Am darauffolgenden Tag wird das Zellpellet in 10 ml kaltem Lysispuffer, der Proteaseinhibitoren und 5 mg/ml Lysozym enthält, resuspendiert. Die Proteaseinhibitoren verhindern die Degradierung der Proteine durch Proteasen und Phosphatasen und das Lysozym sorgt für den Abbau der Zellwände. Anschließend werden die Zellen durch Ultraschallbehandlung (6-10x je 30 sec, 70% Amplitude, kontinuierliche Beschallung bei Einstellung 1) aufgebrochen. Zum Proteinaufschluss werden alle Schritte auf Eis und mit vorgekühlten Puffern durchgeführt, um die Aktivität von Proteasen herabzusetzen.

Durch Zentrifugation für 10-20 min bei 10.000 Upm und 4 °C wird der Überstand gewonnen. Dieser wird je nach Fusionsprotein für 1 h bei 4 °C mit 700 µl *Glutathion Sepharose 4 Beads* in kleinen Säulen (Zeba™ Spin Columns), die mit einer Polyethylenfritte beschichtet sind, auf einem Roller inkubiert. Nach viermaligem Waschen mit dem entsprechenden Puffer, wird das gebundene Protein mit 2x Probenpuffer eluiert und die restlichen, auf Eis lagernden Proben ebenfalls mit 2x Probenpuffer versetzt und bei 95 °C für 10 min denaturiert. Die Auftrennung der Proteine erfolgt über entsprechende SDS-Polyacrylamidgеле.

Lysispuffer:

50 mM Tris/HCl, pH 8.0, 300 mM NaCl, 10 mM MgCl₂

frisch zusetzen: 4 mM DTT, 1:100 Proteaseinhibitoren, 5mg/ml Lysozym

Waschpuffer :

50 mM Tris/HCl, pH 8.0, 1 M NaCl, 10 mM MgCl₂

frisch zusetzen: 4 mM DTT

2.5.1.2 Aktivitätstest von Rac1 (Sander und Collard 1999)

Der Aktivitätstest erlaubt die Unterscheidung und Messung des Anteils von Rho GTPasen in ihrem GTP-gebundenen aktiven Stadium. Hierbei wird das GST-PAK-CD Fusionsprotein verwendet, dass der Detektion von aktivem Rac1 dient.

D. discoideum Zellen mit einer Dichte von 1×10^7 werden mit Soerensenpuffer gewaschen und für 6 h auf dem Schüttler bei 160 Upm und 21 °C inkubiert.

Zur Vorbereitung des Versuches werden je 50 µl *Glutathion Sepharose Beads* und Lysispuffer sowie 1:100 verdünnte Proteaseinhibitoren in Zeba Spin Säulen pipettiert und abzentrifugiert, danach werden je 700 µl des durch Proteinexpression gewonnenen GST-PAK-CD Überstandes hinzugefügt und für 1 h bei 4 °C auf dem Roller inkubiert, um eine Immobilisierung des Komplexes zu erreichen. In der Zwischenzeit werden Eppendorfreaktionsgefäße für die Zeitpunkte 0-20s vorbereitet, indem 250 µl 5x Reaktionspuffer und 1:100 Proteaseinhibitoren vorgelegt werden. Diese Versuchsschritte finden alle auf Eis statt. Nach der einstündigen Inkubationszeit werden die Säulen unten aufgedreht und das *E.coli* Lysat läuft aus. Nach viermaligem Waschen mit dem entsprechenden Waschpuffer werden die Säulen mit 600 µl 1x Reaktionspuffer äquilibriert.

Nachdem die Zellen aggregiert sind, werden diese für 2-3 min bei 1600 Upm sedimentiert und mit Soerensenpuffer auf eine Zelldichte von 4×10^7 /ml resuspendiert. Es wird eine 1 ml Probe für den Zeitpunkt 0 entnommen, in ein zuvor vorbereitetes Eppendorfreaktionsgefäß pipettiert, gevortext und auf Eis inkubiert. 50 µl 0,1 mM cAMP wird den Zellen zugesetzt (Endkonzentration beträgt 1 µM) und es werden sofort für die Zeitpunkte 5, 10, 15 und 20 s 1 ml Aliquots entnommen und in Eppendorfreaktionsgefäße überführt, die 250 µl 5x Reaktionspuffer enthalten und ebenfalls auf Eis inkubiert. Das im Reaktionspuffer enthaltene Detergenz TritonX-100 lysiert dabei sofort die Zellen. In die Säulen, die nun die mit GST-PAK-CD angehefteten *Glutathion Sepharose Beads* enthalten, werden je 700 µl *Dictyostelium*-Lysat aus den 1 ml Proben hinzugefügt und 45 min bei 4 °C auf dem Roller inkubiert. Eine 50 µl Probe vom Zeitpunkt 0 wird ebenfalls entnommen und als Total bezeichnet. Nach der Inkubationszeit werden die Säulen erneut geöffnet und Lysat kann austropfen. Mit 1x Reaktionspuffer wird 4x gewaschen und beim letzten Schritt abzentrifugiert (10000 x g). Die immobilisierten Proteine werden anschließend alle mit je 50 µl 2x Probenpuffer eluiert und bei 95 °C denaturiert. Es erfolgt die Analyse per Auftrennung der Proteine auf einem 18% SDS-Gel, dem Transfer der Proteine auf eine Nitrozellulosemembran (2.5.1.2) und die Probung des Westernblots mit dem anti-Rac1 Antikörper. Anhand der Signalstärke der Banden wird anschließend mit Hilfe der

Image Quant Software die relative Menge des Rac1 in den verschiedenen *D. discoideum* Transformanten ermittelt.

1x Reaktionspuffer

10 mM HEPES, pH 7,5

100 mM NaCl

20 mM MgCl₂

0,5% TritonX-100

0,2mM DTT frisch zusetzen

5x Reaktionspuffer

50 mM HEPES, pH 7,5

500 mM NaCl

100 mM MgCl₂

2,5% TritonX-100

1mM DTT frisch zusetzen

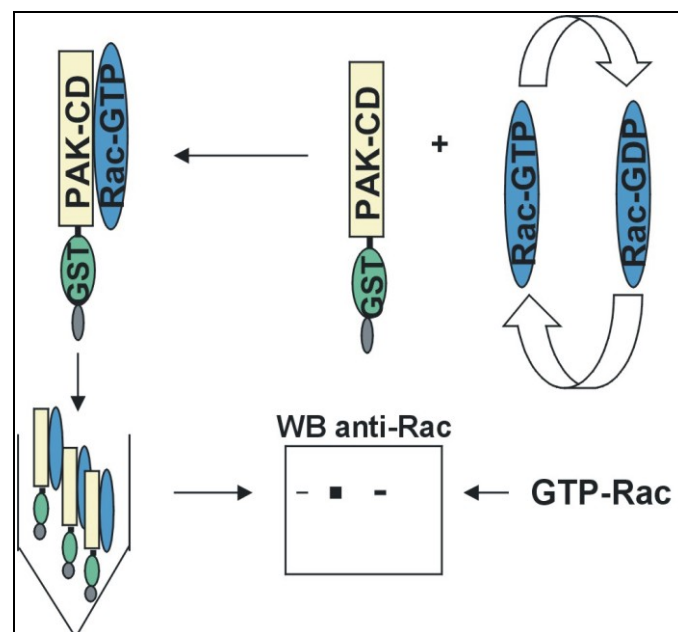


Abb. II-1: Schematische Darstellung des Aktivitätstests zur Isolation von Rho GTPasen in ihrer aktiven GTP-gebundenen Phase. *D. discoideum*-Lysate werden mit dem an *Glutathion Sepharose Beads* gebundenen GST-PAK-CD inkubiert. Nach Zentrifugation folgt mehrmaliges Waschen und Elution mittels 2x Probenpuffer. Nach Denaturierung der Proteinproben erfolgt die Auftrennung per SDS-Gel, Transfer auf Nitrozellulosemembran und anschließende Probung mit anti-Rac1 Antikörper.

2.5.2 Zellfraktionierung

D. discoideum Zellen werden nach Zentrifugation mit MES Puffer und nach Zugabe eines Proteaseinhibitorcocktails auf eine Zelldichte von 2×10^8 Zellen/ml resuspendiert und auf Eis sonifiziert. Anhand eines Lichtmikroskops werden die Zellen auf vollständige Lysis hin untersucht. Zytosolische und membranäre Fraktionen werden mittels Ultrazentrifugation bei $100000 \times g$ für 30 min aufgetrennt, mittels SDS-PAGE analysiert, auf Nitrozellulosemembran transferiert und mit verschiedenen Antikörpern immunmarkiert.

2.5.2.1 Zellfraktionierung in einem Saccharosegradienten

Mittels diskontinuierlicher Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation werden die zuvor präparierten Zellysate fraktioniert (Francou und Caen 1972). Ausgehend von einer partikelfreien 84% (w/v) Stammlösung wird durch sequenzielles Überschichten, ein Stufengradient von 2 ml 2,49 M, 1,5 ml 1,47 M, 1,5 ml 1,32 M, 1,17 M, 1,02 M und 1,88 M (w/v) Saccharose in TMKS Lysepuffer erstellt. Jeweils 1,5 ml des Lysats werden auf den Gradienten aufgetragen und bei 4 °C in einer Ultrazentrifuge bei 4.000 Upm für 18 h zentrifugiert. Anschließend werden die Gradientenstufen vorsichtig abgenommen, in 500 µl 2x Probenpuffer aufgenommen und zur Westernblotanalyse verwendet.

TMKS Puffer

50mM Tris/HCl pH 7,4

5mM MgCl₂

25mM KCl

250 mM Saccharose

2.5.2.2 Bestimmung der Aktivität der alkalischen und sauren Phosphatase

In diesem Enzymtest wird die Aktivität der alkalischen und sauren Phosphatase bestimmt, indem die Rate der para-Nitrophenyl-Phosphat-Hydrolyse in den zuvor in Abschnitt 2.5.2.1 gewonnenen Zellysatfraktionen spektrophotometrisch gemessen wird. Die saure Phosphatase dient als Marker für die Lysosomen. Die Aktivität der alkalischen und sauren Phosphatase wird in Units berechnet und besagt, wieviel µmol Para-Nitrophenyl-Phosphat pro min und mg Gesamtzellprotein hydrolysiert wird.

2.5.3 Nocodazol-Behandlung

Um den Effekt von Nocodazol zu studieren, werden 1×10^6 Zellen/ml für 1-3 h mit 10 µg/ml und 30 µg/ml Nocodazol in Suspension inkubiert und anschließend auf Deckgläser pipettiert und fixiert (s. Abschnitt 2.7.2). Zur Kontrolle werden die Zellen mit DMSO inkubiert.

2.5.4 Aktinpolymerisierung (Hall *et al.* 1988)

Bei diesem Verfahren wird eine durch cAMP induzierte F-Aktinbildung in aggregationskompetenten Zellen quantitativ bestimmt. Die Zellen werden auf eine

Zelldichte von 2×10^7 Zellen/ml mit Soerensenpuffer resuspendiert und für 6 bis 8 Stunden hungern gelassen. 1 ml der Zellsuspension wird auf eine 24-Kammerplatte, die auf einem Schüttler befestigt ist, transferiert und mit $1 \mu\text{M}$ cAMP stimuliert. 50 μl Proben werden dann zu verschiedenen Zeitpunkten entnommen und sofort in Eppendorfröhrchen überführt, die 450 μl Stopp-Lösung enthalten.

Stopp-Lösung:

20 mM Kaliumphosphat

3.7% Formaldehyd

0.1% Triton X-100

0.25 μM TRITC-Phalloidin

10 mM Pipes

5 mM EGTA

2 mM MgCl_2

pH 6.8

TX-100 lysiert die Zellen sofort und Formaldehyd fixiert die Aktinfilamente, während TRITC-Phalloidin an das F-Aktin bindet. Nach dem Anfärben für 1 h werden die Proben für 5 min bei 13.200 Upm zentrifugiert. Die F-Aktinpellets werden über Nacht mit 1 ml Methanol extrahiert. Am nächsten Tag wird die Fluoreszenz am Fluorimeter (540/565 nm) gemessen.

2.5.5 Phagozytose Assay (Maniak et al. 1995)

Die *Dictyostelium* Zellen wachsen zu einer Dichte von $<5 \times 10^6$ /ml über fünf Generationen in frischem AX2-Medium heran. Die Zellen werden zentrifugiert und auf 2×10^6 /ml in frischem AX2-Medium bei 21°C resuspendiert. 120 μl Proben werden für die Proteinbestimmung entnommen, zentrifugiert und das Pellet eingefroren. Die TRITC-markierten Hefezellen werden auf dem Rotationsschüttler bei 160 Upm inkubiert. Proben werden zu verschiedenen Zeitintervallen entnommen und die Fluoreszenz von nicht internalisierten Hefezellen wird durch Inkubation für 2,5 min mit 100 μl Trypanblau (2 mg/ml) unterdrückt. Die Zellen werden erneut zentrifugiert, in Soerensenpuffer resuspendiert und die Fluoreszenz unter Verwendung eines Fluorimeters (544 nm Anregung/574 nm Emission) gemessen.

Des Weiteren werden adhärenente *Dictyostelium* Zellen mit TRITC-markierten Hefezellen nach verschiedenen Zeitpunkten fixiert und die phagozytierten Hefen anhand des ImageJ Programms quantitativ ausgewertet.

2.5.6 Endozytose Assay (Vogel et al. 1980, Hacker et al. 1997)

Dictyostelium Zellen wachsen zu einer Zelldichte von $<5 \times 10^6$ Zellen/ml heran, werden zentrifugiert und in frischem AX2-Medium zu einer Dichte von 5×10^6 /ml resuspendiert. 120 μ l Aliquots werden ebenfalls für die Bestimmung der Proteinkonzentration entnommen, zentrifugiert und die Pellets eingefroren. Die optische Dichte bei 600 wird auf 1 eingestellt und die Zellen anschließend für 15 min auf dem Schüttler zur Erholung inkubiert. FITC-Dextran wird zu einer Endkonzentration von 2 mg/ml hinzugefügt. Der Vorteil von FITC-Dextran ist, dass die Proben auf Eis zu verschiedenen Zeiten entnommen und anschließend die Fluoreszenz am Fluorimeter (470 nm Anregung/ 515 nm Emission) gemessen.

2.5.7 Exozytose Assay (Rauchenberger et al. 1997)

Der Exozytose Assay wird zur Fortsetzung der Endozytose eingesetzt. 60-120 min nach der letzten Probenentnahme, werden die Zellen zweimal in AX2-Medium gewaschen und in frischem, sterilen Medium resuspendiert. Direkt im Anschluss werden zu verschiedenen Zeitpunkten Proben entnommen und die Fluoreszenz der Zellen am Fluorimeter (470 nm Anregung/ 515 nm Emission) abgelesen.

2.5.8 Phototaxis Assay (Wallraff und Wallraff 1997)

D. discoideum Zellen werden bei 2.000 Upm für 2 min zentrifugiert, zweimal mit Wasser gewaschen und 1×10^6 Zellen auf 1%ige Wasseragarplatten (90 mm) verteilt. Die Platten werden in Aufbewahrungsbehälter für Petrischalen, deren Innenseite schwarz angemalt sind und einen 3 mm großen Schlitz haben, inkubiert und für 48 h bei 21 °C gedämpftem Licht gelagert. Die Spuren der migrierenden Slugs werden anschließend auf Nitrozellulosemembranen transferiert und für 10 min mit 0.1% Amidoschwarz in 25% Isopropanol und 10% Essigsäure angefärbt. Die Entfärbung erfolgte in 25% Isopropanol und 10% Essigsäure sowie Waschen mit Wasser und Lufttrocknung.

2.5.9 Chemotaxis Assay (Gerisch und Keller 1981)

Vegetative *D. discoideum* Zellen werden auf eine Zelldichte von 1×10^7 Zellen/ml in Soerensenpuffer resuspendiert und hungern für 6 Stunden. 25-30 μ l der

Zellsuspension werden in 3 ml Soerensenpuffer überführt und durch Auf- und Abpipettieren gut durchmischt, um die Zellen von den Aggregaten zu trennen. 1.5 ml der Zellsuspension werden auf einem 5 cm Glasobjektträger transferiert, der von einem Plastikring umgeben ist und auf den Leica Mikroskop befestigt, das mit einem 10x Objektiv ausgestattet ist. Die Zellen werden über eine Glaskapillarmikropipette, die 0,1 mM cAMP enthält und an einem Mikrokontroller befestigt ist, stimuliert. Bilder werden in 30 s Intervallen mit einer JAI CV-M10 CCD Kamera und einem Imagenation PX610 Framegrabber (Imagenation Corp., Beaverton, OR) kontrolliert durch die Optimas Software (Optimas Corp., Bothell, Washington) aufgenommen. Die DIAS Software (Soltech, Oakdale, IA) wird zum Markieren der Zellen und zur Kalkulation der Zellmotilität (Soll *et al.*, 2001) verwendet. Die Bearbeitung der Bilder erfolgte über Adobe Photoshop.

2.6 Mitochondrienspezifische Methoden

Für die folgenden Versuche werden *D. discoideum* Zellen mit einer Ausgangszelldichte von 2×10^6 - 2×10^7 Zellen/ml verwendet, die in axenischem Medium angewachsen sind.

2.6.1 Messung des Sauerstoffverbrauchs

D. discoideum Zellen werden mit PDF-Puffer gewaschen, auf eine Zelldichte von 5×10^6 Zellen/ml resuspendiert und in eine Respirationskammer bei 21 °C platziert. Der Sauerstoffverbrauch wird polarographisch mit einer Clark-Typ Sauerstoffelektrode mit einer Fortdauer von ca. 10 min nach Äquilibration der Elektrode gemessen.

PDF-Puffer:

20mM KCl
5mM MgCl₂
20mM KPO₄
pH 6,4

2.6.2 Messung des mitochondrialen Transmembranpotentials

Das Membranpotential wird mittels des *Mitochondria Staining Kit* von Sigma-Aldrich durchgeführt. JC-1 (5,5',6,6'-Tetrachloro-1,1',3,3'-Tetraethyl-benzimidazolylcarbocyanin Jodid) wird verwendet, um das Membranpotential zu bestimmen. In normalen Zellen konzentriert sich der JC-1 Farbstoff in der mitochondrialen

Matrix, wo es rot fluoreszierende Aggregate bildet. Bedingungen die zum Verlust des mitochondrialen Membranpotentials führen, verhindern die Akkumulation des JC-1 Farbstoffs in den Mitochondrien. Dies führt zu einer Verteilung des Farbstoffs in der ganzen Zelle und zur Verschiebung der roten Fluoreszenz (JC-1 Aggregate) zur grünen Fluoreszenz (JC-1 Monomere). *D. discoideum* Zellen mit einer Zelldichte von 2×10^7 Zellen/ml werden aus Schüttelkultur entnommen, mit der zuvor präparierten Färbelösung für 20 min bei 21 °C im Dunkeln inkubiert und nach zweimaligem Waschen im beigefügten 1x JC-1 Puffer resuspendiert. 10 µl wird für die Messung des Membranpotentials in 90 µl 1x JC-1 Puffer pipettiert und in einer 96 Well Platte bei 575 nm mittels der Fluoroskan Apparatur gemessen.

2.6.3 ATP Bestimmung

Die ATP Assays werden mit dem Luciferase basierenden ATP Assay Kit von ENLITEN, Promega durchgeführt. Wenn ATP die limitierende Komponente in der Luciferase Reaktion ist, verbleibt die Intensität des emittierenden Lichts proportional zur ATP Konzentration. Die Lichtintensitäten wurden anhand eines Luminometers durchgeführt, die eine direkte Quantifizierung des ATP erlauben (Lundin und Thore 1975, McElroy und DeLuca 1983, Bertholdt *et al.* 1985). *Dictyostelium* Zellen mit einer Zelldichte von 2×10^6 werden mit ATP freiem Wasser, das dem Kit beigefügt ist, gewaschen und bei 5 min 4000 Upm zentrifugiert. 10 µl Überstände werden für die weiteren Bestimmungen verwendet. Die Lichtintensitäten werden mittels eines Luminometers bestimmt und die ATP-Konzentrationen anhand einer ATP Standardkurve (10^{-8} bis 10^{-11} M) nach Abzugs des Blankwertes (Kontrolle ohne Luciferase) ermittelt.

2.6.4 Messung der Reaktiven Sauerstoffspezies (ROS)

Zur Messung der ROS werden *D. discoideum* Zellen mit 100 nM DCFH-DA (Dichlorofluoresceindiacetat, Sigma-Aldrich), die zuvor in LO-FLO Medium (FormediumTM) zweimal gewaschen und anschließend 30 min inkubiert werden, für 45 min behandelt. Das deacetylierte DCFH wird bevorzugt vom H₂O₂ und Hyperoxid zu dem fluoreszierenden Dichlorofluorescein (DCF) oxidiert, dass bei 525 nm mit der Fluoroskan Apparatur analysiert wird.

2.6.5 Messung des Glukoseverbrauchs

D. discoideum Zellen werden in Lo-Flo Medium wie in Abschnitt 2.2.1.4 beschrieben, kultiviert. Jede 24 h werden 1 ml Proben entnommen, bei 2000 Upm abzentrifugiert und die Überstände bei -20° C eingefroren. Die Überstände werden über einen Zeitraum von drei Tagen gesammelt (0-72 h) und der Glukoseverbrauch der Zellen anschließend am Radiometer ABL System 615, gemessen. Dabei werden ca. 500 µl in die Messvorrichtung mit einer 1ml Einwegspritze aufgetragen.

2.7 Immunologische Methoden

2.7.1 Vorbereitung der *D. discoideum* Zellen

D. discoideum Zellen wachsen in Schüttelkultur zu einer Zelldichte von $2-4 \times 10^6$ Zellen/ml heran. Die gewünschte Menge wird in einem Zentrifugenröhrchen überführt, die Zellen in frischem, sterilem Medium gewaschen und über Nacht auf Deckgläsern in sterilem Medium aufbewahrt. Alternativ ist es möglich, die Zellen aus einer Schüttelkultur auf dem Deckglas für 20 min absitzen zu lassen und die Fixierung sofort durchzuführen.

2.7.2 Methanol Fixierung

Nach dem Absetzen der Zellen auf einem Deckglas wird der Überschuss abgesaugt und das Deckgläschen in vorgekühltes (-20 °C) Methanol, das sich in einer Petrischale befindet, getaucht und für 10 min bei -20 °C inkubiert. Das Deckglas wird anschließend aus dem Methanol herausgenommen und auf eine, mit Parafilm bedeckte, Glasplatte gesetzt und in einer Feuchtkammer gelegt. Anschließend wird zweimal mit 500 µl PBG für 15 min gewaschen und die Immunomarkierung erfolgt:

PBG, pH 7.4:

0.5 % Rinderserumalbumin

0.1 % Gelatin (Kaltwasserfischhaut)

in 1x PBS, pH 7.4

2.7.3 Paraformaldehyd (PFA)-/Pikrinsäurefixierung

D. discoideum Zellen werden für 30 min mit einer zuvor präparierten 4%igen PFA/Pikrinsäurelösung bei Raumtemperatur inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen mit PBS/Glycin erfolgen die gleichen Schritte wie bei der Methanolfixierung. Die PFA-/Pikrinsäurefixierung wird bei der Anfärbung der Mitochondrien mit MitoTracker Red verwendet sowie für TRITC-/FITC-Phalloidin Färbungen der Zellen.

PFA-Pikrinsäurelösung

0.4 g Paraformaldehyd werden in 5 ml ddH₂O durch Rühren bei 40 °C und 3-4 Tropfen von 2 M NaOH gelöst. Nach Lösung das Volumen auf 7 ml mit ddH₂O justieren. Zu dieser PFA-Lösung 10 ml eines 20 mM PIPES Puffers, pH 6.0, und 3 ml gesättigte Pikrinsäure zugeben und den pH-Wert auf 6.5 einstellen.

PBS/ Glycin

500 ml 1x PBS

3,75 g Glycin, Filtersterilisation, bei -20 °C lagern.

2.7.4 Immunfärbung von fixierten Zellen

Die Deckgläser mit den fixierten Zellen werden mit 100 µl der erwünschten Verdünnung (in PBG) des primären Antikörpers für 1-2 h in einer Feuchtkammer bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubation wird der ungebundene Antikörper durch Waschen mit PBG 6x für 5 min entfernt. Danach werden die Deckgläser für eine weitere Stunde mit 100 µl einer dazugehörigen Verdünnung (in PBG) des sekundären Antikörpers inkubiert. Nach der Inkubation folgen zwei weitere Waschungen mit PBG für 5 min, danach drei Waschungen mit PBS/Glycin für 5 min. Nach der Immunomarkierung der fixierten Zellen wird das Deckglas in deionisiertes Wasser getaucht und überschüssiges Wasser mit einem Tuch abgesaugt. Ein Tropfen Gelvatol wird in die Mitte eines sauberen Objektträgers platziert und das Deckglas mit der Zelloberfläche nach unten zeigend, vorsichtig auf Gelvatol gesetzt, um Luftblasenbildung zu vermeiden, danach werden die Deckgläser über Nacht im Dunkeln bei 4 °C untergebracht. Anschließend erfolgen die Untersuchungen mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops oder anhand des konfokalen Laser Scanning Mikroskops.

Gelvatol:

20 g Polyvinylalkohol und 40 ml Glycerol werden in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt und mittels eines Magnetrührers verrührt. Zu der Mixtur wird anschließend destilliertes Wasser gegeben und bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einigen Stunden wird 0.14 M NaCl pH 7.2 zugesetzt und die Mixtur bei 50 °C für 10 min erhitzt, bis sich der Polyvinylalkohol vollständig gelöst hat. Die Lösung wird dann bei 5100 Upm für 15 min zentrifugiert, danach wird 2.5% Diazabizycloktan (DABCO) hinzugefügt, ein Antioxidanz, welches das Bleichen der Fluoreszenz verhindert. Die Lösung wird anschließend in 1,5 ml Eppendorfreaktionsgefäße überführt und bei -20 °C gelagert.

2.8 Mikroskopie

2.8.1 Mikroskopie von fixierten Präparationen

Um Immunmarkierungen sowie Färbungen der fixierten Präparationen sichtbar zu machen, wird das Leica TCS SP Mikroskop verwendet, ausgestattet mit einem 100X, 63X, 40X LCPlanFI 0.6 und einem 10X UplanFI 0.3 Objektiv sowie das Fluoreszenzmikroskop Leica HC. Aufnahmen und Bilder werden sowohl mit einer JAI CV-M10 CCD Videokamera als auch mit der SensiCam gekühlten CCD Videokamera gemacht.

2.8.2 Mikroskopie auf Agarplatten

Um Agarplatten zu beobachten und zu dokumentieren wird das Leica MZ FL III Mikroskop verwendet. Bilder werden mittels einer HV-C20A Kamera aufgenommen.

2.9 Generierung eines monoklonalen Antikörpers gegen *D. discoideum* Miro

2.9.1 Expression des Antigens

Die DNA Sequenz, die für die erste GTPase Domäne (GTPase I) und die EF-Hände Domäne kodiert, wird in den Bakterienexpressionsvektor pQE30 kloniert. Die transfizierten *E.coli* XL1 Blue Stämme werden in LB-Medium kultiviert und bei einer OD₆₀₀ von 0,5 mit 0,1 mM IPTG induziert. Die Kultivierung wird für weitere 4 h bei 37 °C fortgesetzt und schließlich bei 12.500 Upm bei 4 °C abzentrifugiert. Die Zellen werden lysiert und in lösliche und pelletierte Fraktionen unterteilt. Die mit einem His-Tag fusionierte erste GTPase Domäne (25 Kb) und die EF-Hände Domäne (23 Kb) von Miro werden anschließend über ein großes Proteingel

aufgereinigt und in einer weiteren SDS-Page der Grad der Aufreinigung, die richtige Größe sowie Proteinmenge mit Hilfe einer BSA-Eichreihe untersucht.

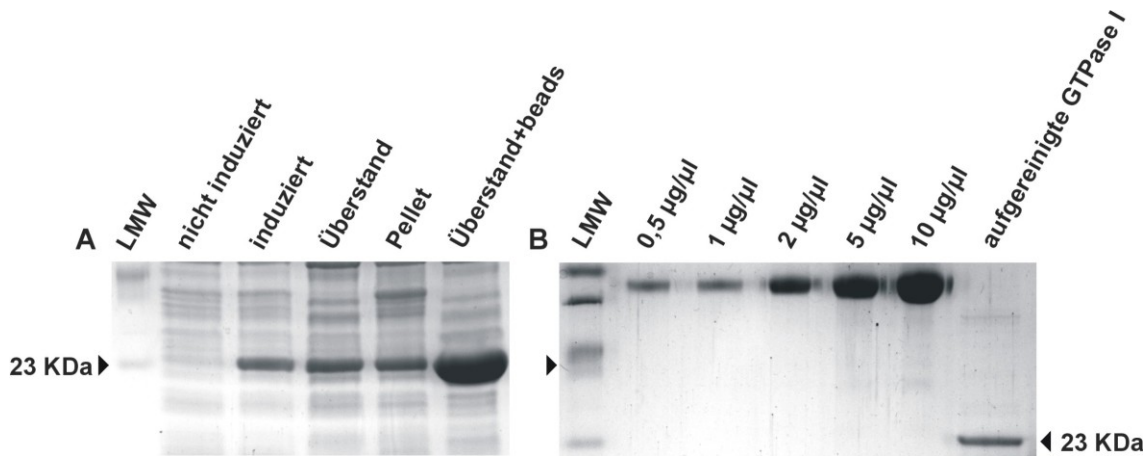


Abb. II-2 Expression und Aufreinigung der GTPase1. A. Nach Zellaufschluss werden die, während der Expression gesammelten, Proben mit 2x Probenpuffer versetzt und nach SDS-PAGE mit Coomassie angefärbt. B. Anhand einer BSA-Eichreihe wird die aufgereinigte Proteinmenge, zur Immunisierung der Mäuse, ermittelt. Links und rechts sind die Größen der His-fusionierten GTPase1 angezeigt. Die Proteingele der His-fusionierten EF-Hände sind nicht gezeigt.

2.9.2 Fusion

Die Generierung der monoklonalen Miro Antikörper wurden zuvor in (Niebur *et al.*, 1998) beschrieben. 10 µg der aufgereinigten ersten GTPase Domäne sowie 10 µg der EF-Händen Domäne werden zur Immunisierung von 6 Balb/c Mäusen verwendet. In Folge von vier Wochen werden die Mäuse (1x pro Woche) mit 10 µg Protein injiziert. Nach Beendigung der Immunisierung werden die Lymphknoten aus den Kniekehlen der Mäuse isoliert und mit Myelomazellen fusioniert (Lingenau *et al.*, 1996).

2.9.3 Auswahl der Klone (Screening)

Ungefähr 20-30 Hybridomamutterklone (GTPase I) wurden zur weiteren Subklonierung verwendet. Die Immunreaktion wurde mittels ELISA und anschließender Streifentests mit dem aufgereinigten Antigen sowie AX2 Lysaten getestet. Es konnten keine Hybridomaklone für die EF-Hände Domäne erhalten werden. Für weitere Analysen, insbesondere zur Bestätigung der *gemA* Defizienz durch Westernblotanalyse und Immunfluoreszenz wurden die monoklonalen Antikörper K72-642-1 und K72-642-2 verwendet. Sie erkennen auf dem Westernblot und in der Immunfluoreszenz die GFP-Fusionsproteine in ganzen

Zellhomogenaten sowie das endogene Protein in AX2 Lysaten (s. Ergebnisse III-25). Nach anschließenden Aufreinigungen und weiteren Analysen der Hybridomaüberstände konnte das Miro Protein allerdings nicht mehr detektiert werden.

2.10 Analyse am Computer

Die Bildinformationen der Immunfluoreszenzaufnahmen aus der Mikroskopie wurden im Programm *Adobe Photoshop* erstellt und mit *CoralDraw9* bearbeitet. Entwicklungsaufnahmen wurden im Programm Diskus weiterverarbeitet und das chemotaktische Verhalten der *D. discoideum* Zellen anhand des Programms OPTIMAS dokumentiert und mit dem DIAS Programm, die Migrationswege generiert. Mittels der Programme ImageJ und ImageQuant konnten Fluoreszenzintensitäten und Quantifizierungen sowie die Größen von *D. discoideum* Zellen gemessen und quantitativ ausgewertet werden. Mit dem ImageQuant Programm wurden quantitative Messungen von Proteinen durchgeführt. Des Weiteren wurde für statistische Analysen Excel (*Microsoft Office* 2003) verwendet. Es wurde immer ein zweiseitiger ungepaarter Student t-Test durchgeführt und als signifikant gewertet, wenn mindestens $p \leq 0,005$

III Ergebnisse

3.A Die Effekte des YopE Proteins auf das Aktinzytoskelett

3.1 Expressionsmuster von *Yersinia* Yop Effektoren

Um die Effekte von *Yersinia* Virulenzfaktoren in *D. discoideum* zu untersuchen, wurden YopE, YopH, YopJ und YopM unter die Kontrolle eines induzierbaren Vektorsystems gebracht, das durch Tetrazyklin reguliert wird (Blaauw *et al.* 2000). Der folgende Versuch wurde vom Kollaborationspartner ausgeführt. *yopE*, *yopH*, *yopJ*, und *yopM* von *Y. pseudotuberculosis* wurden als GFP-Fusionskonstrukte, oder als einzelne Gene in den Tetrazyklinantwortvektor pMB38 kloniert. Die Expression über die Zeit wurde anhand von Northern- und Westernblotanalysen untersucht. Die Transkription von *yopE* war drei Stunden nach Entfernung des Tetrazyklins stark induziert und auch weiterhin nach 28 Stunden anhaltend (Abb. III-1A). Erwartungsgemäß ist die Expression von *yopE* durch Tetrazyklin unterdrückt, trotzdem konnte ein schwaches Signal detektiert werden. Dies lässt den Schluss zu, dass der Promoter nicht vollständig unter nicht-induzierenden Bedingungen steht. Ähnliche Ergebnisse wurden für die Expression von *yopH* in diesem System ermittelt (nicht gezeigt). Die Synthese aller GFP-Yop Fusionsproteine in *D. discoideum* konnte nach sechs bis neun Stunden, die maximale Proteinexpression zwischen 12-26 Stunden beobachtet werden (Abb. III-1B). Nur das GFP-YopH Protein schien partiell degradiert, während alle anderen Fusionsproteine stabil blieben. Im Gegensatz dazu wurde keine Expression der Proteine in Gegenwart von Tetrazyklin detektiert.

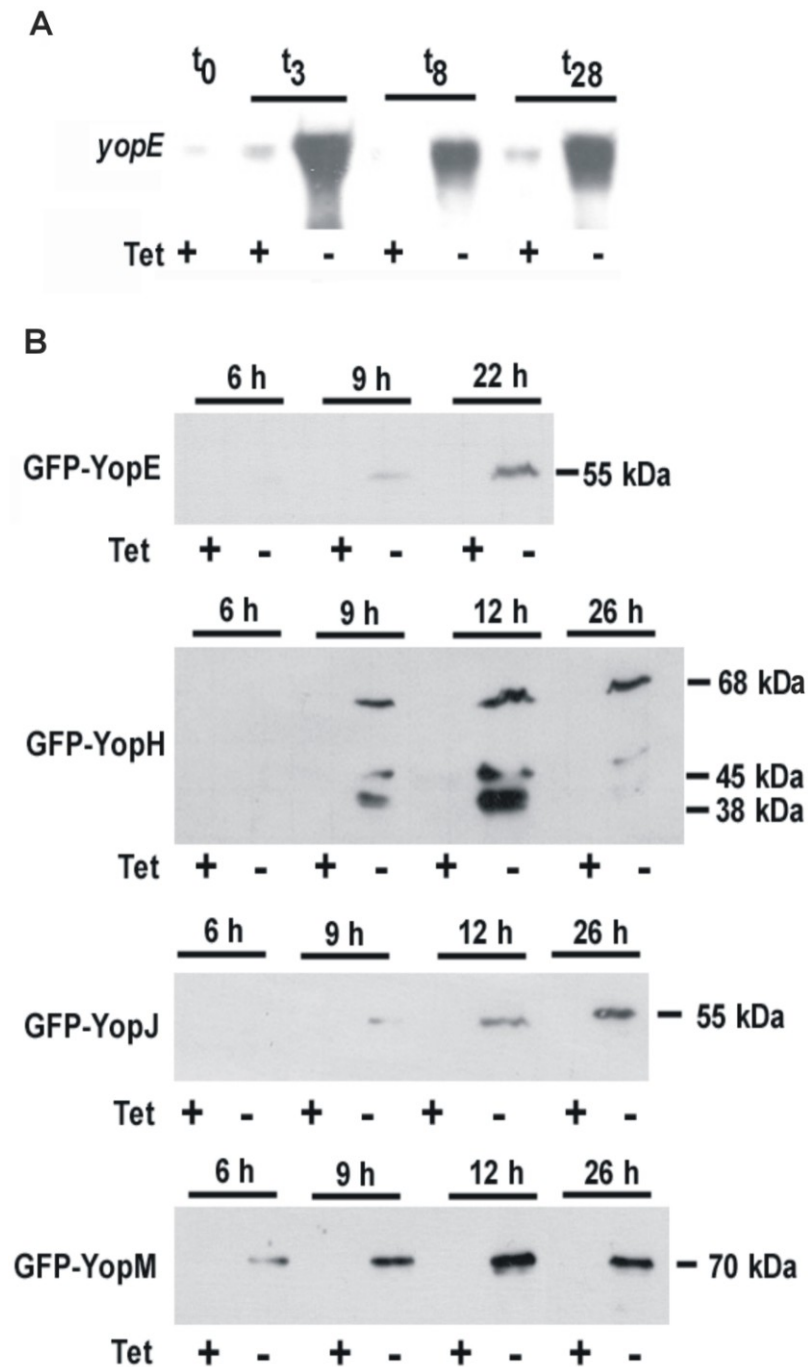


Abb. III-1: Yop Expression in *D. discoideum*. **A.** Die Expression von *yopE* wurde durch Entfernen des Tetrazyklins (-Tet) induziert. RNA wurde zu den angegebenen Zeiten isoliert und auf 1,2% Agarose-/6,6% Formaldehydgelen aufgetrennt, auf eine Nylonmembran transferiert und mit DIG-markiertem *yopE* hybridisiert. **B.** Expression von GFP-Yop Fusionsproteinen. Protein wurde, zu den angegebenen Zeiten, von 5×10^5 vegetativen Zellen isoliert und auf einem 15% Polyacrylamid/0,1% SDS-Gel aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Die Membranen wurden mit einem GFP-spezifischen Antikörper inkubiert. Modifizierte Abb. freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Barbara Weissenmayer, University College Dublin, Irland.

3.2 YopE assoziiert mit intrazellulären Membrankompartimenten

Innerhalb der *D. discoideum* Zelle wurde die Lokalisation der GFP-Yop Fusionsproteine analysiert. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen zeigten, ähnlich wie bei den Säugerzellen, dass das GFP-YopH Protein und das GFP-YopJ Protein hauptsächlich innerhalb des Zytosols lokalisieren. Im Gegensatz dazu akkumuliert GFP-YopM im Zellkern ähnlich der YopM Expression in Säugern und in Hefezellen (Skrzypek *et al.* 1998, Benabdillah *et al.* 2004). Analysen der Primärstruktur von YopM erbrachten jedoch keinen Hinweis auf ein Kernlokalisierungssignal. Die Tatsache, dass YopM ebenfalls im Nukleus von *D. discoideum* Zellen lokalisiert, führt zu der Annahme, dass Säuger- und *D. discoideum* -Zellen einen vergleichbaren nukleären Import oder Retentionsmechanismus für YopM aufweisen.

Für YopE ist bekannt, dass es an der Plasmamembran von *S. cerevisiae* Zellen (Lesser und Miller 2001) und an der perinukleären Membran von Säugerzellen lokalisiert (Krall *et al.* 2004). In *D. discoideum* scheint GFP-YopE mit intrazellulären Membranen zu assoziieren, im Speziellen mit dem Golgiapparat und weniger auffallend mit dem endoplasmatischen Retikulum (ER), wie es mit Hilfe des Golgimarkers Comitín und dem ER Marker Proteindisulfidisomerase (PDI) in Immunofluoreszenzstudien festgestellt werden konnte (Abb. III-2). Eine klare Kolokalisation mit Markern anderer Kompartimente wie VatA (eine Untereinheit der vakuolären H⁺-ATPase, die vorwiegend in der kontraktiven Vakuole vorhanden ist und in kleinerem Ausmaß in den Endosomen) oder Vakuolin (ein Marker des postlysosomalen Kompartiments) konnte nicht nachgewiesen werden.

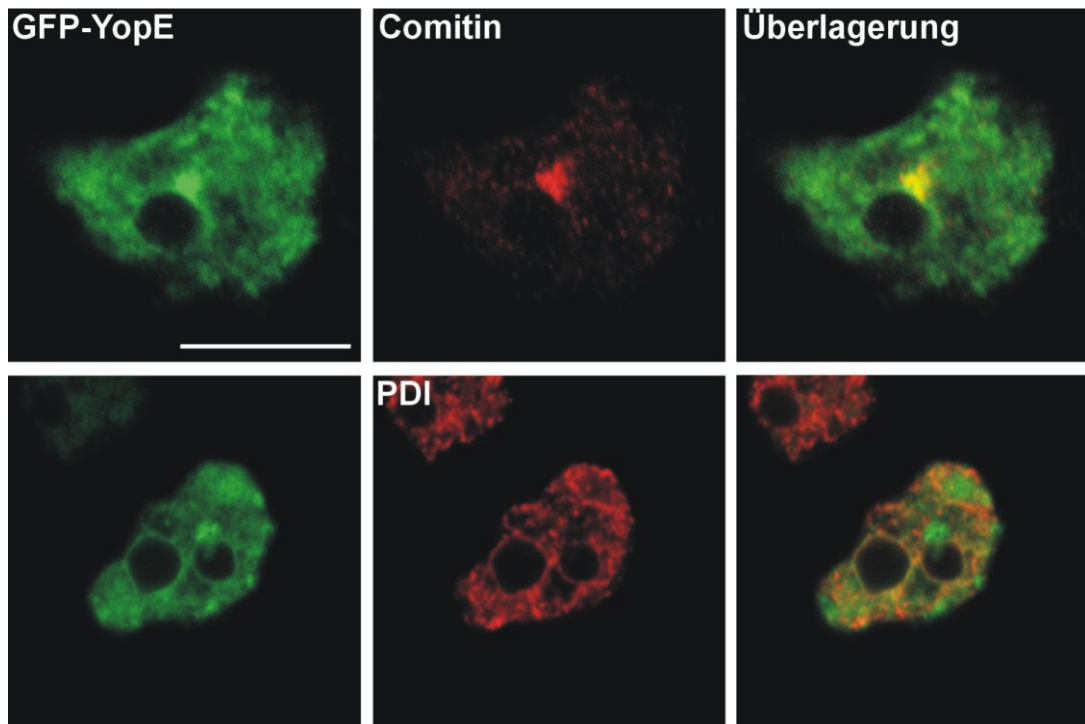


Abb. III-2: YopE assoziiert mit intrazellulären Membrankompartimenten. A. YopE kolokalisiert mit Markern für intrazelluläre Membrankompartimente, speziell mit dem Golgiapparat und weniger deutlich mit ER-Markern. GFP-YopE exprimierende Zellen wurden mit kaltem Methanol fixiert und mit spezifischen monoklonalen Antikörpern inkubiert, die den Golgimarker Comitin und den ER-Marker Proteindisulfidomerase (PDI) erkennen, gefolgt von einer weiteren Inkubation mit Cy3-markierten anti-Maus IgG. GFP wurde direkt visualisiert. Der gleiche Vorgang wurde für VatA und Vakuolin wiederholt. Zur Kontrolle wurde GFP-MB38 verwendet. Die Aufnahmen sind konfokale Schnitte. Maßstab, 10 μm .

Eine Fraktionierung von GFP-YopE exprimierenden Zellen im Zytosol und in Membranen bestätigte, das YopE hauptsächlich membranassoziiert ist (Abb. III-3).

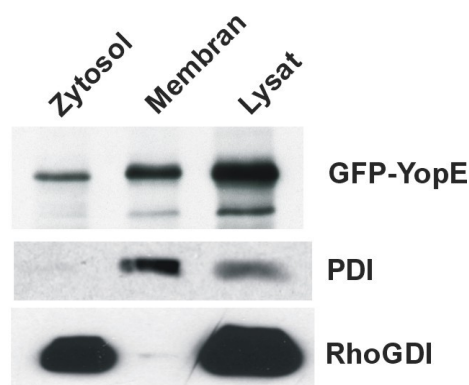


Abb. III-3: Fraktionierung von GFP-YopE exprimierenden *Dictyostelium* Zellen. Die Zellen wurden durch Sonifizierung lysiert und durch Ultrazentrifugation in die zytosolischen und membranären Fraktionen getrennt. Die Proben wurden in 12% Polyacrylamidgele aufgetrennt und auf Nitrozellulosemembranen transferiert. Die Membranen wurden mit Antikörpern gegen GFP, PDI (ein Marker für die Membranfraktion) und RhoGDI (ein Marker für die zytosolische Fraktion) inkubiert worden. YopE ist vorwiegend membranassoziiert.

Ebenfalls wurde in einem diskontinuierlichen Saccharosegradienten gezeigt, dass das GFP-YopE Protein mit verschiedenen Membrankompartimenten assoziiert ist, eine deutliche Überlappung der Membrankompartimente war zu erkennen (Abb. III-4A). Anhand des Golgimarkers Comitins und dem ER Marker PDI konnte eine Anreicherung des GFP-YopE Proteins sowohl an den Membranen des Golgiapparates als auch an den Membranen des ERs beobachtet werden. Zur Kontrolle des zytoplasmatischen Bereichs wurde Rho GDI aufgetragen (Abb. III-4A). Enzymatische Aktivitätstest mit der Sauren und Alkalischen Phosphatase, die als Marker für Plasmamembranen und Lysosomen verwendet wurden, zeigten nach photospektrometischer Analyse, besonders im Bereich der Membranen des Golgiapparates sowie des ERs eine erhöhte Enzymaktivität (Abb. III-4B).

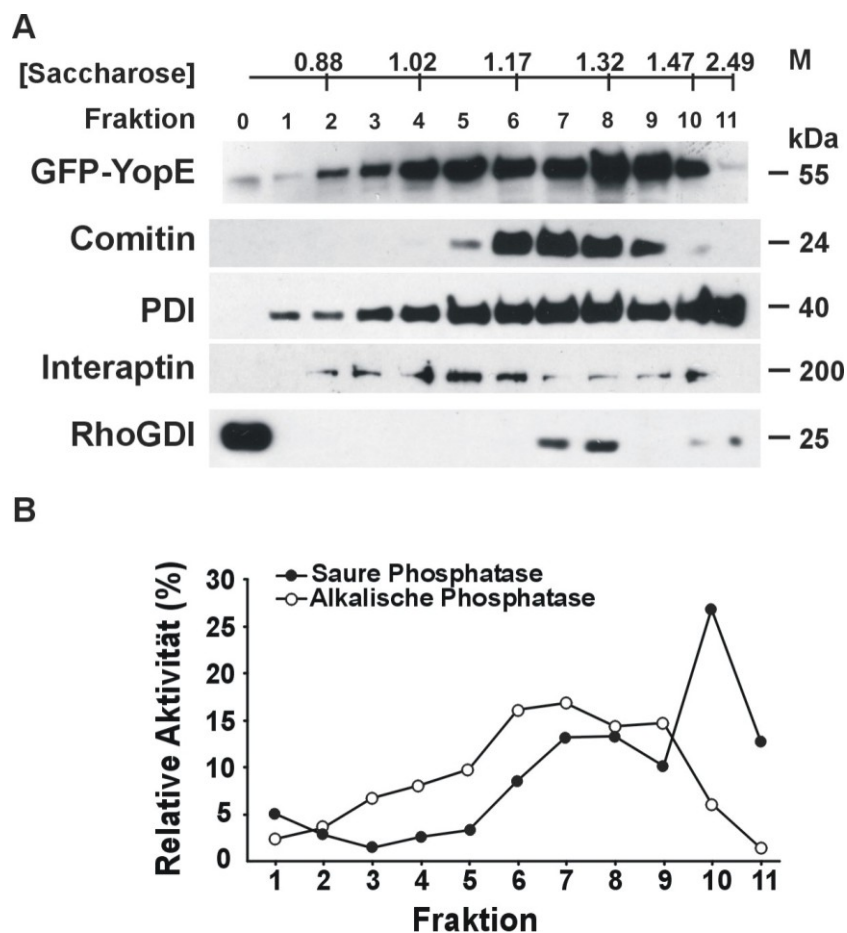


Abb. III-4: Fraktionierung im Saccharosegradienten von Lysaten GFP-YopE exprimierender Zellen. **A.** Zelllysat wurde auf einem diskontinuierlichen Saccharosegradienten aufgetrennt. Die Fraktionen wurden von oben aus gesammelt und anhand von Westernblotanalyse mit den Antikörpern für Comitins, PDI, Interaptin (ein Protein der Kernhülle und des ER) und RhoGDI analysiert. RhoGDI ist hauptsächlich ein zytoplasmatisches Protein, allerdings bleibt ein geringer Anteil an den Membrankompartimenten assoziiert. **B.** Die Enzymaktivitäten von GFP-YopE exprimierenden Zellen wurden anhand der Alkalischen Phosphatase (ein Marker der Plasmamembran und der kontraktiven Vakuole) und der Sauren Phosphatase (ein Marker für die Lysosomen) festgestellt.

3.3 YopE inhibiert das Wachstum von *D. discoideum*

Das Wachstum von Zellen ist ein Resultat von Interaktionen verschiedener zellulärer Prozesse, wobei unter anderem die Umstrukturierung des Aktinzytoskeletts beteiligt ist. Um zu untersuchen, ob das Wachstum von *D. discoideum* durch Yop-Effektoren beeinträchtigt ist, wurde dies in Flüssigkultur von den Kollaborationspartnern untersucht. Hierbei wurden die nicht-induzierten mit den induzierten Yop exprimierenden Zelllinien verglichen. Die Wachstumskurven wurden unter Standardbedingungen, d.h. auf dem Schüttler bei 150 Upm und 22 °C, ausgehend von einer Zelldichte von 1×10^4 Zellen/ml in 30 ml AX2 Medium, durchgeführt. Wachstumsmessungen über mehrere Tage zeigten, dass das Wachstum von YopE und GFP-YopE exprimierenden Zelllinien im Vergleich mit nicht-induzierten Zelllinien drastisch reduziert ist (Abb. III-5). Zu Beginn war das Wachstum von YopE exprimierenden Zellen verzögert, mit Generationszeiten von über 62 Stunden im Vergleich zu 12 Stunden der nicht-induzierten Kontrollen. Nach 10 Tagen begannen die Zellen der gleichen Kultur wieder zu wachsen, wobei dies langsamer geschah als bei den Kontrollzellen mit Generationszeiten von 20 bzw. 38 Stunden. Im Gegensatz zu YopE, zeigte das Wachstum von *D. discoideum* Zelllinien, die YopH, GFP-YopH, GFP-YopJ oder GFP-YopM exprimieren, keine signifikanten Unterschiede zwischen induzierten und nicht-induzierten Zelllinien.

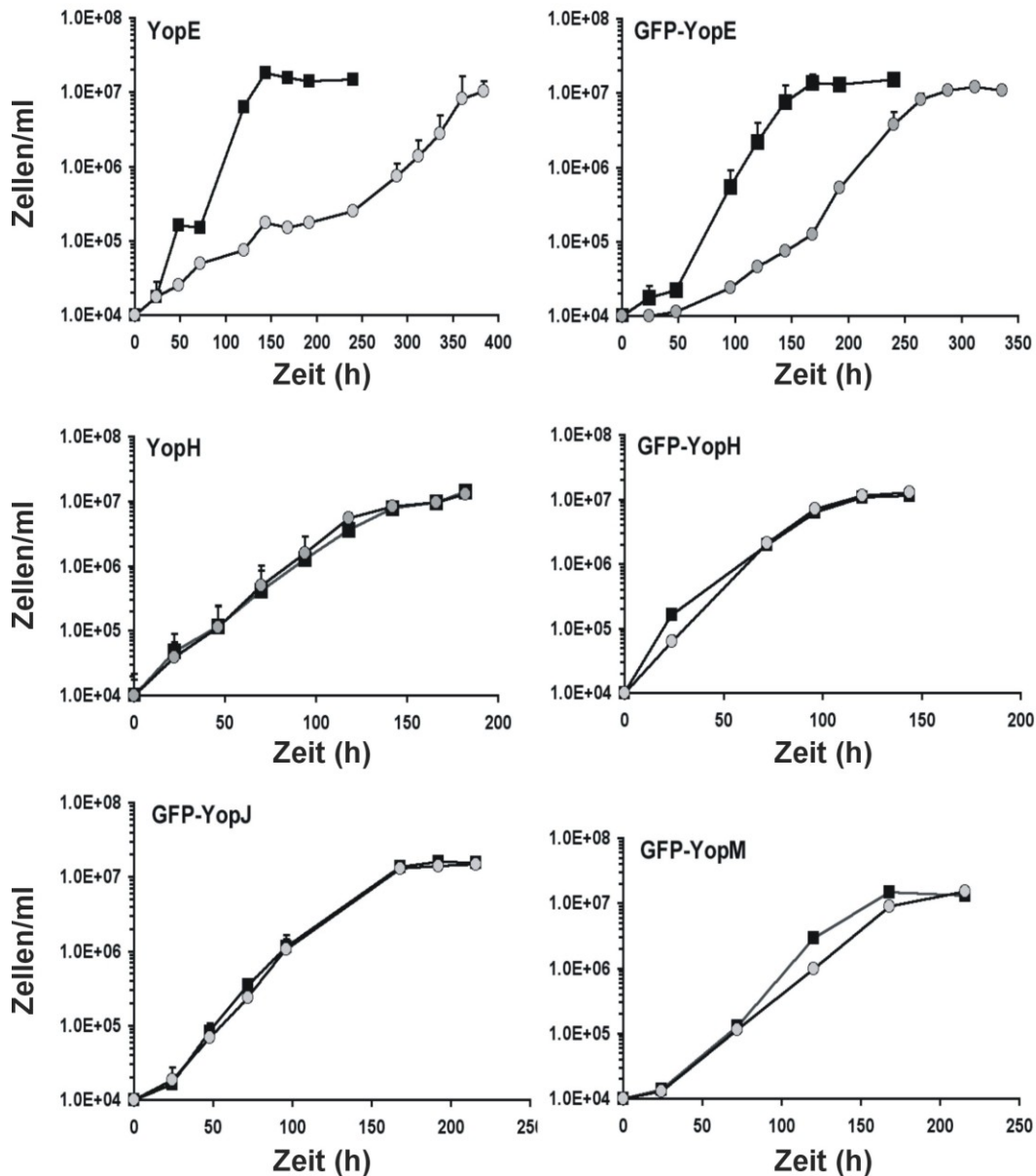


Abb. III-5: YopE inhibiert das Wachstum von *D. discoideum*. Das vegetative Wachstum wurde in Flüssigkultur von Zelllinien mit nicht-induzierter und induzierter Expression von YopE, GFP-YopE, YopH, GFP-YopH, GFP-YopJ und GFP-YopM gemessen. Die Kulturen wurden mit einer Zellzahl von 1×10^4 Zellen/ml in 30 ml angeimpft und bei 22°C auf dem Schüttler bei 150 Upm inkubiert. Die Zellen wurden zu den angegebenen Zeiten gezählt. Schwarze Quadrate: nicht-induzierte Zelllinien; graue Kreise: induzierte Zelllinien. Gezeigt werden die Mittelwerte und Standardabweichungen von zwei unabhängigen Messreihen. Die Standardabweichungen sind meist schmaler als die Symbolgrößen. Modifizierte Abb. freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Barbara Weissenmayer, University College Dublin, Irland.

3.4 Zytokinese in GFP-YopE exprimierenden Zellen

In *D. discoideum* wurde bewiesen, dass Rho GTPasen in die Regulierung der Zytokinese involviert sind. Besonders Rac1A, Rac1B und RacE haben Einfluss auf die Zellteilung (Larochelle *et al.* 1996, Dumontier *et al.* 2000, Duleh *et al.* 2005). Es wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, ob der Wachstumsdefekt von GFP-YopE exprimierenden Zellen durch einen Defekt in der Zellteilung verursacht

wird. Untersuchungen mit dem DNA-bindenden Farbstoff DAPI von GFP-YopE exprimierenden Zellen zeigten keine Veränderungen in der Anzahl und Verteilung der Kerne, weder in Zellen die in Schüttelkultur noch in den Zellen die auf Substrat gewachsen sind. In beiden Testsystemen ergab die Quantifizierung, dass die Zellen aller untersuchten Zelllinien hauptsächlich einkernig (60-80%) vorlagen, der Rest verblieb zweikernig.

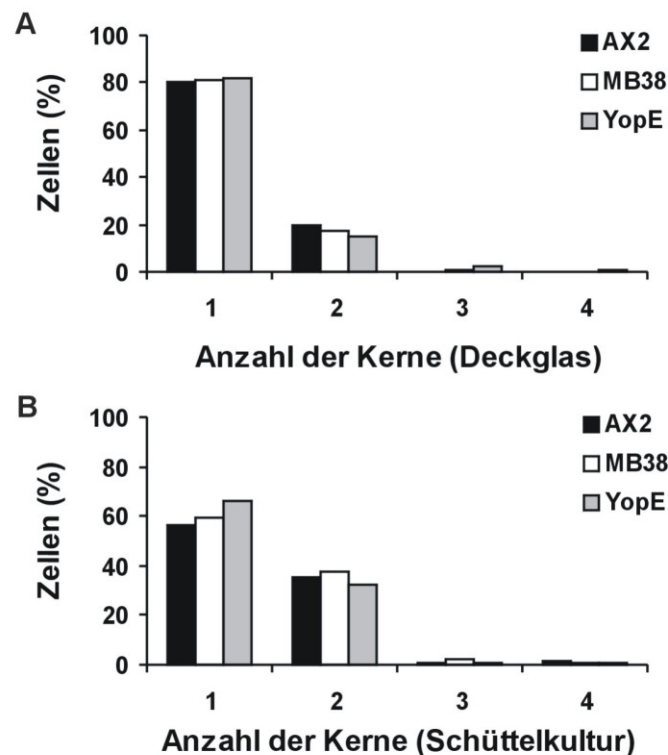


Abb. III-6: Quantifizierung der Kerne adhärenter Zellen bzw. aus Schüttelkultur. A. und B. AX2, MB38 und YopE *D. discoideum* Zellen wurden 20 min nach Absetzen auf dem Deckglas mit Methanol fixiert und die Kerne mit dem DNA-bindenden Farbstoff DAPI angefärbt. Von jedem Stamm wurden Kerne von 300 Zellen gezählt. In beiden Versuchen weisen die Zellen hauptsächlich ein bis zwei Kerne auf.

3.5 Inhibierung der Phagozytose durch YopE

Um festzustellen, ob die Phagozytose in Yop exprimierenden Zelllinien im Vergleich zu den nicht-induzierten Zelllinien beeinträchtigt ist, wurde das Wachstum rekombinanter Zellen auf *K. aerogenes* Rasen analysiert. Der folgende Versuch wurde vom Kollaborationspartner ausgeführt. Induzierte und nicht-induzierte Zelllinien, die Yop-Effektorproteine exprimieren, wurden nach 24 Stunden Expression auf Bakterien ausplattiert und die Anzahl der Kolonien nach

vier Tagen gezählt. Ist die Phagozytose nicht beeinträchtigt, bilden *D. discoideum* Zellen nach einigen Tagen eine sichtbare Kolonie auf dem Bakterienrasen. Die Anzahl der Kolonien von YopE oder GFP-YopE induzierten Zelllinien war bis zu 50% reduziert im Vergleich zur nicht-induzierten, und zur Kontrollzelllinie, die den leeren Vektor trägt bis zu 60% reduziert. Im Gegensatz hierzu war die Anzahl der Kolonien der GFP-YopH, GFP-YopM oder GFP-YopJ exprimierenden Zelllinien nicht signifikant verändert (Abb. III-7).

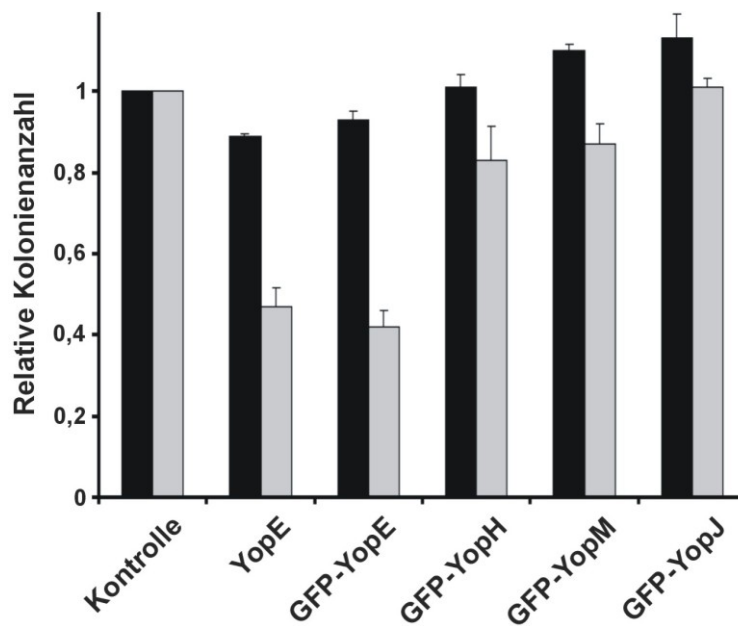


Abb. III-7: Reduzierte Kolonienanzahl von YopE exprimierenden Zellen. Die Kolonienanzahlen von YopE, GFP-YopE, GFP-YopH, GFP-YopJ und GFP-YopM exprimierenden Zellen wurden im Vergleich zu den Kontrollzellen, die den leeren Vektor tragen, ermittelt. Die schwarzen Balken repräsentieren die nicht-induzierten Zelllinien, die grauen Balken die induzierten Zelllinien. Gezeigt werden die Mittelwerte und Standardabweichungen von zwei unabhängigen Messreihen. Modifizierte Abb. freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Barbara Weissenmayer, University College Dublin, Irland.

Die Umstrukturierung des Aktinzytoskeletts während der Phagozytose wird durch Rho GTPasen bewerkstelligt (Chimini und Chavrier 2000, Ellis und Mellor 2000, Takai *et al.* 2001). Bei der Phagozytose erfolgt die Aufnahme großer Substrate, wie beispielsweise Hefen oder Latexbeads (Weijer *et al.*, 2004). Pinozytose bezeichnet das sog. "Zelltrinken", bei dem die Zelle unspezifisch Flüssigkeit endozytiert. Obwohl eine kontinuierliche Pinozytose stattfindet, bleibt die Membranoberfläche konstant, daher muss ein Rücktransport der Vesikel zur Membran erfolgen. Dabei fusionieren im Zytosol liegende Vesikel mit der Zellmembran und geben so die in ihnen gespeicherten Stoffe frei. Dieser Prozess wird als Exozytose bezeichnet. Hier wurde die Fähigkeit von GFP-YopE

exprimierenden Zellen untersucht, fluoreszenzmarkierte Hefepartikel zu internalisieren. Die Partikelaufnahme von GFP-YopE exprimierenden Zellen war im Vergleich zu den Kontrollzellen nicht reduziert (Abb. III-8A). Dies lässt den Schluss zu, dass die initiale Internalisierung der Partikel während des Phagozytoseprozesses nicht beeinträchtigt ist. In Übereinstimmung mit dieser Annahme wurde festgestellt, dass GFP-YopE exprimierende Zellen auch befähigt waren, den Flüssigphasenmarker FITC-Dextran zu internalisieren und in einer Rate abzugeben, die sich nicht signifikant von denen der Kontrollzellen unterscheidet (Abb. III-8B/C).

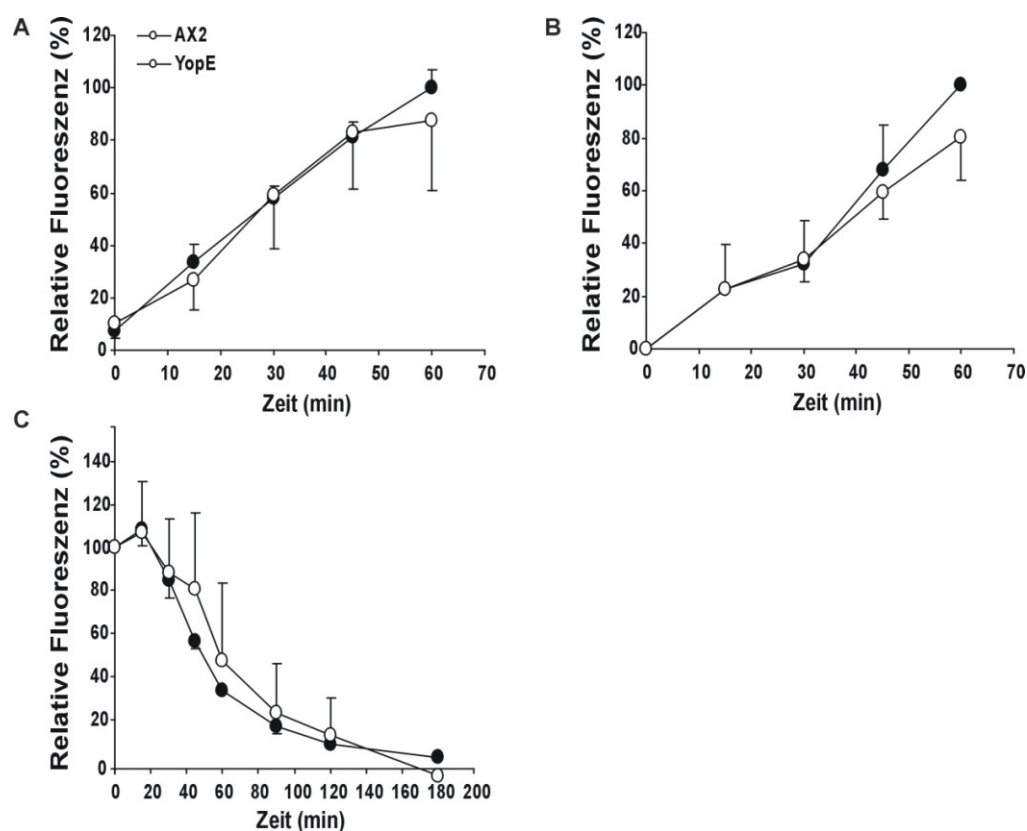


Abb. III-8: Unveränderte Phagozytose, Pinozytose und Exozytose von YopE exprimierenden Zellen. **A.** Phagozytose von TRITC-markierten Hefezellen. *D. discoideum* Zellen wurden in frischem axenischem Medium in einer Zelldichte von 2×10^6 Zellen/ml resuspendiert und fluoreszierende Hefezellen wurden zugesetzt. Die Fluoreszenz der aufgenommenen Hefen wurde zu den angegebenen Zeitpunkten gemessen. **B.** Endozytose von FITC-markiertem Dextran. *D. discoideum* Zellen wurden in frischem axenischem Medium mit einer Zelldichte von 5×10^6 Zellen/ml resuspendiert und 2 mg/ml FITC-markiertes Dextran zugesetzt. Die Fluoreszenz des endozytierten Markers wurde zu ausgewählten Zeitpunkten gemessen. **C.** Exozytose von FITC-markiertem Dextran. *D. discoideum* Zellen wurden drei Stunden mit FITC-markiertem Dextran (2 mg/ml) inkubiert, gewaschen und in frischem AX2 Medium resuspendiert. Die noch verbliebene Fluoreszenz in den Zellen wurde anschließend gemessen. Die Daten werden als relative Fluoreszenz gezeigt, wobei die Kontrolle als 100% gewertet wird. Als Kontrolle wurde der parentale MB35-Stamm verwendet. Die Daten wurden aus den Mittelwerten und Standardabweichungen von sechs unabhängigen Experimenten ermittelt. Zur Übersichtlichkeit sind die Fehlerbalken nur in eine Richtung eingetragen.

Da diese Resultate im Widerspruch zu den Ergebnissen der Phagozytoseversuche auf *K. aerogenes* Rasen stehen (Abb. III-7), sollte untersucht werden, wie die Aufnahme von TRITC-markierten Hefen in einzelnen, fixierten GFP-YopE exprimierenden Zellen aussieht. In den vorherigen Untersuchungen wurden heterogene Populationen beobachtet, daher erlaubt die Methode der Fixierung von phagozytierenden Zellen, einen genaueren Blick auf diesen Prozess. Nach Inkubation der Zellen mit fluoreszierenden Hefen zu verschiedenen Zeitpunkten und anschließender Fixierung, erfolgte eine Analyse der Intensitäten mit Hilfe des Programms ImageJ. Hier wurde die Beobachtung gemacht, dass Zellen, die gar kein oder wenig GFP-YopE exprimieren mehr fluoreszierende Hefen aufnehmen als Zellen, viel GFP-YopE exprimierenden. Als Kontrolle wurde der GFP-MB38 Kontrollvektor sowie GFP-exprimierende AX2 Wildtypzellen für die Untersuchung der Aufnahme von Hefepartikeln verwendet. (Abb. III-9A). Im Vergleich dazu wies die GFP-AX2 Kontrollzelllinie eine normale Phagozytose fluoreszierender Hefen auf (Abb. III-9A). Hierbei wurde auch die Aufnahme und Nichtaufnahme von TRITC-markierten Hefen verglichen (Abb. III-9A und B). Generell ist der Anteil an Zellen die Hefepartikel phagozytierten und nicht-phagozytierten in der Kontrollzelllinie GFP-AX2 gleichbleibend und unabhängig von der Expressionsstärke des GFPs. Im Gegensatz dazu ist bei den GFP-YopE Zellen, die das Protein in unterschiedlicher Stärke exprimieren, ein deutlicher Unterschied zwischen internalisierten und nicht-internalisierten Hefen zu sehen. Der Anteil der Zellen, die stark GFP-YopE exprimieren und Hefen aufnahmen, betrug 10% (Abb. III-9A). Im Vergleich dazu lag der Anteil der nicht aufgenommenen Hefen bei 40% (Abb. III-9B). Es konnte zwischen den Zelllinien allerdings kein Unterschied in der Anzahl der internalisierten Hefen festgestellt werden.

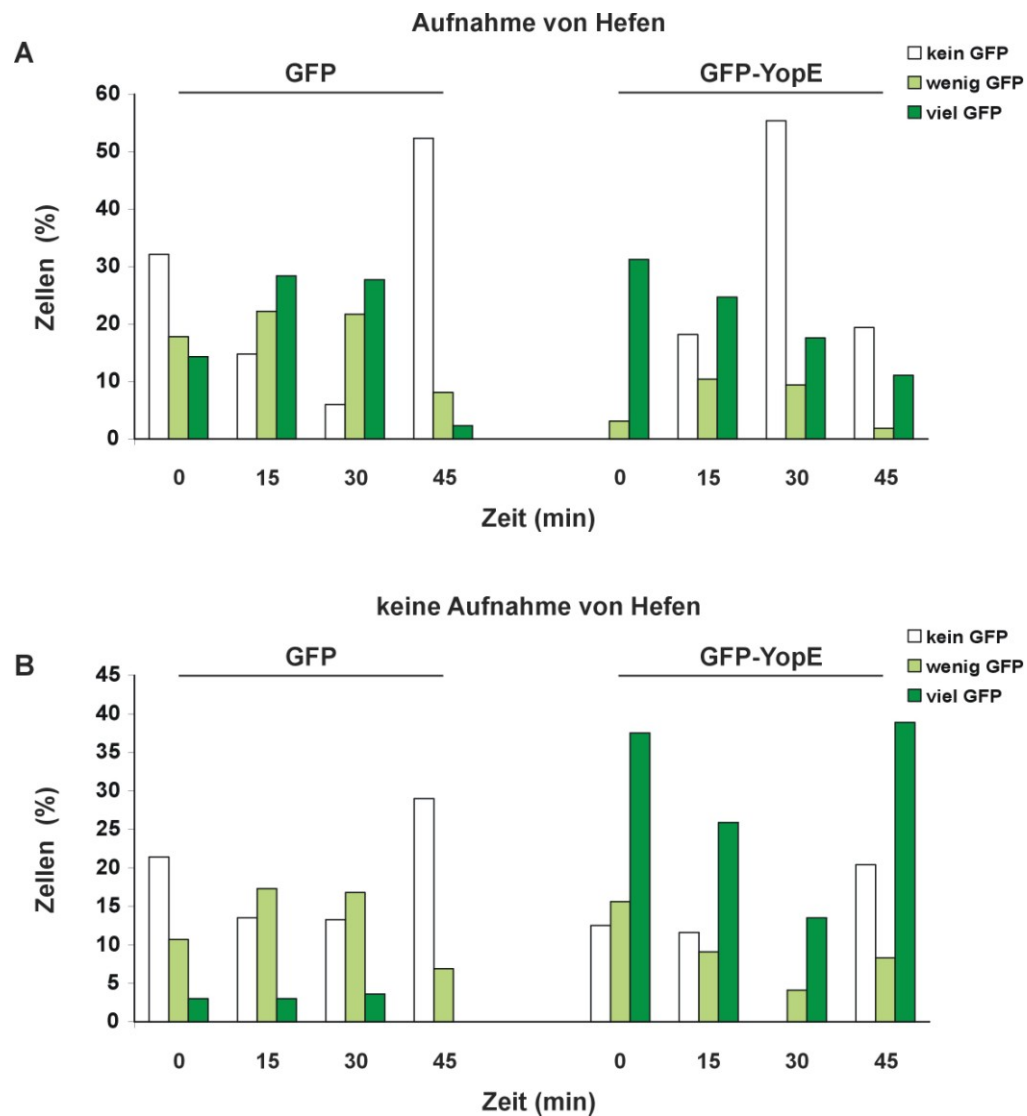


Abb. III-9: Phagozytose von TRITC markierten Hefen in GFP und GFP-YopE exprimierenden Zellen. Nach Absetzen auf einem Deckglas wurden *D. discoideum* Zellen, die GFP und GFP-YopE exprimieren, zu verschiedenen Zeitpunkten mit TRITC-markierten Hefen inkubiert, anschließend mit Methanol fixiert und am Fluoreszenzmikroskop analysiert. Mittels des Programms ImageJ wurde die Intensität der GFP-Expression von 30-40 Zellen ermittelt und quantitativ bestimmt. Dabei wurde zwischen phagozytierenden und nicht-phagozytierenden Zellen unterschieden. Der Anteil der aufgenommenen Hefen von stark exprimierenden GFP-YopE Zellen ist wesentlich geringer im Vergleich zur Kontrollzelllinie. Repräsentativ sind die Daten aus einem Experiment (von insgesamt zwei) gezeigt, n=20-30 Zellen.

3.6 YopE Expression resultiert in einem veränderten F-Aktingehalt sowie in einer veränderten Aktinpolymerisierung als Antwort auf cAMP

Da Rho GTPasen hauptsächlich in die Regulierung der Aktinstrukturierung beteiligt sind, wurde geprüft, ob die Expression von YopE in einer Veränderung sowie in einer Umverteilung des Aktinzytoskeletts resultiert. GFP-YopE exprimierende Zellen wurden fixiert und mit einem aktinspezifischen, monoklonalen Antikörper immunmarkiert. Dabei konnte eine schwächere

Anfärbung von Zellen beobachtet werden, die GFP-YopE exprimierten, verglichen mit Zellen derselben Population, die kein sichtbares GFP-YopE besaßen (Abb. III-10A). Um dies zu bestätigen wurden weiterhin Intensitätsprofile innerhalb der Zellen mit Hilfe des Programms ImageJ erstellt. Die Analyse ergab eine geringere Aktinakkumulation in GFP-YopE exprimierenden Zellen (Abb. III-10B). Eine Quantifizierung des Signals mittels Westernblotanalyse zeigte, dass vegetative GFP-YopE exprimierende Zellen ungefähr 40% weniger F-Aktin aufweisen als die parentale Zelllinie (Abb. III-10C).

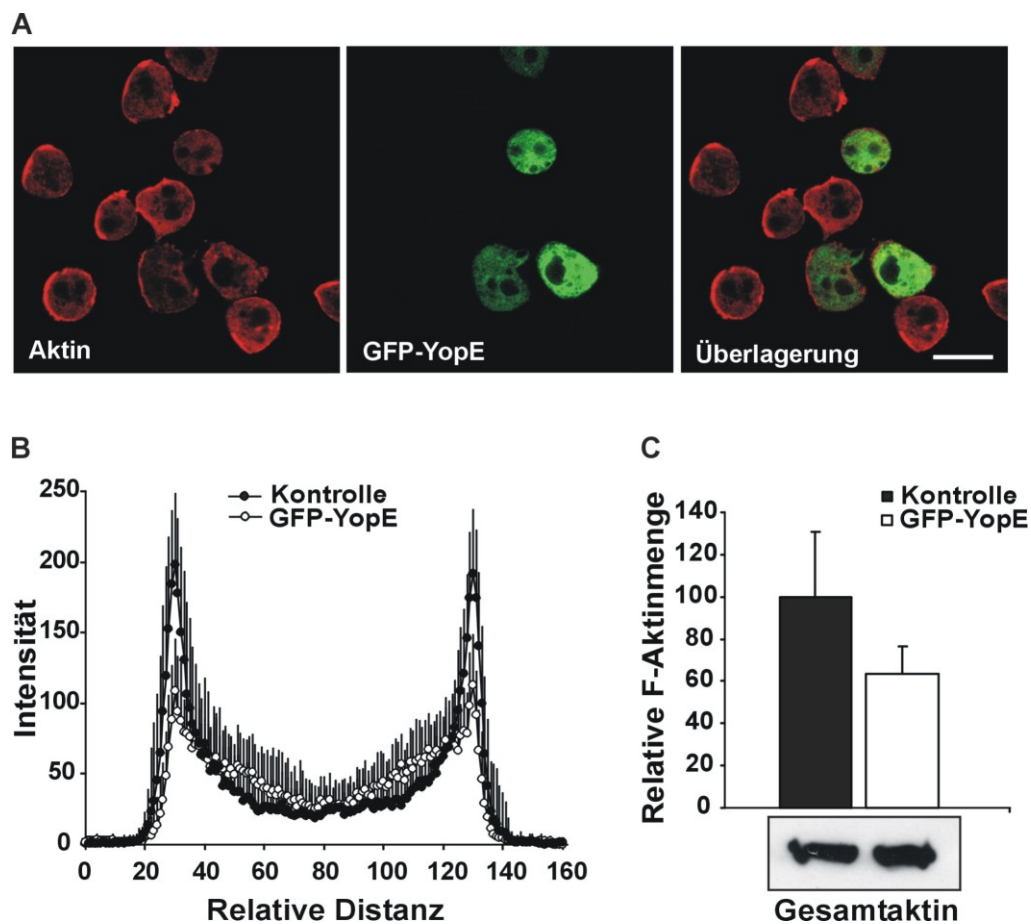


Abb. III-10: Veränderte Aktinverteilung von GFP-YopE exprimierenden Zellen. A. Induzierte GFP-YopE exprimierende Zellen wurden nach Absetzen auf einem Deckglas mit Methanol fixiert und mit aktinspezifischem, monoklonalen Antikörper Act 1-7, gefolgt von Cy3 markiertem Anti-Maus IgG, immunmarkiert. Aufnahmen wurden mit Hilfe des Laser Scanning-Mikroskops gemacht. Anzumerken ist, dass Zellen die einen hohen Gehalt an GFP-Fusionproteinen exprimierten, weniger sichtbares kortikales Aktin aufweisen. Maßstab, 10 μ m. B. Intensitätsprofile innerhalb der Zellen. Kontrollzellen sind induzierte Zellen, die kein GFP-YopE exprimieren. Die Fluoreszenzintensität wurde anhand von 30 Zellen zweier unabhängiger Präparationen gemessen und die Distanzen zwischen den Maxima am Zellkortex normalisiert. Gezeigt werden die Mittelwerte und Standardabweichungen. Aktinakkumulation ist in GFP-YopE exprimierenden Zellen weniger prominent. C. Der relative F-Aktin Gehalt wurde durch TRITC-Phalloidin Färbung der vegetativen Zellen festgestellt. Die Werte wurden auf den gesamten Proteingehalt der Lysate normalisiert. Die unveränderten Gesamtaktinmengen wurden anhand von Westernblotanalysen der Zelllysate verifiziert. 5 μ g des Gesamtproteins wurden aufgetragen. Die Membranen wurden mit monoklonalen Act1-7 Antikörper immunmarkiert. Die Kontrollzellen sind nicht-induzierte Zellen, die das GFP-YopE Plasmid tragen. Die Daten wurden aus den Mittelwerten und Standardabweichungen sechs unabhängiger Experimente ermittelt.

Ebenfalls führt eine Stimulierung mit dem Botenstoff cAMP zu einer schnellen und transienten Veränderung im F-Aktin Gehalt, was im Zusammenhang mit Änderungen im Zellverhalten steht (Hall *et al.* 1988). Diese Antwort ist von der Aktivierung von Rho GTPasen (Somesh und Insall 2003, Park *et al.* 2004, Somesh *et al.* 2006) abhängig. Aus diesem Grund wurde zu verschiedenen Zeitpunkten die Aktinpolymerisierung nach cAMP-Stimulierung in GFP-YopE exprimierenden Zellen untersucht (Abb. III-11). In den Kontrollzellen resultierte die Stimulierung durch cAMP in einem schnellen und vorübergehenden 1,7-fachen Anstieg des Gehaltes an F-Aktin. Dieser wurde direkt gefolgt von einem zweiten, niedrigeren Aktinpolymerisierungspeak, der bis zu 50 Sekunden nach cAMP Stimulierung anhielt. Im Gegensatz hierzu zeigten GFP-YopE exprimierende Zellen, kurz nach Stimulierung durch cAMP, einen einzigen, signifikant niedrigeren 1,2-fachen Anstieg des F-Aktin Gehaltes bei 10 s.

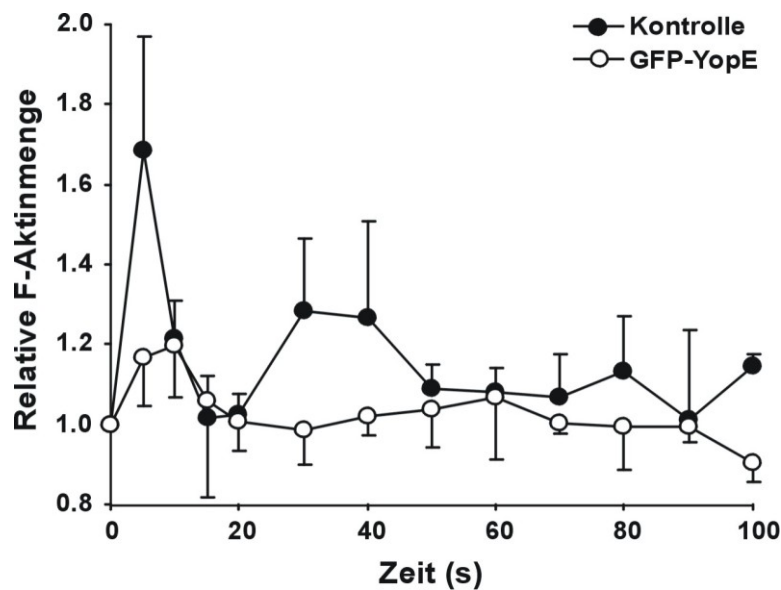


Abb. III-11: Reduzierte Aktinpolymerisierungssantwort nach cAMP-Stimulierung in YopE exprimierenden Zelllinien. Der relative F-Aktin Gehalt wurde durch TRITC-Phalloidin Anfärbung aggregationskompetenter Zellen festgestellt, die zu angegebenen Zeitpunkten nach Stimulation mit 1 μ M cAMP fixiert wurden. Kontrollzellen sind nicht-induzierte Zellen, die das GFP-YopE Plasmid tragen. Der Gehalt an F-Aktin wurde relativ zum F-Aktin Gehalt nicht-stimulierter Zellen normalisiert. Die Daten wurden aus den Mittelwerten und Standardabweichungen fünf unabhängiger Experimente ermittelt. Zur Übersichtlichkeit werden die Standardabweichungen nur in eine Richtung gezeigt.

Anschließend wurde untersucht, ob die veränderte F-Aktinantwort auf cAMP einen Effekt auf das Bewegungsverhalten von *D. discoideum* hat. Um dies festzustellen, wurde die Migration aggregationskompetenter Zellen in Richtung einer 0.1 mM cAMP-gefüllten Mikropipette beobachtet. Durch zeitabhängige Bildaufnahmen wurden die Migrationswege generiert und die Zellmotilitätsparameter berechnet (Tabelle 2). Der Vergleich des Bewegungsverhaltens lieferte keine Hinweise auf eventuelle Unterschiede im Hinblick auf die Parameter. Sowohl die GFP-YopE exprimierenden Zellen, als auch der Kontrollstamm wiesen in Ab- sowie Anwesenheit von cAMP, ein ähnliches Migrationsverhalten auf. Die Zellen polarisierten, bildeten Zellströme und migrierten in Richtung der Mikropipettenspitze (Abb. III-12) oder wanderten in Richtung einer anderen *D. discoideum* Zelle, da *D. discoideum* unter Aggregationsbedingungen selbst in der Lage sind, cAMP zu sezernieren (Veltman und Haastert 2003).

Puffer	Kontrolle	GFP-YopE
Geschwindigkeit ($\mu\text{m}/\text{min}$)	7.35 \pm 3.62	7.27 \pm 3.18
Direktionalität ($\mu\text{m}/\text{min} \times \text{deg}$)	0.42 \pm 0.24	0.53 \pm 0.25
Persistenz	2.10 \pm 1.25	2.23 \pm 1.50
Richtungswechsel (deg)	40.01 \pm 14.51	38.41 \pm 15.52
cAMP		
Geschwindigkeit ($\mu\text{m}/\text{min}$)	9.02 \pm 2.89	8.23 \pm 3.08
Direktionalität ($\mu\text{m}/\text{min} \times \text{deg}$)	0.78 \pm 0.19	0.71 \pm 0.21*
Persistenz	2.94 \pm 1.72*	2.83 \pm 1.53
Richtungswechsel (deg)	20.13 \pm 10.49*	26.49 \pm 2.69*

Tab. 1. Analyse der Zellmotilität von GFP-YopE Zellen. Zeitabhängige Serienaufnahmen wurden aufgenommen und in 30 Sekundenintervallen gespeichert. Objekte, deren Geschwindigkeit $<2 \mu\text{m}/\text{min}$ betrug, wurden von der Analyse ausgeschlossen. Die Persistenz ist eine Einschätzung der Bewegungsnachhaltigkeit in Richtung des Weges auf die cAMP-Quellen zu. Die Direktionalität ergibt sich aus der Netto-Wegslänge dividiert durch die gesamte Wegslänge und ergibt 1.0 für den geraden Weg. Der Richtungswechsel repräsentiert den durchschnittlichen Wechsel der Winkel in Richtung der Bewegung. Die angezeigten Werte setzen sich aus den Mittelwerten und den Standardabweichungen von ungefähr 50 Zellen und drei unabhängigen Experimente zusammen. Kontrollzellen sind Zellen des parentalen MB35 Stammes.* $P < 0.01$, relativ zu dem gleichen Stamm in Puffer (Student's t Test).

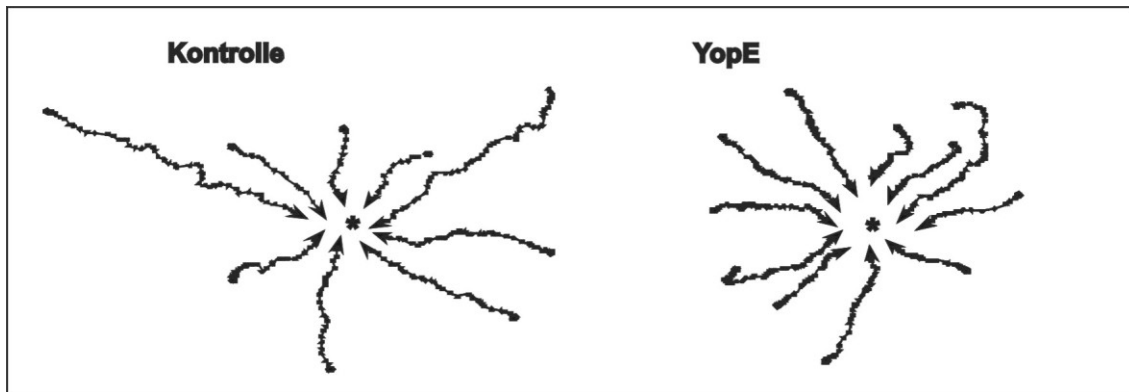


Abb. III-12: Schematische Darstellung der chemotaktischen Bewegung von Kontroll- und YopE Zellen. Die Zellen wurden sechs Stunden nach Nahrungsentzug auf Deckgläser überführt und anschließend mit einer 0,1 mM cAMP-gefüllten Mikropipette stimuliert. Dabei wurden Bilder der migrierenden Zellen in 30 Sekundenintervallen aufgenommen. Die Zellbewegungen wurden mit Hilfe des DIAS-Programms analysiert. Die Kontrollzellen sowie GFP-YopE Zellen bewegten sich in Richtung der cAMP-Quelle (als * gekennzeichnet).

3.7 YopE blockiert teilweise die Effekte von RacH

Das Spektrum an Veränderungen, die durch YopE in *D. discoideum* hervorgerufen werden, führt zu der Vermutung, dass verschiedene Rho GTPasen durch dieses Protein beeinflusst werden (Aepfelbacher 2004, Mejia *et al.* 2008). Das Vorhaben, die Spezifität von YopE gegen *Dictyostelium* GST-fusionierte Rho GTPasen in Pulldown-Experimenten zu untersuchen, war durch eine sehr schnelle Degradierung des GFP-YopE Fusionsproteins während der Zellyse nicht möglich. Die subzelluläre Lokalisation von YopE, im Besonderen die Assoziation mit verschiedenen Membrankompartimenten, führt zu der Annahme, dass RacH eine der Rho GTPasen ist, die beeinträchtigt wird. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression der Rho GTPase RacH zu diversen zytoskeletalen Defekten führt (Somesh *et al.* 2006), daher sollte untersucht werden, ob RacH ein Ziel von YopE darstellt. Aus diesem Grund wurde ein *D. discoideum*-Stamm generiert, der myc-fusioniertes YopE und GFP-RacH überexprimiert, um den Wachstums-, Endozytose- und Zytokineseprozess sowie die Vakuolinverteilung zu untersuchen. Um zu untersuchen, ob der Wachstumsdefekt von RacH (Somesh *et al.* 2006) durch YopE wieder aufgehoben werden kann, wurde dies in Schüttelkultur analysiert. Hierbei wurden AX2 und der leere myc/bsr-Vektor als Kontrollzelllinien verwendet und GFP-exprimierendes RacH sowie myc-fusioniertes YopE, das in GFP-RacH Zellen transformiert wurde. Es konnte ein vermindertes Wachstum in GFP-RacH Zellen festgestellt werden, während die Koexpression eine ähnliche Wachstumsrate aufwies wie die Kontrollzelllinien.

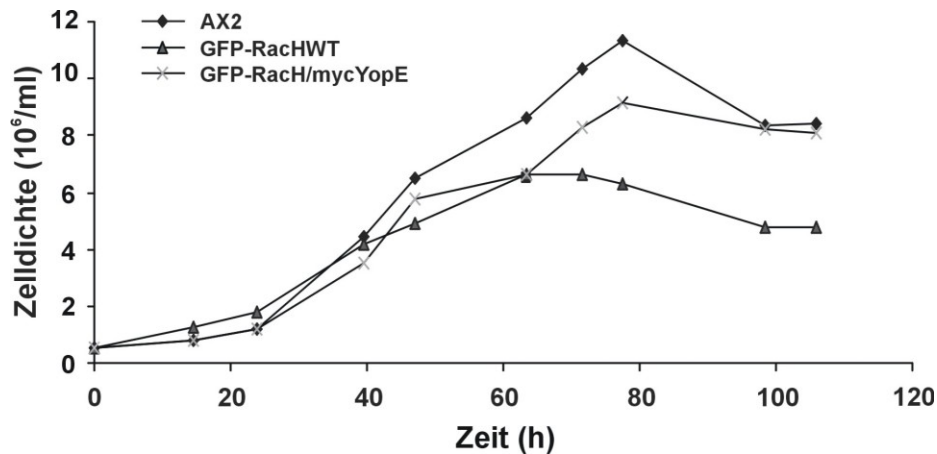


Abb. III-13: GFP-YopE hebt den Wachstumsdefekt durch RacH auf. Das vegetative Wachstum wurde in Flüssigkultur von AX2, GFP-RacH und myc/Yop exprimiertes Fusionsprotein in GFP-RacH untersucht. Die Kulturen wurden mit einer Zellzahl von $0,5 \times 10^6$ Zellen/ml in 15 ml angeimpft und bei 21°C auf dem Schüttler bei 160 Upm inkubiert. Die Zellen wurden zu den angegebenen Zeiten gezählt. Gezeigt werden die Messwerte von einem repräsentativen Experiment. Insgesamt wurden drei Messreihen durchgeführt.

Des Weiteren wurde untersucht, ob YopE zur Aufhebung der verminderten Pinozytose führt. Auch hier konnte die reduzierte Aufnahme des GFP-RacH Überexprimierers im Vergleich zu den Kontrollzelllinien beobachtet werden, während die Einführung von YopE in den RacH Überexprimierer zu einer deutlichen Aufhebung des Pinozytosedefektes führte (Abb. III-13).

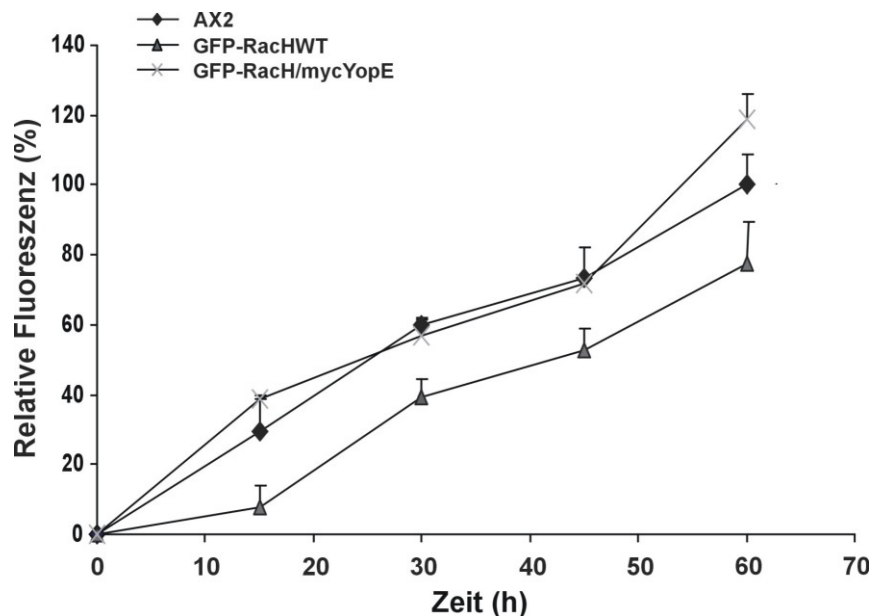


Abb. III-14: YopE hebt den defekten Pinozytoseprozess durch RacH Überexpression auf. *D. discoideum* Zellen wurden in frischem, axenischem Medium mit einer Zelldichte von 5×10^6 Zellen/ml resuspendiert und 2 mg/ml FITC-markiertes Dextran zugesetzt. Die Fluoreszenz des aufgenommenen Markers wurde zu ausgewählten Zeitpunkten gemessen. Die Daten wurden aus den Mittelwerten und Standardabweichungen von vier unabhängigen Experimenten ermittelt. Zur Übersichtlichkeit sind die Fehlerbalken nur in einer Richtung dargestellt.

Zuvor wurde gezeigt, dass eine RacH und Rac1 Überexpression einen leichten Zytokinesedefekt aufweisen (Somesh *et al.* 2006, Dumontier *et al.* 2000). Um zu untersuchen, ob die beiden Rho GTPasen ein Ziel für YopE darstellen, wurde der Prozess der Zytokinese untersucht. Im Vergleich zu den Kontrollzelllinien konnte in beiden Fällen keine Kompensierung durch YopE festgestellt werden.

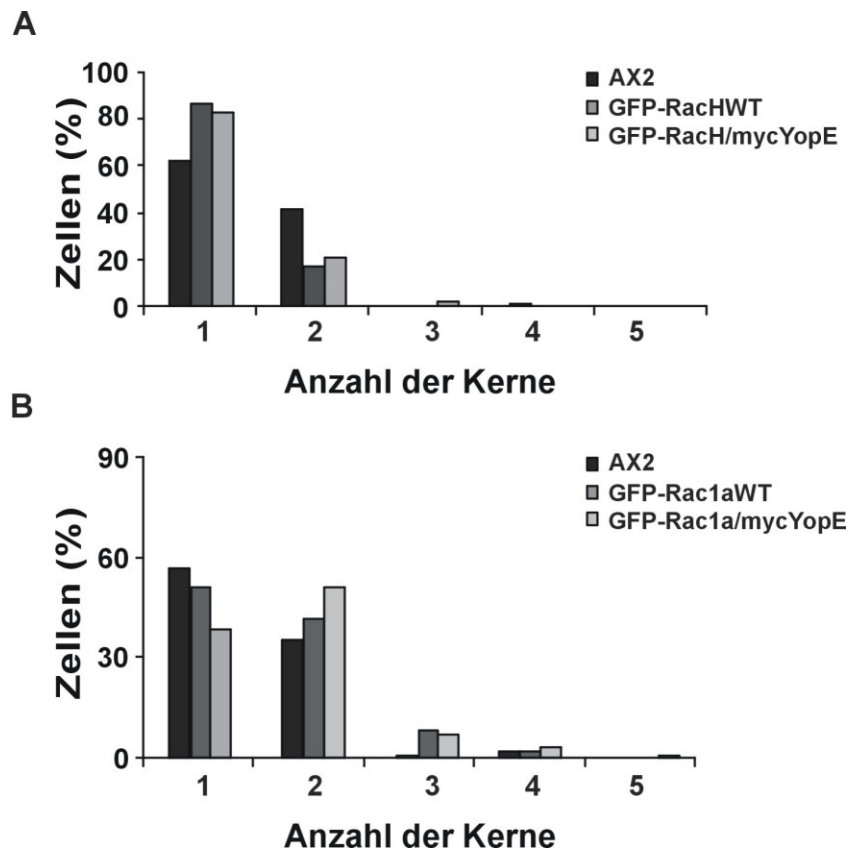


Abb. III-15: Quantifizierung von Kernen der Kontrollzelllinien und der Fusionskonstrukte. *D. discoideum* Zellen wurden 20 min nach Absetzen auf dem Deckglas mit Methanol fixiert und die Kerne mit DAPI angefärbt. Von jedem Stamm wurden Kerne von 300 Zellen gezählt und anhand des Histogramms statistisch ausgewertet. In beiden Fällen weisen die Zellen hauptsächlich ein bis zwei Kerne auf.

3.8 Verminderte Rac1 Aktivierung in YopE Zellen

In früheren Studien wurde gezeigt, dass nach cAMP-Stimulierung der Anteil an aktiviertem RacB ansteigt (Park *et al.* 2004). In den YopE Überexpressionsmutanten wurde beobachtet, dass die Aktinpolymerisierungsantwort auf cAMP gestört ist, dadurch bestand die Vermutung, dass eine verminderte Rac1-Aktivität der Grund dafür sein könnte (Aili *et al.* 2006). Daher sollte in der vorliegenden Arbeit untersucht werden, wie sich Rac1 in GFP-YopE exprimierenden Zellen nach cAMP-Stimulierung verhält. Für die Versuche stand eine GST-Fusion der

Rac-bindenden Domäne des humanen PAK1 (GST-PAK-CD) zur Verfügung (Somesh *et al.* 2006). Der Aktivitätstest ermöglicht eine Einschätzung der Unterscheidung der Aktivitäten von Rac1 in induzierten YopE überexprimierenden Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten nach cAMP-Stimulierung. Hierbei wurden als Kontrolle der GFP-MB38 Vektor und GFP-YopE exprimierende Zellen verwendet, die in ihrem GTP-gebundenen aktiven Stadium an das Fusionsprotein GST-PAK-CD gekoppelt und aus einem Zelllysate durch Immobilisierung (Pull-down) isoliert wurden. An Glutathion-Sephrose Beads wurde zuvor das Fusionsprotein GST-PAK-CD angeheftet, das hier zur Detektierung des aktiven Rac1 in den Zelllysaten dient (s. Material und Methoden 2.5.1). Nach der Inkubation der Nitrozellulosemembran mit einem monoklonalen anti-Rac1 Antikörper war eine Quantifizierung der unterschiedlichen Aktivitäten mit Hilfe der Image Quant-Software möglich. Alle Analysen der Westernblots zeigten nach der Immunmarkierung deutliche Banden bei 21 kDa. Diese Größe entspricht der des Rac1a, das ebenfalls zur Kontrolle aufgetragen wurde (nicht gezeigt). Im Vergleich zum Aktivitätstest der GFP-YopE exprimierenden Zellen konnte bei den Kontrollzellen eine durchgehend hohe Aktivität detektiert werden, die nach fünf Sekunden am höchsten war (Abb. III-16A). In der Westernblotanalyse von GFP-YopE Lysaten konnte keine Veränderung in den Stärken der detektierten Banden beobachtet werden. Die quantitative Analyse mit Hilfe des Programms Image Quant zeigte in den Kontrollzellen bei fünf Sekunden einen maximalen 1,6-fachen Anstieg der relativen Rac1-GTP Menge nach Stimulierung durch cAMP. Im Gegensatz dazu führte die Stimulierung durch cAMP zu keinem Anstieg der relativen Rac1-GTP Menge in den GFP-YopE exprimierenden Zellen. Hier konnte ein signifikant niedrigeres Aktivitätsmuster festgestellt werden (Abb. III-16B).

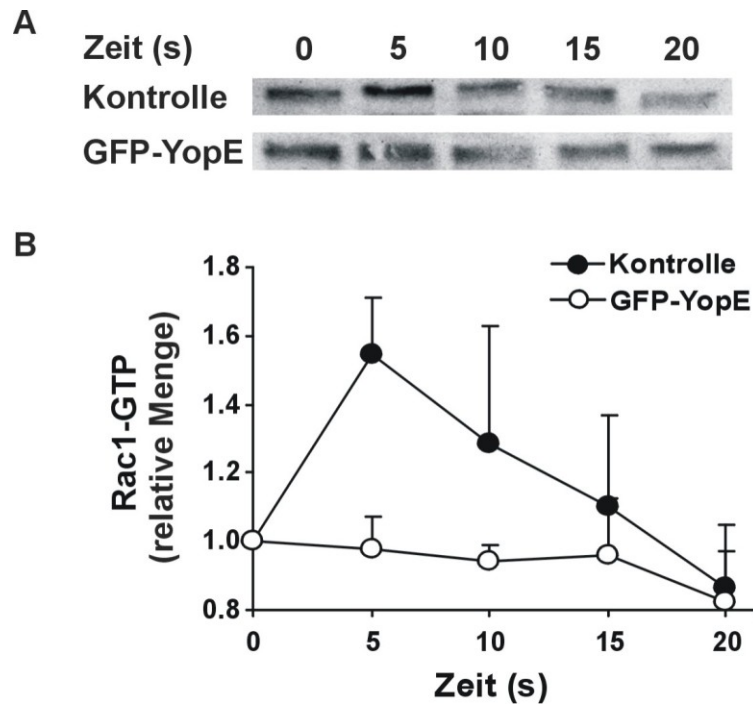


Abb. III-16: Rac1-Aktivitätstest in GFP-YopE exprimierenden Zellen. **A.** Westernblotanalyse. Die Lysate wurden wie in Abschnitt 2.5.1 behandelt. Auf das SDS-Gel wurden 15 μ l Rac1-Lysat und 15 μ l der übrigen Proben, die zu verschiedenen Zeitpunkten nach der cAMP-Stimulierung entnommen wurden, aufgetragen und -getrennt. Nach dem Transfer der Proteine auf eine Nitrozellulosemembran, erfolgte die Inkubation mit dem anti-Rac1 Antikörper. Die Aktivität ist in den AX2 Zellen nach 5 s am höchsten, während in den GFP-YopE exprimierenden Zellen die maximale Aktivität des Rac1 bei 10 s lag. Repräsentativ sind hier Aktivitätsbanden von jeweils einer Membran gezeigt. **B.** Quantitative Analyse der relativen Menge an aktiviertem Rac1 nach cAMP Stimulierung mittels der Image Quant-Software. Rac1 zeigte in den Kontrollzellen nach 5 s höchste Aktivität, während in den GFP-YopE Zellen kein Aktivitätsmaximum zu ermitteln war. Die Daten wurden aus den Mittelwerten und Standardabweichungen von sechs unabhängigen Experimenten ermittelt.

3.B Charakterisierung des mitochondrialen Membranproteins Miro

3.9 Sequenzvergleich der Miro Homolge

Um die Homologien zwischen den Miro Proteinen in den verschiedenen Organismen bestimmen zu können, wurde mittels des Programmes ClustalW2 ein Sequenzvergleich erstellt. Dabei wurden die Sequenzen der Miro Proteine von *H. sapiens*, *D. melanogaster*, *S. cerevisiae* und *D. discoideum* verwendet. Die unterschiedlichen Farben und Punkte weisen die Ähnlichkeiten sowie die partielle Konservierung der einzelnen Miro Homologe untereinander auf (Abb. III-17). Um die Identitäten zwischen den Miro Homologen mit dem *D. discoideum* Miro (*gemA*) zu bestimmen, wurde ein *Blast* Vergleich (*Blast* Programm des NCBI (*National Center for Biotechnology Information*)) durchgeführt. Dabei wurde festgestellt, dass die humanen Miro1 und Miro2 Proteine eine 33%ige Übereinstimmung mit *DdMiro* in ihrer Proteinsequenz aufweisen. Des Weiteren ergab die Analyse der Sequenzvergleiche von *S. cerevisiae* eine 29%ige und mit *D. melanogaster* eine 31%ige Übereinstimmung mit der Proteinequenz des *DdMiro*. Die humanen Miro Proteine und das *D. melanogaster* Miro Protein zeigen untereinander die höchsten Ähnlichkeiten (48% Identität). Die Miro Proteine sind durch die Evolution hindurch hochkonserviert.

```

HsMiro-1      -----MKKDVRILLVGEPRVGKTSLIMSLVSEEFPEEVPPRAEEITIPADV--PERV  51
HsMiro-2      -----MRRDVRILLLGEAQVVGKTSLLLSLVGEEFPPEVPPRAEEITIPADV--PEKV  51
DmMiro        MGQYASQRKNVRILLVGDAGVGKTSLLLSLVSEYFPEEVPPRAEEITIPANVT--PEQV  58
ScGem1        -----MTKETIRVVICGDEGVGKSSLIVSLTKAEFIPTIQDVLPPISIPRDFSSSPTYS  54
DdgemA        -----MKNNIKVILIGDEQVGKSTIINSFISESFSEITQKTLPEVTIPAEFNN-EICS  52
.: .: .: .: .: .: .: .: .: .: .: .: .: .: .: .: .: .: .: .: .: .: .: .:

HsMiro-1      PTHIVDYSEAEQSDQLHQEISQANVICIVAVNNKHSIDKVTSRWIPLINERTDKDS-- 109
HsMiro-2      PTHIVDYSEAEQTDEELREEIHKANVVCVYDVSEEAIEKIRTKWIPLVNGGTTQGP-- 109
DmMiro        PTSIVDFSAVEQSEDALAAEINKAHVVCIVYAVDDDDTLDRITSHWLPLVRAKCNPSLDG 118
ScGem1        PKNTVLIDTSDSDLIALDHELKSAVWLVYCDHES--YDHVSLFWLPHFRSLGLNIPVI 112
DdgemA        TRIIDTFDDGKNLKNQMMEIRTAIVIVYVDFRFDTFMSIRMKWIPLINQLRGSNK-- 110
. . . . . : * : * . . : ** : * : * . .

HsMiro-1      -----RLPLILVGNKSDLVEYSSM-----ETILPIMNQYTEIETCV  145
HsMiro-2      -----RVPIILVGNKSDLRSGSSM-----EAVLPIMSQFPEIETCV  145
DmMiro        EGDAAEAEGDTRQREPIRKPIVLVGNKIDLEIYSTM-----DSVLAIMEDYPEIESCV  171
ScGem1        LCKNKCDISNVN---ANAMVSENSDDDDIDTKVED-----EEFIPILMEFKEIDTCI  162
DdgemA        -----SPIIIVGNKLDLVDDKHENNKVQIEETIQYFRSTYSNTIQWL  152
.: . . . * : . . : : : :

HsMiro-1      ECSAKNLNKINISELFYYAQKAVLHPTGPLYCFEEKMKPACIKALTRIFKISDQDNDGTLN 205
HsMiro-2      ECSAKNLRNISELFYYAQKAVLHPTAPLYDPEAKQLRPACAQALTRIFRLSDQDLQALS 205
DmMiro        ECSAKSLHNISEMFYYAQKAVLHPTSPLYMMEEQELTSACKKSLVRIFKICDIDGDNLLN 231
ScGem1        KTSAKTQFDLNQAFYLCQRAITHPI SPLFDAMVGE LKPLAVMALKRIFLLSDLNQDSYLD 222
DdgemA        ECSAKTMENLPELLYASQTSVFFPERILYNREENKMTTEGCE RALKRIFKLC DHNDGSL 212
: ** . : : : * . * : : * : : : : : : : : * * * . : * * .

```

HsMiro-1	DAELNFFQRICFNTPLAPQAL	EDVKNVVRKHISDG-----	VADSGTLKGF	FLHT	256								
HsMiro-2	DEELNAFQKSCFGHPLAPQAL	EDVKTVVCRNVAGG-----	VREDRLTLDG	FLFLNT	256								
DmMiro	DYELNLFQRRCFNTPLQPQ	ILDEVKAVIQKNVPDG-----	YNDAVTLKGF	FLFLHC	282								
ScGem1	DNEILGLQKCFNKSIDVNE	LNFKDLLLDSKHDQEYINR	KLYVPGKGI	TKDGFVLNK	282								
DdgemA	EEEEINYFQTKCGHETMTSE	EIQNIQQFVLSKIPDG-----	VNSNGFTEKGF	LYMNL	263								
:	* : * :	* : :	:	:	:								
HsMiro-1	LFIQGRHETTWTVLRRF	GYDDDLDTPEYLFPLLKIPP	DCTTELNHHAYLFL	QSTFDKH	316								
HsMiro-2	LFIQGRHETTWTILRRF	GYSDALELTADYLSPLIH	VPPGCSTELNHLGYQ	FVQVFEKH	316								
DmMiro	LFIQGRNETTWAVALRRF	GYNDQLEMCQEYLRPPLK	IPPGSSTELSHRQQ	FLIAVFERY	342								
ScGem1	IYAERGRHETTWAAILRT	FHYTDSLICINDKILHP	RLVVPDTSSEVLS	SPKGYRFLVDIFLKF	342								
DdgemA	LFLLRGPCQHTWTSLS	RSFNDDDLVLLSEYVHPT	LQVPPNHNTILSS	MGNFFKSLFEKY	323								
:	:	:	:	:	:								
HsMiro-1	DLDRDCALSPDELKDLFK	VFPYIPWG--PDVNNVTCT	NER-GWITYQGFL	SQWTLTTYLD	373								
HsMiro-2	DQDRDGALSPVELQSLFS	VFPAPWG--PELPRVT	RT-EA-GRLPLHGY	LCQWTLVTTYLD	372								
DmMiro	DRDGDGALSP	EEHKMLFSTCPAAPW	SYSTDIRKSC	PINETTGWVTLHG	WLCRWTLMTLID	402							
ScGem1	DDIDN	GGLLNQELHRLFKCT	PGLPKLWTS	TNFPFSTV	VNNKGCITLQGWLA	QWSMTTFLN	402						
DdgemA	DDSDG	VLSFDLVSTPKPIWE	IGFEKH	FNTDKDSN---	LTLSGFLSLWNLQTYEN	380							
*	*	*	:	:	:								
HsMiro-1	VQRCLEYLGLGY	SILTEQESQASAVTVTR	DKKIDLQKKQTQ-R	NVFR	CVIGVKNCGKS	432							
HsMiro-2	VRSCLGHLGYLGY	PTLCEQD-QAHAITVT	REKRLDQEK	QGTQ-RS	VLLCKVVGARGVGKS	430							
DmMiro	VVKTMEYLA	YLGFN-VHENDS	QLAAIHVTR	RERRIDLAKR	QSS-RSVYKCH	VIGPKGSGKT	460						
ScGem1	YSTTTAYLVY	FGFQEDARLALQVT	KPRKRRRS	SGKLYRSN	INDRKVFNCFVIG	KPCCGKS	462						
DdgemA	YKVTLEYLA	YFGSQTE	NNNIDMISILN---	SRELDIKSN	QFT-RNIVN	CVYVFGAEAVGKT	436						
:	:	:	:	:	:								
HsMiro-1	GVLQALLGRNLMRQ	KKIREDHKSYYAINT	VVYGGQEKYLL	LHDIS---	ESEFLTEAE--	I	487						
HsMiro-2	AFLQAF	FLGRGLGHQDTR--	EPPGYAIDTV	VNGQEKYLIL	CEVGT--	DGLLATSLD--	A	484					
DmMiro	GMC	RGFLEDMHKLIGKE	FKTNVVCINS	VQVYGGQEK	HLILRDI	DVRHALDPLQ	QE--	V	518				
ScGem1	SLL	EAF	GRSFSEYSP--	TIKPRI	AVNSLEL	KGKQYYLIL	QELGEQ	EY	AILENKDKLK	520			
DdgemA	TFL	N	TFIGKSFSTLY	NATNGNDN	FKVCGHLLKN---	KYLILSEY	VG---	E	KIPTAELKS	489			
.	.	:	:	:	:	:	:	:	:	:			
HsMiro-1	ICDVVCLVY	DVSNPKSFEYCARIF	KQHFMDSR-IP	CLIVA	AKSDLHEV-----	534							
HsMiro-2	TCDVAC	LMFDGSDPKSFAH	CASVYKHHYMDGQ-TP	CLFV	SSKADLPEG-----	531							
DmMiro	NCDVAC	LVYDSSNPKSFEY	VARIYIKYYAESK-IP	VMIV	GTKCDMDER-----	565							
ScGem1	ECDVIC	LTYSDDPEFSY	LVSLDKFTHLQD-L	PLV	FVASKADLDKQ-----	567							
DdgemA	KCDLV	CLLYDCNSEQ	SFKFIENIYNQ	LKQQQLN	PIVFI	RTKNNNNNNNNNNNNNNNNNN	549						
**	:	:	:	:	:	:	:						
HsMiro-1	-----	KQEY	SISPTDFCR	KHKMPP	PPQAFTCNTADAPS	KDIFVK	572						
HsMiro-2	-----	VAVSG	PSPAEFCR	KHRLP	PVPFSCAGPAEP	STTIFTQ	569						
DmMiro	-----	RQDY	LMQPS	EFCDKY	KLLP	PHLFLSKTNKK--	E	LYTK	600				
ScGem1	-----	QQR	CQIQP	DELA	DEL	LVNHPLHIS	SRWLS	SSLN-EL	FIK	604			
DdgemA	NNL	NNNNNN	INNNNNNN	NNNTTT	NANV	STSKIID	SFFKSH	KNYSP	KDFS	ISRSNSIYHE	609		
.	.	:	:	:	:	:	:						
HsMiro-1	LTTMAMY	PHVTQADLKS-----	STFWLR--	ASFG	ATVFAVLGF	FAMYKALLKQR----	618						
HsMiro-2	LATMA	AFPHLVHAE	ELHP-----	SSF	WLRGLL	GVVGA	AAVAVLS	FSLYR	VLVKSQ-----	618			
DmMiro	LATMA	AFPHLRQ	FGLMTE-----	DP	KLWLK--	AGL	VAAAT	MLGF	IVLKT	ISAA	GAHTR	652	
ScGem1	ITEA	ALDPGK	NTPLPEE	TAAK	VDYRQ	TALIF	GSTV	GFVAL	CSFT	LMKLF	KSSK	PK-	662
DdgemA	MMET	IVNSS	FNDNS	NGSN-----	GS	NNS	ILTY	LVIA	AGV	AGV	GLLSKY	LAKK-----	658
:	:	:	:	:	:	:	:						

Abb. III-17: Sequenzvergleich von Miro Proteinen aus verschiedenen Organismen. Der Sequenzvergleich wurde mit Hilfe des ClustalW2-Programmes erstellt. Sterne zeigen komplett konservierte Aminosäuren in allen Spezies auf. Doppelpunkte weisen auf eine hohe Ähnlichkeit hin, während Einzelpunkte die partielle Konservierung darstellen. Ähnliche Aminosäuren sind durch gleiche Farben hervorgehoben.

3.10 Subzelluläre Lokalisation von Miro

Für die folgenden Lokalisationsstudien von Miro in *D. discoideum* Zellen wurden Konstrukte von GFP-Fusionsproteinen generiert, die das Vollängenprotein Miro (engl. *fullenght*, GFP-MiroFI), und die Transmembranregion (GFP-MiroTM) von Miro exprimieren. Des Weiteren wurde ein Konstrukt generiert, das für GFP-

Fusionsprotein von Miro mit deletierter Transmembranregion (GFP-Miro Δ TM) kodiert (Abb. III-18).

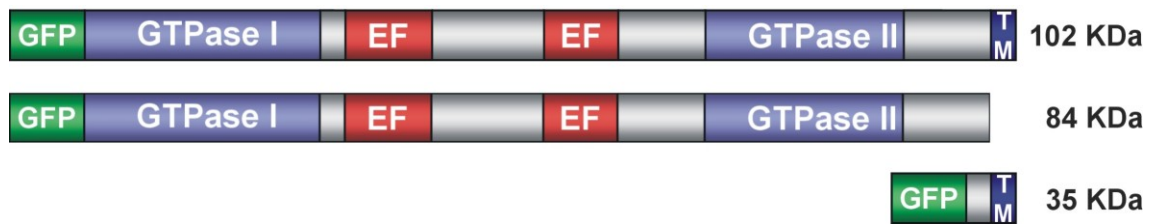


Abb. III-18: Schematischer Aufbau der GFP-Fusionskonstrukte von Miro. Um Lokalisationsstudien in *D. discoideum* Zellen durchführen zu können, wurden mittels PCR DNA Fragmente erzeugt, die in pGEM-Teasy und anschließend nach Restriktion mit BamHI in den GFP-exprimierenden pDEX-Vektor kloniert wurden. Nach Transformation in *D. discoideum* AX2 Wildtypzellen erfolgte ein Screen von Zellen, die eine hohe Expression an GFP-MiroFI, GFP-MiroTM und GFP-Miro Δ TM aufweisen.

Die mitochondriale Lokalisation von Miro wurde mit dem monoklonalen Antikörper K72-624-1, der im Rahmen dieser Arbeit generiert wurde, in GFP-Miro exprimierenden Zellen untersucht. Der Antikörper ist gegen die erste GTPase Domäne von Miro gerichtet. Dabei wurde festgestellt, dass Miro an den Mitochondrien lokalisiert. Besonders deutlich ist dies in der Überlagerung zu erkennen (Abb. III-19). Auffällig war, dass die stark und weniger stark GFP-MiroFI exprimierenden Zellen keinen Unterschied in der Färbung mit dem K72-642-1 Antikörper aufweisen. Möglicherweise wurde durch GFP, ein Epitop des generierten Antikörpers so verdeckt oder verändert, so dass dies zu einer Veränderung in der Detektionsstärke des Antikörpers führt.

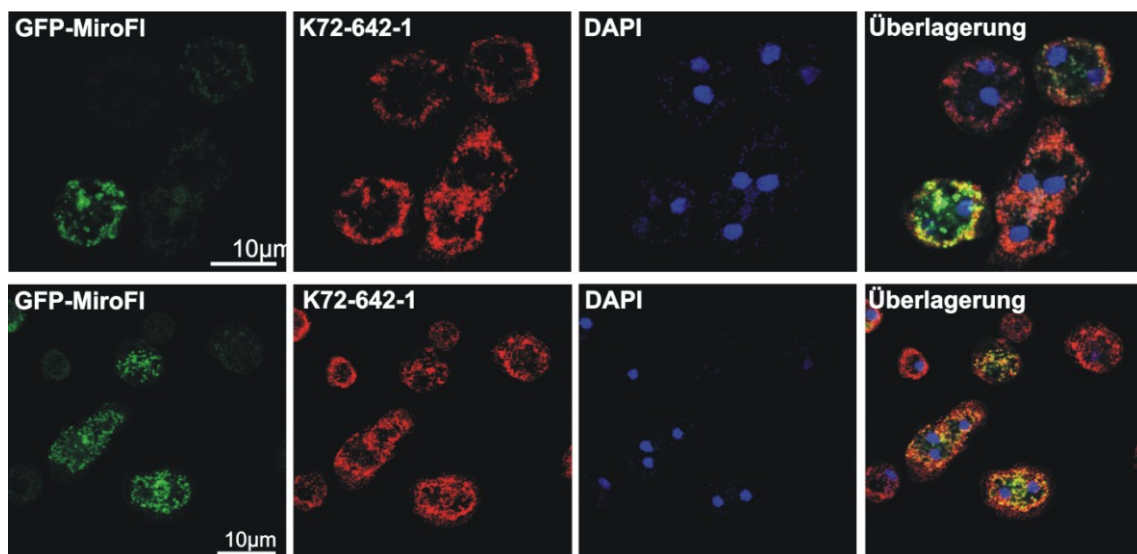


Abb. III-19: Subzelluläre Lokalisation von Miro (vorherige Seite). GFP-Miro exprimierende *D. discoideum* Zellen wurden mit Methanol fixiert und mit dem monoklonalen Antikörper K72-624-1 inkubiert, gefolgt von einer weiteren Inkubation mit Cy3-markiertem sekundären Antikörper. DAPI wurde zur Visualisierung der Kerne und der mitochondrialen DNA verwendet. Der generierte monoklonale Antikörper konnte an den Mitochondrien detektiert werden. Maßstab, 10µm.

Für die weiteren Immunfluoreszenzstudien wurden die Konstrukte verwendet, die die verschiedenen GFP-Fusionsproteine exprimieren. Wie auch in Abb. III-19 gezeigt, konnte das Vollängenprotein an der mitochondrialen Membran detektiert werden. Die Mitochondrien wurden mit Hilfe des rotfluoreszierenden Farbstoffs MitoTracker Red visualisiert, der zur Anfärbung *in vivo* verwendet wird und dessen Akkumulation vom Membranpotential abhängig ist (Abb. III-20A). Anhand des Konstrukts, das nur die GFP-Transmembranregion von Miro exprimiert, konnte gezeigt werden, dass diese für die Lokalisation des Proteins ausreichend ist (Abb. III-20B) Durch Deletion der Transmembrandomäne von Miro konnte keine Lokalisation an den Mitochondrien beobachtet werden, vielmehr ist eine diffuse Färbung im Zytoplasma zu erkennen (Abb. III-20C).

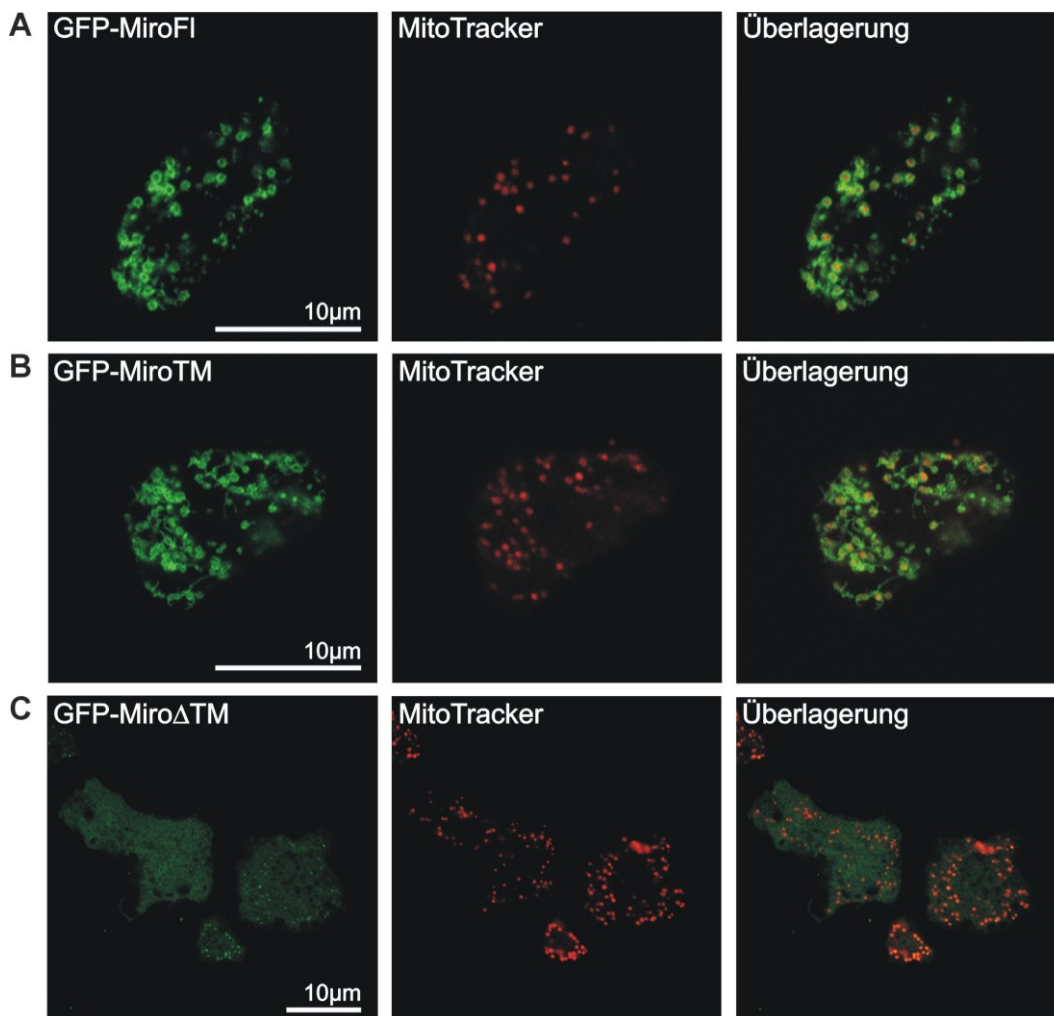


Abb. III-20: Subzelluläre Lokalisation vom Miro (vorherige Seite). **A.** Lokalisation von GFP-Miro. Das Volllängenprotein ist als ringartige Struktur an den Mitochondrien zu erkennen. **B.** GFP-MiroTransmembran. Die Transmembrandomäne ist für die Verankerung des Proteins notwendig und ausreichend. **C.** GFP-Miro Δ TM. Die Deletion der Transmembrandomäne führt zu einer Zerstreuung des Proteins innerhalb des Zytoplasmas. Die Zellen wurden mit dem mitochondrialen Membranmarker MitoTracker Red angefärbt und mit Paraformaldehyd/Pikrinsäure fixiert. Aufnahmen wurden mit einem konfokalen Laser Scan Mikroskop durchgeführt. Maßstab, 10 μ m.

3.11 Generierung und Charakterisierung der *gemA* Mutante

3.11.1 Nachweis des *gemA*-Knockouts

Um die Funktion von Miro zu analysieren, wurde eine *gemA* defiziente Zelllinie generiert. Das *gemA* Gen befindet sich auf dem Chromosom 1 von *D. discoideum* und wird von vier Introns unterbrochen. Ein Zielvektor wurde dadurch erzeugt, in dem ein 1,8 Kb langes Fragment auf dem *gemA* Locus durch eine 1,3 Kb lange Blastocidinresistenzkassette (*Bsr*) ersetzt wurde. Das Nukleosid-Antibiotikum Blastocidin dient als Selektionsmarker, das zur Erzeugung stabiler Zelllinien eingesetzt wird. Mittels PCR an genomischer DNA mit den Oligonukleotidpaaren MiroKO/A-fwd/MiroKO/B-rev und MiroTM(C)-fwd/MiroKO/D-rev wurden ein 5' Fragment von 1 Kb und ein 3' Fragment von 1,4 Kb amplifiziert und die Blastocidinresistenzkassette flankierend, in den pBlueScript-Vektor mittels EcoRI (Schnittstelle aus der *Multiple Cloning Site* des pBlueScript Vektors) kloniert (Abb. III-21). Durch anschließende Restriktion mit EcoRI wurde der linearisierte Vektor erzeugt, durch Elektroporation in AX2 Wildtypzellen transformiert und in Petrischalen durch Zugabe von Blastocidin kultiviert bis einzelne Kolonien zu erkennen waren. Die resistenten Transformanten wurden subkloniert und auf Bakterienrasen angezüchtet.

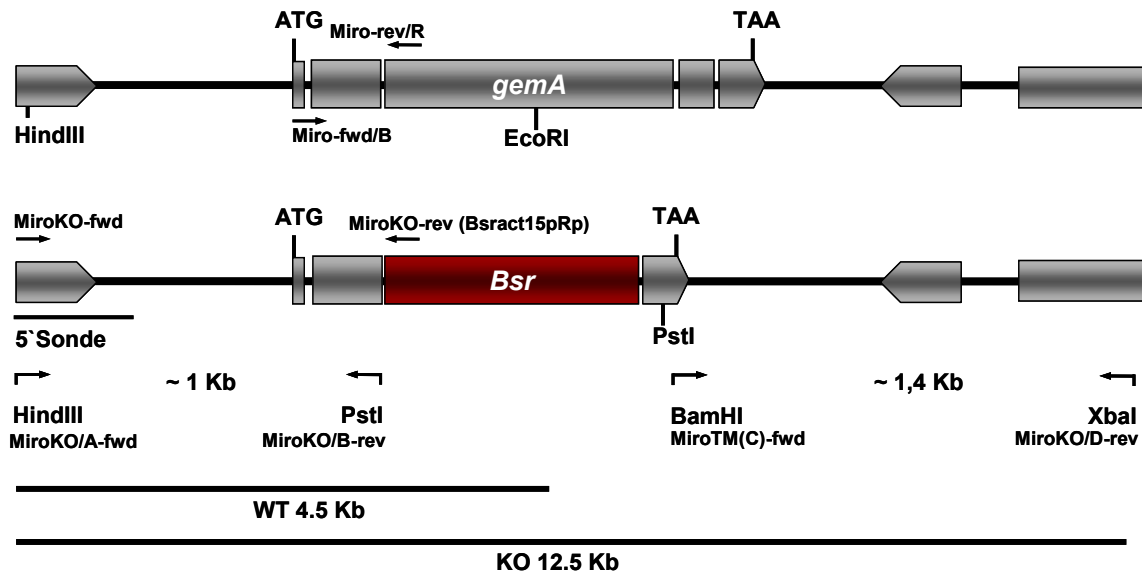


Abb. III-21: Schematische Darstellung der Erzeugung des Knockoutvektors. Das 1,8 Kb lange Fragment des *gemA* Locus wurde durch ein Blasticidinresistenzgen mit einer Länge von 1,3 Kb ersetzt. Oligonukleotidpaare wurden zur Erzeugung von 3' und 5' Fragmenten mittels PCR Analyse verwendet und das Blasticidinresistenzgen zwischen diesen Fragmenten kloniert. Eine 5' Sonde von 450Bp wurde für die anschließende Southernblotanalyse verwendet. Das Konstrukt wurde in der Arbeitsgruppe generiert.

Mittels eines Restriktionstests und anschließender Southernblotanalyse wurde das Rekombinationsereignis untersucht (Abb. III-22). Drei unabhängige Klone wurden für die weitere Analyse verwendet. Bei der Restriktion der DNA wurde EcoRI verwendet, da es im *gemA* Gen eine Restriktionstelle besitzt. Im generierten Knockoutkonstrukt sollte diese Schnittstelle nach dem homologen Rekombinationsereignis nicht mehr vorhanden sein. Demnach sollte die Restriktion der DNA mit EcoRI von AX2 Wildtyp- und *gemA* defizienten Zellen, zu unterschiedlich langen Fragmenten führen. Die Restriktionsanalyse zeigte im Falle des AX2 Wildtyps, das erwartete Fragment mit einer Größe von 4,5 Kb, während der Knockoutstamm mit einer Fragmentgröße von 12,5 Kb nach Hybridisierung mit der 5'Sonde, bestätigt werden konnte. Die schwache Bande im *gemA*⁻ Klon 5 ließ auf ein unklares Rekombinationsereignis vermuten. Es konnte nicht ausgeschlossen werden, dass es sich um einen Knockout handelt, da auch eine schwache Bande bei 12,5 Kb detektiert wurde. Daher wurde dieser Klon für die weiteren Nachweise weiterhin verwendet.

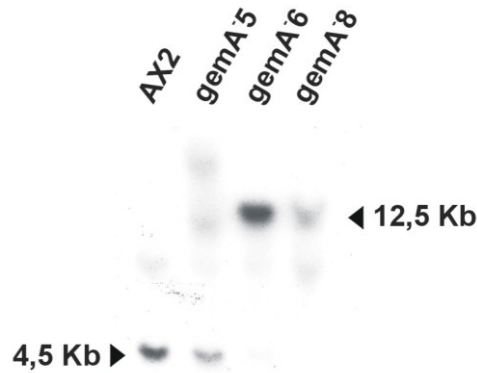


Abb. III-22: Southernblotanalyse. Die Restriktionsanalyse wurde mit dem Enzym EcoRI durchgeführt, die geschnittene genomische DNA mittels einer Gelelektrophorese aufgetrennt und anschließend auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Die Membran wurde mit der radioaktiv markierten 5'Sonde hybridisiert (Abb. III-21). Die Resultate auf dem Southernblot bestätigen die Größen der geschnittenen Fragmente sowohl bei dem AX2 Stamm, der mit einer Größe von 4,5 Kb als auch bei dem Knockoutstamm (*gemA*⁻) mit einer Größe von 12,5 Kb. Die Zahlen links und rechts neben den Blots geben die Laufhöhe des Größenstandards in Kilobasen (Kb) an.

Die PCR bewies weiterhin, dass es sich tatsächlich um Knockoutstämme handelt (Abb. III-23). Hierfür wurden MiroKO-fwd und MiroKO-rev Oligonukleotide verwendet, die die Blastocidinreistenzkassette umfassen (Abb. III-23A) und im Falle des Knockouts eine 1,2 Kb lange Bande amplifizieren. Als Kontrolle wurden Miro-fwd/B und MiroKO-rev Oligonukleotide verwendet, die sowohl ein Stück des intakten *gemA* Gens als auch ein kleines Fragment des Knockoutvektor erkennen und 1 Kb lange Banden in allen Stämmen erzeugen können (Abb. III-23B).

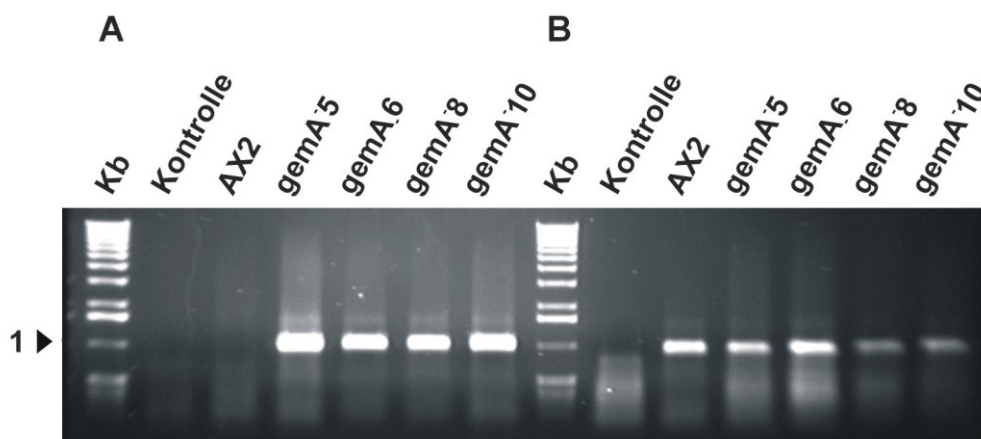


Abb. III-23: Nachweis des *gemA*-KO per PCR. Nach Gewinnung genomischer DNA aus AX2 und *gemA*-KO Zellen, erfolgte der Nachweis des *gemA*-KO mittels PCR. **A.** Das Rekombinationsereignis konnte mit MiroKO-fwd und MiroKO-rev Oligonukleotiden nachgewiesen werden. Ein 1,2 Kb langes Fragment wurde amplifiziert. **B.** Zusätzlich wurden Oligonukleotide verwendet, die ein 1 Kb langes Fragment in AX2 Zellen und in den *gemA* Knockout Stämmen generieren, da ein Teil des intakten *gemA* Gens noch vorhanden war.

Alternativ zur Northernblotanalyse wurde eine RT-PCR durchgeführt. Hierbei wurden Oligonukleotide verwendet, die nur in der AX2-DNA ein 0,6 Kb großes Fragment, das der ersten GTPase Domäne in *gemA* entspricht, erkennen und amplifizieren (Abb. III-24A). Die fehlenden Banden bestätigen, dass das *gemA*-Gen in der erzeugten Zelllinie nicht intakt war. (Abb. III-24B). Oligonukleotide, die spezifisch die *bsr*-Kassette erkennen, bestätigten ebenfalls die *gemA* Defizienz der Zellen. Durch den Einsatz von RhoGDI Oligonukleotiden war der Erhalt einer positiven Kontrolle möglich. Diese RT-PCR bestätigte, dass das *rdiA*-Gen (RhoGDI) nicht beschädigt und daher die genomische DNA in beiden Fällen intakt war (Abb. III-24C).

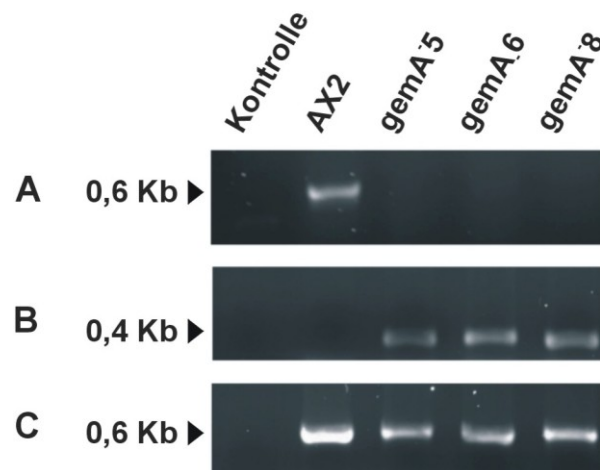


Abb. III-24: Nachweis des *gemA*-KO per RT-PCR. Oligonukleotide wurden verwendet, die cDNA Fragmente erzeugen, die die erste GTPase Domäne **A** oder das Blastocidinresistenzgen *bsr* **B** umfassen. **C.** Als Kontrolle dient das *rdiA* Gen. Das *gemA*-Gen ist 660 Basenpaare groß und weder in der Negativkontrolle (enthielt keine DNA) noch bei dem *gemA*-KO Konstrukt zu erkennen. Anhand der *rdiA* Oligonukleotide konnte die 0,6 Kb Bande in AX2 und *gemA*-KO ermittelt werden, was auf eine intakte genomische DNA verweist.

Anhand von Westernblotanalysen mit Hilfe des generierten, monoklonalen Antikörpers konnte nach Immunmarkierung, das endogene Protein in AX2 Wildtypzellen bei 75KDa detektiert werden. In GFP-MiroFl exprimierenden Zellen wurden das GFP-Fusionsprotein bei 102KDa und das endogene bei 75KDa erkannt. Die Abwesenheit des Proteins konnte im *gemA* Knockout auch in der Westernblotanalyse bestätigt werden (Abb. III-25).

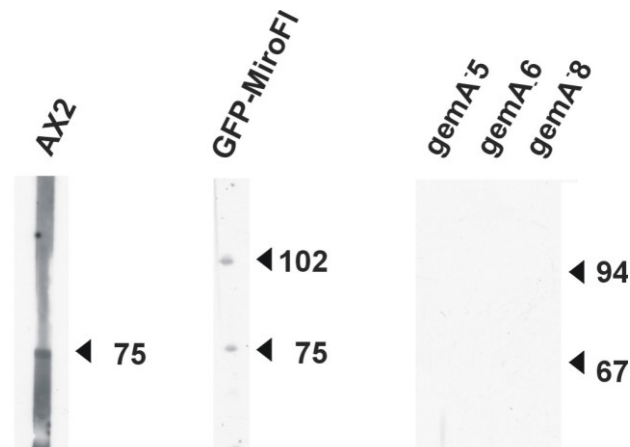


Abb. III-25: Nachweis des *gemA*-KO mittels Westernblotanalyse. Monoklonale Antikörper wurden verwendet, die spezifisch die erste GTPase Domäne von Miro erkennen. AX2, GFP-MiroFI und *gemA*⁻ Lysate wurden auf Polyacrylamidgelen aufgeladen und -getrennt, auf Nitrozellulosemembran transferiert und mit dem monoklonalen K72-641-1 Antikörper immunmarkiert. Die *gemA* Defizienz konnte aufgrund der fehlenden Detektion des Proteins bestätigt werden.

Abschließend wurde durch indirekte Immunfluoreszenz die *gemA* Deletion der Zellen mit dem K72-641-1 Antikörper untersucht. Erwartungsgemäß erfolgte in AX2 Zellen eine Detektion des Miro Proteins, erkennbar durch die ringartigen Strukturen um die Mitochondrien herum (Abb. III-26A). In den Knockoutstämmen Nr. 5 und Nr. 8 konnte das Protein nicht detektiert werden, während im Knockoutstam Nr. 6 eine schwache Anfärbung der Zellen zu beobachten ist (Abb. III-26B). Für die weiteren Versuche wurden die *gemA*⁻ Klone 5 und 8 verwendet.

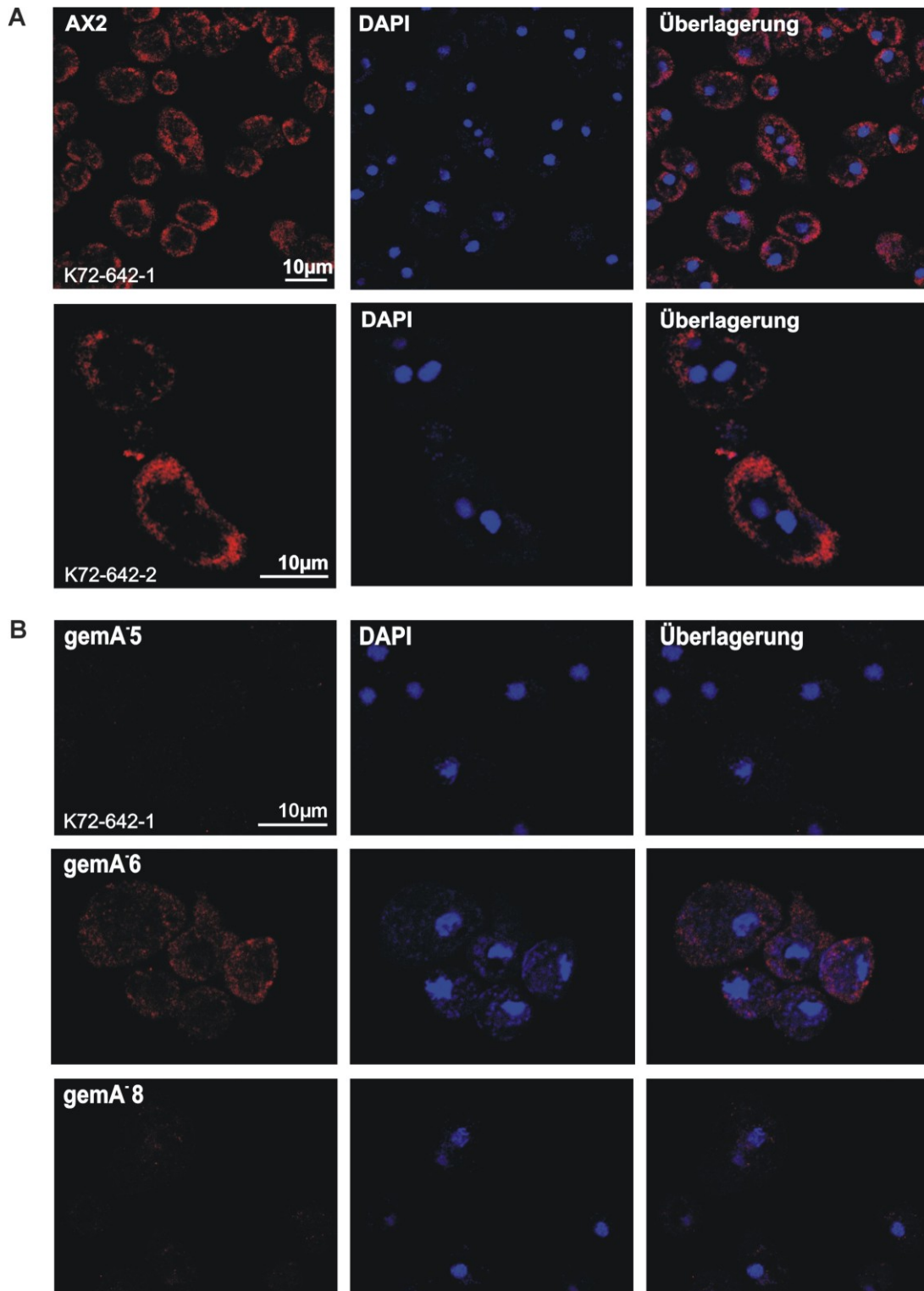


Abb. III-26: Nachweis der *gemA* Mutanten mittels Immunfluoreszenz. Die Zellen wurden mit Methanol fixiert und mit den monoklonalen Antikörpern K72-642-1 und K72-642-2 inkubiert. Anschließend wurde ein Cy3 markierter sekundärer Antikörper verwendet. **A.** In AX2 Zellen konnte eine Akkumulation um die Mitochondrien gezeigt werden. DAPI wurde verwendet um die Kerne und die mitochondriale DNA zu visualisieren. **B** In *gemA* defizienten Zellen konnte in den Knockoutklonen 5 und 8 keine Protein detektiert werden, während im Knockoutklon 6 eine schwache Färbung zu beobachten war. Maßstab, 10µm.

3.11.2 Wachstum von *gemA*-KO Zellen

In diesem Versuch wurden die Wachstumsraten der *gemA*-KO Zellen dokumentiert und mit denen der AX2 Zellen verglichen. Die Wachstumskurven wurden unter Standardbedingungen, auf dem Schüttler bei 160 Upm und bei 21°C, ausgehend von einer Zelldichte von $0,25 \times 10^5$ Zellen/ml, ausgeführt. Die maximale Zelldichte der AX2 Zellen betrug ca. 14×10^6 Zellen/ml und die der *gemA*-KO Zellen lag bei maximal 6×10^6 Zellen/ml. Unter diesen Bedingungen betrug die Verdopplungszeit bei den AX2 Zellen 16h, während die *gemA* Knockoutszellen eine Verdopplungszeit von 33h und 38h aufwiesen. Eine signifikante Differenz zwischen dem Wachstumsmuster der AX2 und *gemA*-KO Zellen konnte festgestellt werden (Abb. III-27A). Um festzustellen, ob die Phagozytose in *gemA* defizienten Zelllinien beeinträchtigt ist, wurde das Wachstum auf *K. aerogenes* Rasen analysiert. Nach 24 Stunden konnte die Bildung von einer Kolonie auf dem Bakterienrasen beobachtet werden. Bis zu sechs Tage nach der Ausplattierung wurden die wachsenden Kolonien abgemessen und ihre Größe verglichen. Hierbei wurde im Vergleich zu den Wildtypzellen eine kleinere Kolonienbildung bei der *gemA* defizienten Zelllinie festgestellt (Abb. III-27B).

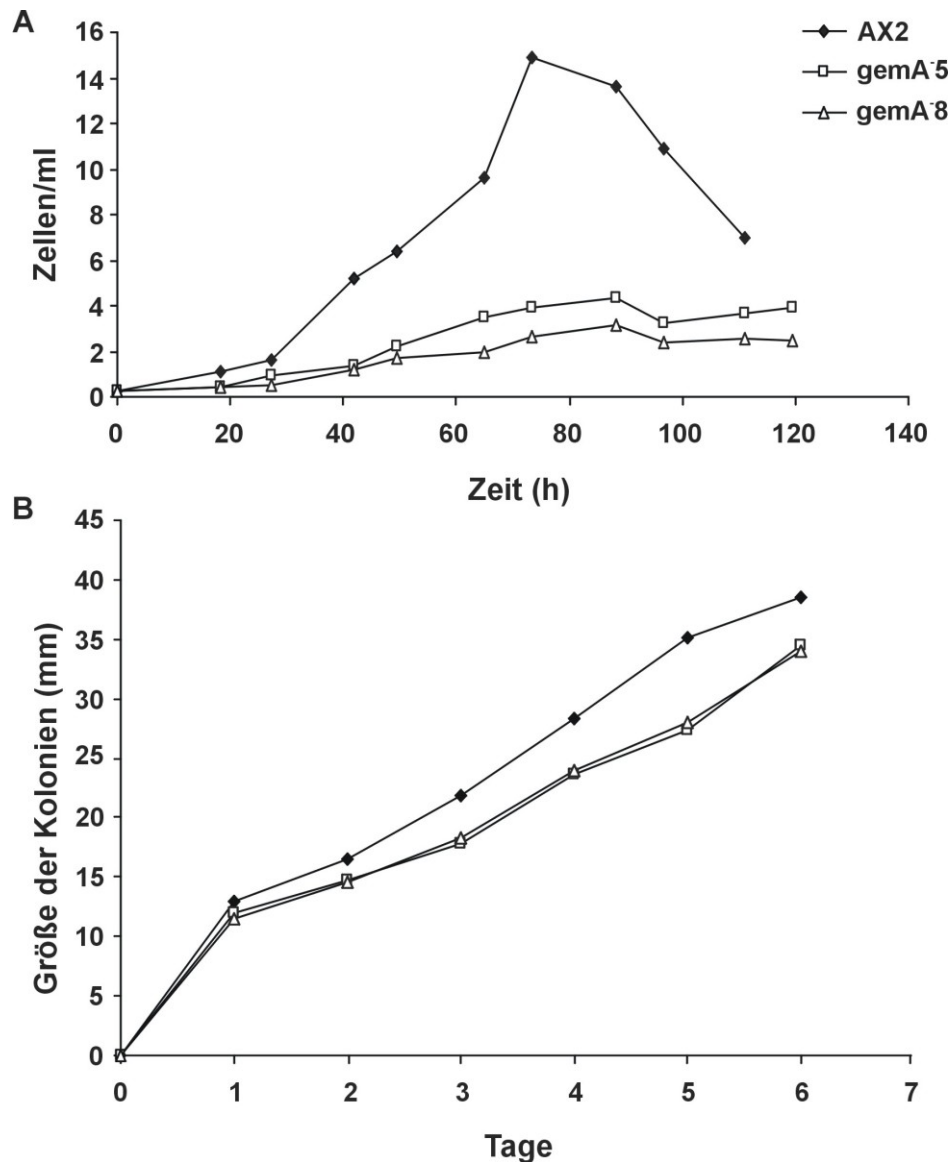


Abb. III-27: Wachstum von AX2 und *gemA*-KO Zellen in Schüttelkultur und auf *K. aerogenes* Rasen. A. Die Kulturen wurden mit einer Zellzahl von $0,25 \times 10^5$ Zellen/ml angeimpft und bei 21°C auf dem Schüttler bei 160 Upm inkubiert und zu den angegebenen Zeiten gezählt. Das Wachstum von *gemA* defizienten Zellen ist im Vergleich zu den AX2 Zellen erheblich beeinträchtigt. Der AX2 Stamm zeigt einen kontinuierlichen Wachstumsanstieg, während die *gemA* null Zellen einen geringen Anstieg zeigen. **B.** 15 µl Zellsuspension wurden in die Mitte einer mit *K. aerogenes* ausgetrichenen Platte pipettiert. Die wachsende Kolonie wurde nach 24 Stunden und an den darauffolgenden Tagen gemessen. Im Vergleich zu den AX2 Zellen wurde eine kleinere Kolonienbildung der *gemA* defizienten Zellen festgestellt. Gezeigt werden die Daten von drei unabhängigen Messreihen.

Des Weiteren war von Interesse, ob der Wachstumsdefekt in Schüttelkultur und auf *K. aerogenes* Rasen durch Transformation und damit Expression des GFP-Fusionsproteins Miro in *gemA* defizienten Zellen („Rescue“) kompensiert werden kann. Neben den AX2 Wildtypzellen diente als Kontrollzelle die GFP-MiroFI exprimierende Fusionsprotein. In Schüttelkultur konnte eine vollständige Aufhebung des Defektes durch Einführung des GFP-MiroFI exprimierenden

Fusionsproteins in die *gemA* Zelllinie festgestellt werden (Abb. III-28A.). Die Verdopplungszeit der AX2 Zellen betrug unter den gegebenen Bedingungen 23h, die *Rescue* und GFP-MiroFI exprimierende Zelllinie wiesen Verdopplungszeiten bei 25 und 32 h auf. Dies konnte allerdings beim Wachstum auf *K. aerogenes* Rasen nicht beobachtet werden. Die *Rescue* und GFP-MiroFI exprimierenden Zellen wiesen ein signifikant kleineres Kolonienwachstum auf. (Abb. III-28B).

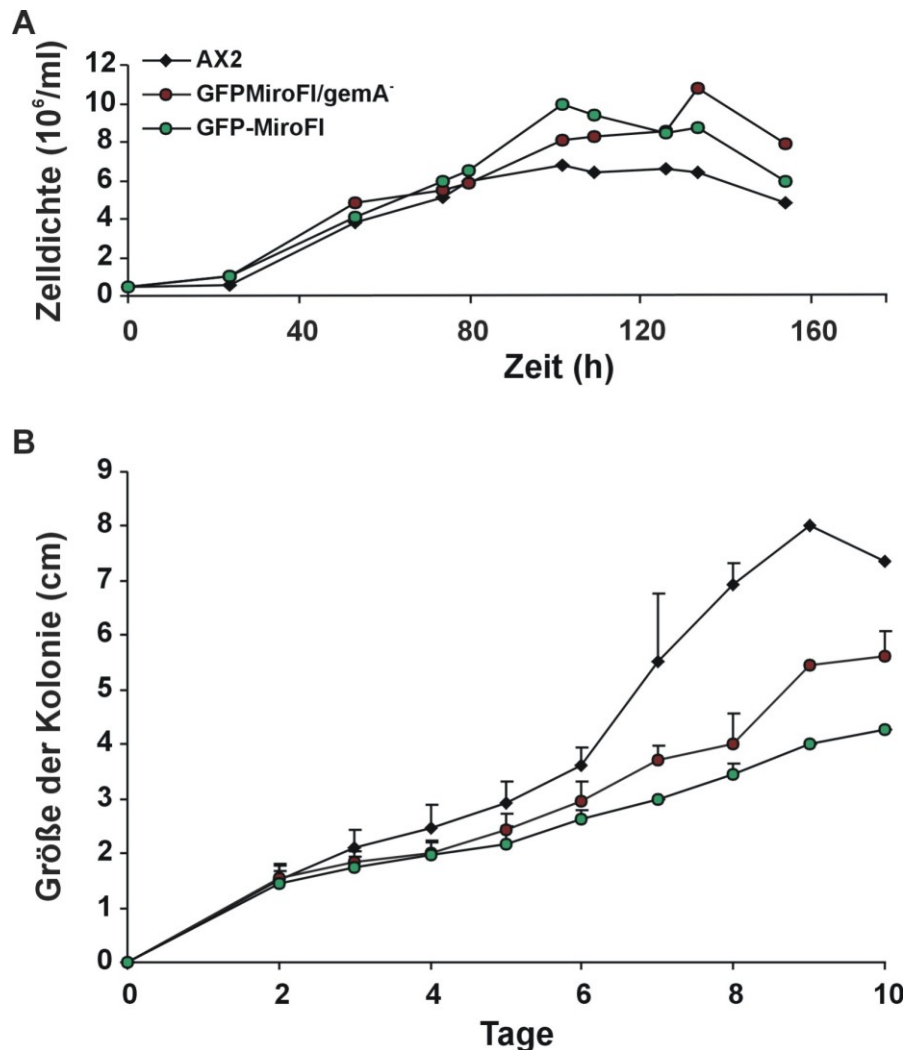


Abb. III-28: Wachstum von AX2, GFP-MiroFI exprimierende und *Rescue* Zellen in Schüttelkultur und auf *K. aerogenes* Rasen. A. Die Kulturen wurden mit einer Zellzahl von $0,25 \times 10^5$ Zellen/ml angeimpft und bei 21°C auf dem Schüttler bei 160 Upm inkubiert und zu den angegebenen Zeiten gezählt. Die *Rescue* Zellen und GFP-MiroFI exprimierenden Zellen weisen im Vergleich zu den AX2 Zellen eine ähnliche Wachstumsrate. In beiden Zelllinien ist ein kontinuierlicher Wachstumsanstieg beobachtet worden. **B.** 15 μ l Zellsuspension wurden in die Mitte einer mit *K. aerogenes* ausgetrichenen Platte pipettiert. Die wachsende Kolonie wurde nach 24 Stunden und an den darauffolgenden Tagen die gemessen. Sowohl die GFP-MiroFI exprimierenden Zellen auch die *Rescue* Zellen zeigten ähnlich große Kolonien, die mit den Wildtypzellen vergleichbar war. Gezeigt werden die Daten von drei unabhängigen Messreihen.

3.11.3 Zytokinese ist in *gemA* defizienten Zellen nicht beeinträchtigt

Die *gemA* defizienten *D. discoideum* Zellen haben in Schüttelkultur einen signifikanten Wachstumsdefekt gezeigt, der auf *K. aerogenes* Rasen allerdings geringer ausfällt. Um einen möglichen Defekt im Kernteilungsprozess zu untersuchen, wurden die in Schüttelkultur gewachsenen *gemA* Knockout Zellen sowie Wildtypzellen fixiert und die Kerne mit dem DNA-bindenden Färbemittel DAPI angefärbt und untersucht. Die Untersuchung am Fluoreszenzmikroskop der *gemA*-KO Kerne sowie die Quantifizierung anhand eines Histogramms zeigte, dass die Zellen, sowohl AX2 als auch *gemA* Null Zellen, hauptsächlich ein- bis zweikernig vorliegen (Abb. III-29).

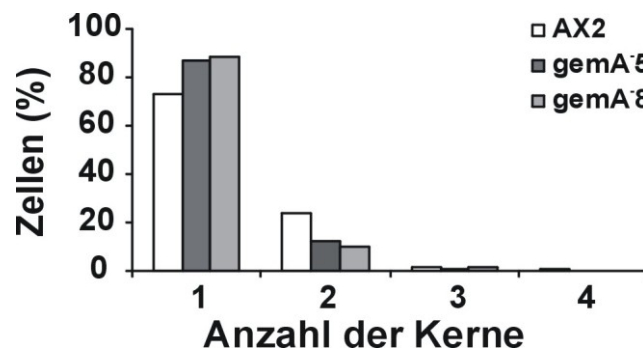


Abb. III-29: Zytokinese in AX2 und *gemA*-KO Zellen. Quantifizierung der Kernzahlverteilung von AX2 und *gemA* defizienten Zellen. Die Zellen sind in Schüttelkultur gewachsen, nach Absetzen auf dem Deckglas mit Methanol fixiert und die Kerne mit dem DNA-bindendem Färbemittel DAPI angefärbt worden. Für beide Stämme wurden 250-300 Zellen gezählt. Wildtyp AX2 und *gemA*-KO Zellen sind hauptsächlich ein- und zweikernig.

3.11.4 Phagozytose, Pinozytose und Exozytose von *gemA* Knockoutzellen

Auf *K. aerogenes* Rasen wurde ein verzögertes Wachstum von *gemA* defizienten Zellen beobachtet, das auf eine verminderte Phagozytosefähigkeit zurückzuführen sein könnte. Hier sollte untersucht werden, ob sich dieser Defekt auch in der Internalisierung fluoreszenzmarkierter Partikel zeigt. Daher wurde die Aufnahme fluoreszenzmarkierter Hefepartikel sowie die Aufnahme und Abgabe von FITC-markiertem Dextran in Schüttelkultur studiert. Es zeigte sich, dass *gemA* Knockoutzellen im Vergleich zu AX2 Zellen keine veränderte Aufnahme fluoreszierender Hefezellen aufweisen (Abb. III-30A). Ähnliche Resultate ergaben sich bei der Untersuchung der Aufnahme und Abgabe von FITC-markiertem

Dextran. Es konnten keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zu den Wildtypzellen festgestellt werden (Abb. III-30B und C).

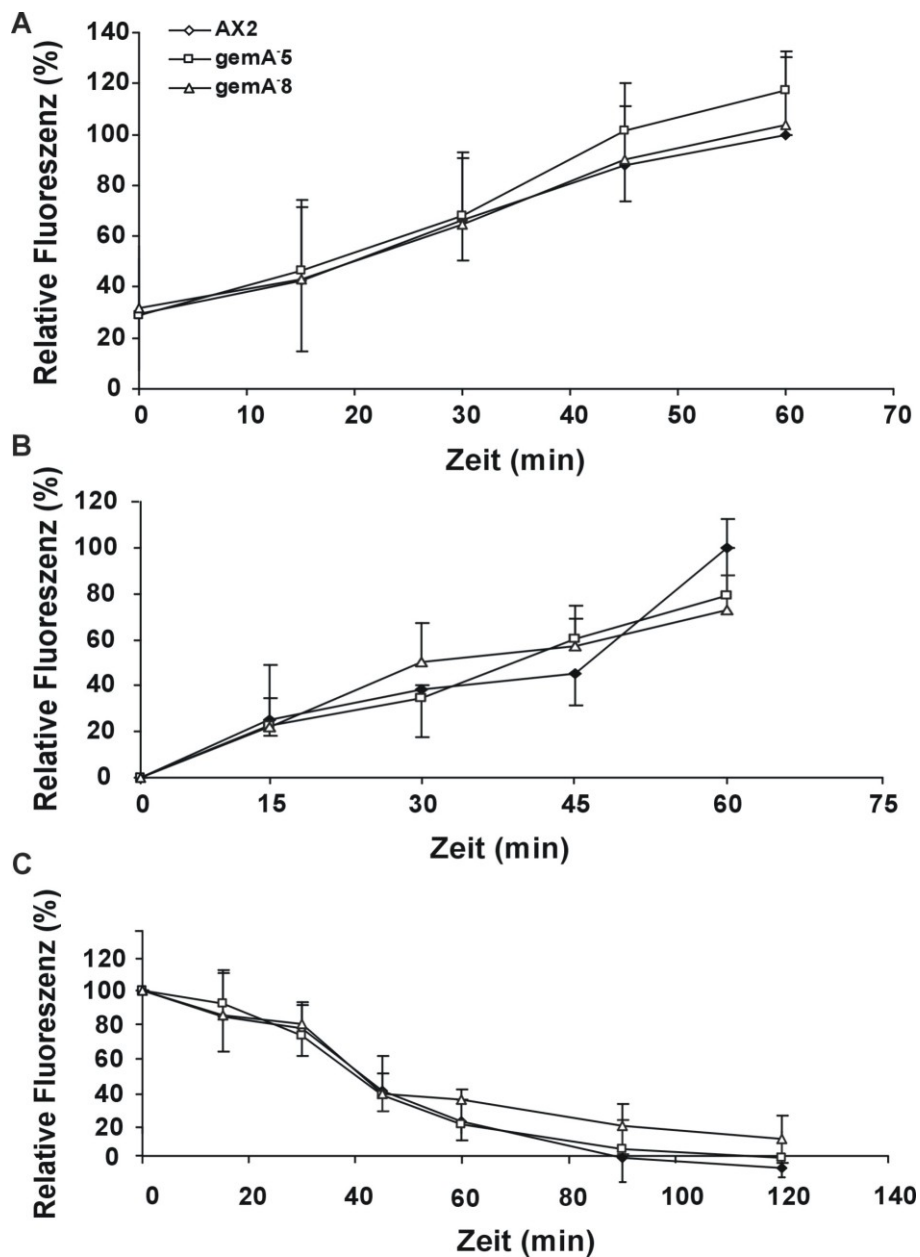


Abb. III-30: Phagozytose, Pinozytose und Exozytose von AX2 und *gemA*-KO Zellen. Zellen wurden bei einer Zelldichte von $\leq 5 \times 10^6$ aus einer Schüttelkultur entnommen, nach Zentrifugation in AX2-Medium resuspendiert und fluoreszierende Hefezellen oder FITC-markiertes Dextran zugesetzt. **A.** Phagozytose von TRITC-markierten Hefezellen. Die Aufnahme der Hefezellen erfolgte kontinuierlich bis 60 min. Dabei wurden keine wesentlichen Unterschiede in der Partikelaufnahme beobachtet **B.** Endozytose von FITC-markiertem Dextran. Beide *D. discoideum* Stämme endozytierten in kontinuierlichem Ablauf, die relative Fluoreszenzrate zeigt einen fast identisch verlaufenden Prozess an wie in der Phagozytose. **C.** Exozytose von FITC-markiertem Dextran. Die Abgabe des fluoreszierenden Dextrans zeigte keinen signifikanten Unterschied. Die Fluoreszenz wurde anhand des MD-5020, PTI Fluorimeters ermittelt. Die Daten wurden aus den Mittelwerten und Standardabweichungen von drei unabhängigen Experimenten ermittelt.

3.11.5 Phototaxis ist nicht beeinträchtigt in *gemA* defizienten Zellen

Es ist bekannt, dass mitochondriale Proteine u.a. im Prozess der Phototaxis involviert sind (Kotsifas *et al.* 2002). Die chemotaktische Aggregation hungernder *D. discoideum* Zellen führt zur Bildung eines motilen, multizellulären Organismus, dem sog. Slug, dessen anteriore Spitze sein phototaktisches sowie thermotaktisches Verhalten kontrolliert (Wilczynska *et al.* 1997). Daher wurde das Verhalten der Amöben bei Abwesenheit von *gemA* im Vergleich zu dem Wildtyp untersucht. Nach der Wanderung der Zellen und anschließender Behandlung zur Visualisierung des zurückgelegten Weges konnte gezeigt werden, dass alle Zelllinien in der Lage gewesen sind, sich in Richtung der Lichtquelle zu bewegen. Die Orientierung der Mutanten auf die Lichtquelle hin war ähnlich wie bei den AX2 Zellen (Abb. III-31).

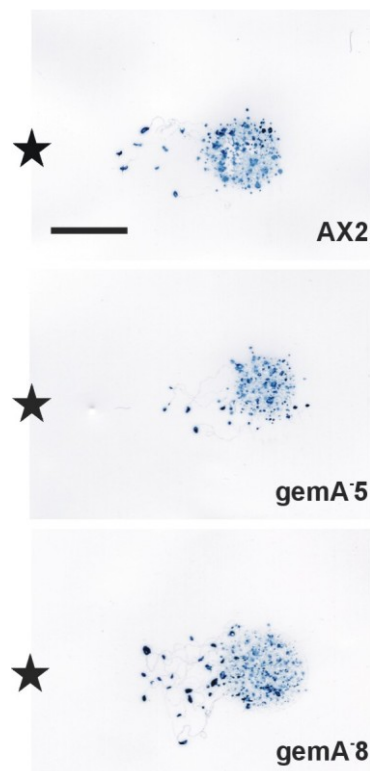


Abb. III-31: Phototaxis in *gemA*⁻ und AX2 Zellen. Wildtyp AX2 Zellen und die Mutanten wurden in der logarithmischen Phase des Wachstums aufgenommen und auf eine Zelldichte von 1×10^8 Zellen/ml resuspendiert. 10 μ l (1×10^6 Zellen) wurden im Zentrum einer Wasseragarplatte ausgebracht und zur leichten Trocknung hingestellt. Anschließend wurden die Platten in einer Box, die ein Lichtschlitz von 3 mm aufwies, bei 21°C für 48 h inkubiert. Die Slugs wurden auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und mit Amidoschwarz angefärbt. Dadurch konnte der Verlauf der Bewegung in Richtung der Lichtquelle studiert zurückverfolgt werden. Der Stern auf der linken Seite weist auf Lage der Lichtquelle hin. Maßstab, 1cm.

3.11.6 Zellmotilität und Chemotaxis von *gemA*-KO Mutanten

In vorherigen Studien wurde ein mitochondriales Protein identifiziert, das für eine effiziente Chemotaxis in *D. discoideum* notwendig ist (van Es *et al.* 2001). Veränderungen im Aktinzytoskelett können durch Chemoattraktanten wie cAMP induziert werden. Dies hat ein verändertes Zellverhalten bzw. eine veränderte Zellmigration zur Folge. Um die Rolle von Miro in diesem Prozess festzustellen, wurde das chemotaktische Verhalten in *gemA* defizienten Zellen untersucht. Hierbei wurde die Migration aggregationskompetenter Zellen in Richtung einer Mikropipette, gefüllt mit 0,1mM cAMP, beobachtet. Es wurden Aufnahmen in 30 Sekunden Intervallen von *gemA*⁻ Zellen aufgenommen, um anschließend die Migrationswege zu bestimmen und die Zellmotilitätsparameter zu berechnen. In Abwesenheit von cAMP wiesen die *gemA* Mutanten ein ähnliches Verhaltensmuster wie AX2 Zellen auf. Die Parameter Geschwindigkeit, Persistenz (Ausdauer), Direktionalität und Richtungswechsel waren hierbei für die zufälligen Bewegungen indikativ (Tab. 3.2). Der Vergleich des Bewegungsverhaltens der AX2 Zellen und der *gemA* Mutanten in Soerensenphosphatpuffer lieferten keine Hinweise auf eventuelle Unterschiede im Hinblick auf diese Parameter. Die Zellen wanderten ohne eine bestimmte Richtung anzustreben oder in Richtung einer anderen *D. discoideum* Zelle, die unter Aggregationsbedingungen ebenfalls befähigt sind cAMP zu sezernieren (Veltman und Van Haastert 2003), umher. In Anwesenheit von cAMP verhielten sich die Wildtypzellen und die Mutanten im Hinblick auf Persistenz und Direktionalität ähnlich. Die AX2 Zellen zeigten einen linearen Migrationsweg in Richtung der Mikropipette, während die *gemA* defizienten Zellen eine nicht signifikant geringere Geschwindigkeit aufwiesen. Beide *D. discoideum* Zelllinien polarisierten, bildeten Stränge und wanderten in Richtung der cAMP-Quelle (Abb. III-32).



Abb. III-32: Chemotaktische Migration von AX2 und *gemA*-KO Zellen in Richtung einer mit cAMP beladenen Mikropipette. Die Zellen wurden sechs Stunden nach Nahrungsentzug auf Deckgläser ausplattiert und wurden anschließend mit einer Mikropipette, gefüllt mit 0,1 mM cAMP, stimuliert. Bilder der wandernden Zellen wurden in 30 Sekunden Intervallen aufgenommen. Die Zellbewegungen wurden mit Hilfe des DIAS-Programms analysiert. Sowohl die AX2 Wildtypzellen als auch die *gemA* defizienten Zellen bewegen sich in Richtung der cAMP-Quelle (als * gekennzeichnet).

Puffer	AX2	<i>gemA</i> ⁵
Geschwindigkeit (µm/min)	5.74 ± 3.76	6.13 ± 3.49
Direktionalität (µm/min x deg)	0.43 ± 0.28	0.39 ± 0.35
Persistenz	1.77 ± 1.72	2.87 ± 1.78
Richtungswechsel (deg)	43.30 ± 19.90	39.68 ± 17.35
cAMP		
Geschwindigkeit (µm/min)	12.12 ± 3.26	9.82 ± 3.34
Direktionalität (µm/min x deg)	0.82 ± 0.11	0.69 ± 0.09
Persistenz	2.46 ± 1.38	2.56 ± 0.98
Richtungswechsel (deg)	19.78 ± 8.57	22.68 ± 8.08

Tab. 2: Analyse der Zellmotilität von AX2 und *gemA*-Knockout Zellen. Die Zellen wurden wie unter Abb. III-32 beschrieben behandelt. Die Tabelle gibt die Parameter wieder, die in Soerensenphosphatpuffer und mit cAMP ermittelt wurden. Aufnahmen in 30 Sekunden Intervallen wurden aufgenommen und anhand der DIAS Software, die die Migrationswege sowie Motilitätsparameter generiert, ausgewertet. Die Persistenz (Ausdauer) ist eine Abschätzung der Bewegungsnachhaltigkeit in Richtung des Weges auf die cAMP Quellen zu. Die Direktionalität ergibt sich aus der Netto-Wegeslänge dividiert durch die gesamte Wegeslänge und ergibt 1,0 für den geraden Weg. Der Richtungswechsel repräsentiert den durchschnittlichen Wechsel der Winkel in Richtung der Bewegung. Die angezeigten Werte setzen sich aus den Mittelwerten und den Standardabweichungen von 20-40 Zellen und drei bis vier unabhängiger Experimente zusammen.* p ≤ 0,001, Student t-Test.

3.11.7 Entwicklung unter Phosphatpufferbedingungen

Die Ausbildung von Aggregationssträngen während der Migration von Wildtypzellen und der *gemA* Mutanten wurde auf einer Plastikoberfläche unter einem Flüssigkeitsfilm untersucht. Vier Stunden nach Beginn des

Nahrungsentzugs konnten die typischen spiralförmigen Wellen in AX2 sowie in der *gemA* Mutante beobachtet werden. Dies ist ein weiterer Hinweis, dass die Sezernierung des cAMP in den *gemA* Mutanten nicht gestört ist. Auffällig schienen die dünneren und zuweilen unterbrochenen Aggregationsstränge der Mutanten im Gegensatz zu den Wildtypzellen. Allerdings konnte keine signifikant verzögerte Aggregationsbildung sowie Abnormalitäten in den Strängen beobachtet werden (Abb. III-33).

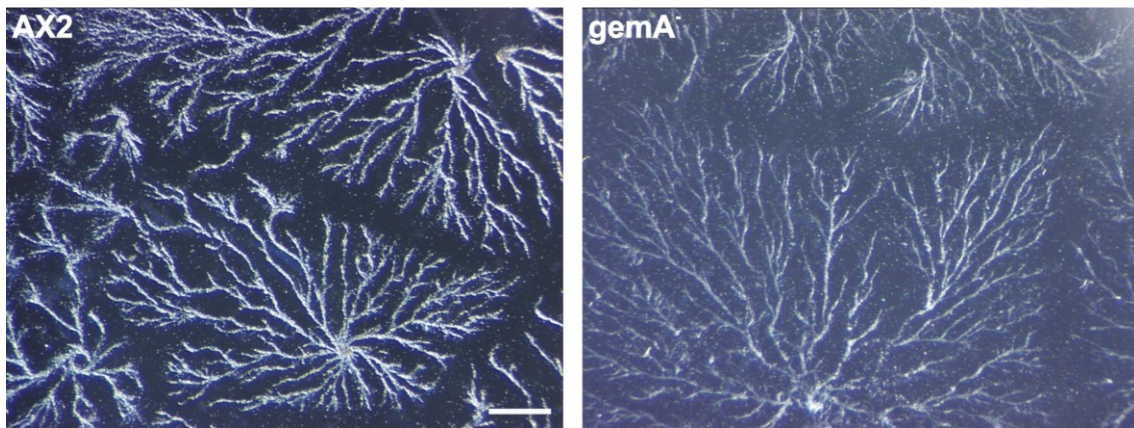


Abb. III-33: Aggregation auf einer Plastikoberfläche. AX2 und *gemA*⁻ Zellen wurden nach Nahrungsentzug mit einer Zelldichte von 2×10^5 Zellen/cm² unter Phosphatpufferbedingungen auf eine Plastikoberfläche überführt und die Aggregation durch Aufnahmen dokumentiert. Die Bilder wurden bei 2,5X Vergrößerung und in 15 Minutenintervallen aufgenommen. Maßstab, 1 cm.

3.11.8 Entwicklung auf Phosphatagarplatte

Bei Nahrungsmangel schließen sich die einzelligen Amöben zu einem vielzelligen Verband zusammen und bilden an einem langen Stiel einen Fruchtkörper aus, aus dem Sporen entlassen werden können (Coates und Harwood 2001). Um festzustellen, ob Miro eine Rolle in der *D. discoideum* Entwicklung spielt, wie es auch für andere mitochondriale Proteine gezeigt werden konnte (Torija *et al.* 2006), wurde die Entwicklung der *gemA* Mutante untersucht. Hierbei wurden *D. discoideum* Wildtyp- und *gemA* defiziente Zellen mit einer Zelldichte von 2×10^7 Zellen/ml aus Schüttelkultur entnommen, mit Soerensenphosphatpuffer gewaschen, anschließend auf Phosphatagarplatten überführt und für 24 Stunden bei 21 °C inkubiert. Die Entwicklung wurde anhand eines Stereomikroskops überwacht, Aufnahmen in 60 Minutenintervallen erfasst, um mögliche Veränderung der multizellulären Strukturen oder Verzögerungen in der Entwicklung zu dokumentieren. Bei Nahrungsmangel bildeten die Wildtypzellen

nach acht Stunden Aggregate aus, gefolgt von einer fingerähnlichen Struktur nach 14 Stunden, die sich bei 18 Stunden als *Slug* fortbewegen. Die Kulminierung erfolgte nach 20 Stunden, im Anschluss wurden nach 24 Stunden Nahrungsmangel reife Fruchtkörper, die einen Stiel mit Sporen enthalten, ausgebildet. (Chisholm und Firtel 2004). Bei dem *gemA* defizienten Stamm waren nach 18 Stunden abgerundete Strukturen sowie einige wenige mit einem auswachsenden Apex zu beobachten. Nach 23 Stunden hatten beide *D. discoideum* Stämme die mit- und spätkulminante Phase erreicht, die wenig später den Entwicklungszyklus der Zellen beschließt. Nach Abschluss des Entwicklungszyklus (24 h), wiesen weder die AX2 noch die *gemA*⁻ Zellen Unterschiede in ihrer Form oder Größe auf. Beide zeigten voll entwickelte Fruchtkörper mit Stielen und Sporenköpfen (Abb. III-34)

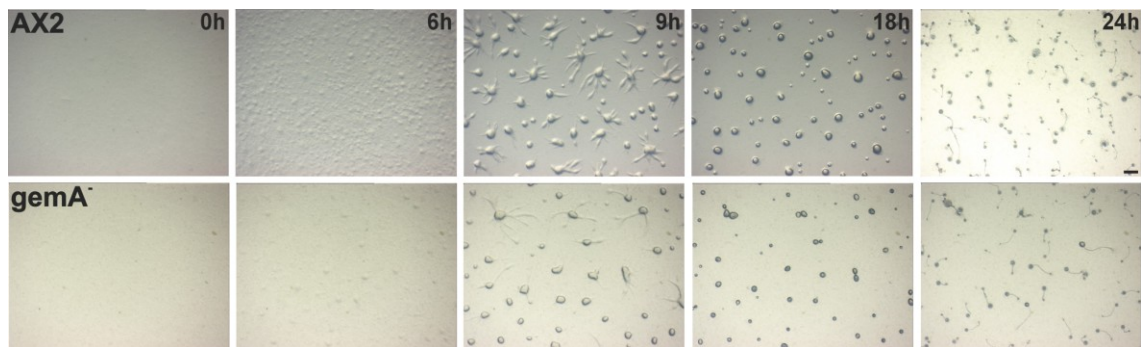


Abb. III-34: Entwicklung auf Phosphatagarplatte. Nach Zentrifugation und Resuspension von AX2 und *gemA* Null Zellen in Soerensenpuffer wurden die Zellen mit einer Zelldichte von 5×10^6 Zellen/cm² auf Phosphatagarplatten ausgestrichen und bei 21 °C inkubiert. Mit einem Stereomikroskop wurden zu verschiedenen Zeitpunkten Bilder, der sich entwickelnden multizellulären Strukturen aufgenommen und miteinander verglichen. Maßstab, 1mm.

Ebenfalls wurden verschiedene Entwicklungsmarker zur Untersuchung der morphologischen Veränderungen in den unterschiedlichen Entwicklungsstadien verwendet. Verglichen mit den AX2 Wildtypzellen, wurde das aggregations-spezifische Zelladhäsionsprotein Csa in *gemA* defizienten Zellen mit einer Verzögerung von drei Stunden exprimiert (Abb. III-35), während das Präsporzellenprotein *pspA*, das durch den Mud1 Antikörper erkannt wird, keine Veränderungen im Expressionsmuster aufwies (nicht gezeigt). Die Verzögerung der *gemA*⁻ Zellen lässt aber nicht auf einen signifikanten Defekt in der Entwicklung schließen.

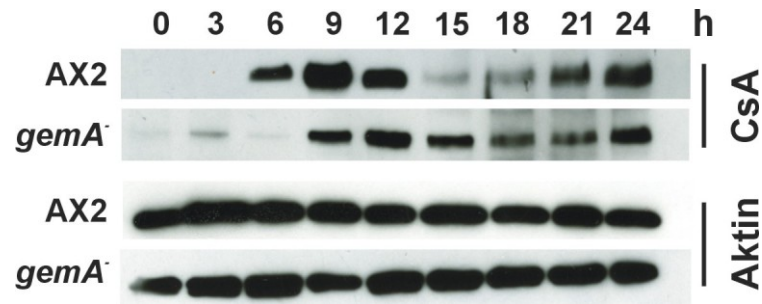


Abb. III-35: Expressionsmuster von verschiedenen Entwicklungsmarkern. Zelllysate von AX2 und *gemA⁻* Zellen (4×10^5 Zellen/10 μ l) wurden auf ein 10% Polyacrylamidgel geladen, auf Nitrozellulosemembran transferiert und anschließend mit dem csA spezifischen, monoklonalen Antikörper immunmarkiert. Als Ladekontrolle diente Aktin.

3.11.9 Aktinverteilung in *gemA* defizienten Zellen

Des Weiteren sollte untersucht werden, ob eine *gemA* Defizienz zu einer veränderten Verteilung von Aktin in der Zelle führt. Um das Verteilungsmuster zu dokumentieren, wurden AX2 Wildtypzellen und *gemA* Mutanten mit Methanol fixiert und mit Hilfe des monoklonalen anti-Aktin 1-7 Antikörpers immunmarkiert. Die Aufnahmen erfolgten am konfokalen Laser Scan Mikroskop. In beiden Stämmen konnte eine Anreicherung von Aktin an der Plasmamembran und ebenfalls eine starke Aktinverteilung an den Filopodien beobachtet werden. Es konnte demnach keine abnorme Verteilung im Aktinmuster festgestellt werden (Abb. III-36).

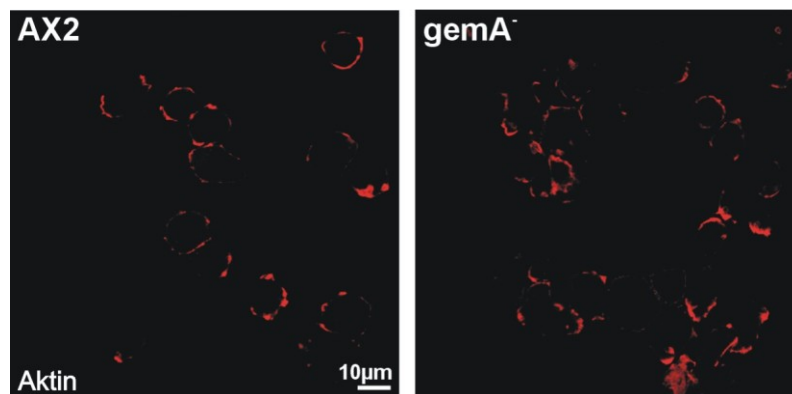


Abb. III-36: Aktinverteilung in AX2 und *gemA⁻* Zellen. Die Zellen wurden nach dem Absetzen auf einem Deckglas mit Methanol fixiert und mit dem monoklonalen anti-Akt 1-7 Antikörper immunmarkiert. Mit Hilfe des Laser Scan Mikroskops wurde die Anreicherung von Aktin in den Zellen dokumentiert. Die Aufnahmen der AX2 und *gemA⁻* Zellen zeigen Ähnlichkeiten in der Verteilung des Aktins und der Filopodienstruktur. Maßstab, 10 μ m.

3.12 Mitochondrienspezifische Experimente

3.12.1 Größe und Morphologie der Zellen sowie Mitochondrien sind in *gemA* defizienten Zellen nicht beeinträchtigt

In humanen Zellen führt die Überexpression der beiden Miro Isoformen zu einer Zusammenlagerung der Mitochondrien sowie tubulärer und fadenförmiger Strukturen (Fransson *et al.* 2006). Eine Deletion des *S. cerevisiae* Homologes Gem1p führt zu eingefallenen, globulären oder traubenförmigen Mitochondrien (Frederick *et al.* 2004). Daher sollte untersucht werden, ob eine *gemA* Defizienz in einer Veränderung in der Größe und Morphologie von *D. discoideum* Zellen sowie Mitochondrien im Vergleich zu AX2 Wildtypzellen resultiert. Die Mitochondrien in beiden Zelllinien wurden mit MitoTracker Red visualisiert und die Größen der Zellen und Mitochondrien mit Hilfe des Programms ImageJ berechnet. In beiden Stämmen konnten keine signifikanten Unterschiede in der Größe (Abb. III-37) und in der Morphologie der Zellen sowie Mitochondrien festgestellt werden. Die Zellgrößen der beiden *D. discoideum* Stämme lagen bei ca. 7-10 μm und die Größe der Mitochondrien bei ca. 3-4 μm .

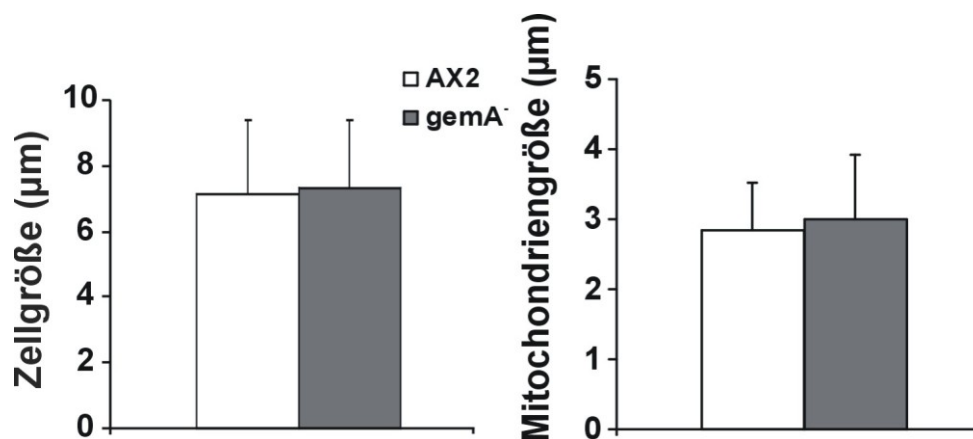


Abb. III-37: Ermittlung der Größe von in AX2 und *gemA*⁻ Zellen. *D. discoideum* Zellen wurden auf Deckgläser überführt, mit 500 nM MitoTracker Red für 30 Minuten inkubiert und anschließend mit Paraformaldehyd/Pikrinsäure fixiert. Mit Hilfe des Programms ImageJ wurden die Größen der Zellen und Mitochondrien ermittelt. Dabei konnte keine Veränderung in der Größe und Morphologie der Zellen sowie Mitochondrien festgestellt werden. Angegeben sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen aus zwei unabhängigen Messreihen mit n=30-40 Zellen.

3.12.2 Die mitochondriale Masse ist deutlich geringer in *gemA* Nullzellen

Ein weiterer Aspekt mitochondrienspezifischer Untersuchungen ist die Bestimmung der mitochondrialen Masse. Hierbei wurde der Mitochondrienmarker

MitoTracker Green verwendet, der unabhängig vom Membranpotential der Mitochondrien aufgenommen wird und zur Abschätzung des mitochondrialen Zellinhaltes verwendet wird (Pendergrass *et al.* 2004). Die Fluoreszenzmessungen am Fluorimeter ergaben, dass ein signifikanter Unterschied in der mitochondrialen Masse von *gemA* defizienten Zellen im Vergleich zu den Wildtypzellen besteht. Die Mutante wies eine bis zu 30% geringere mitochondriale Masse auf (Abb. III-38).

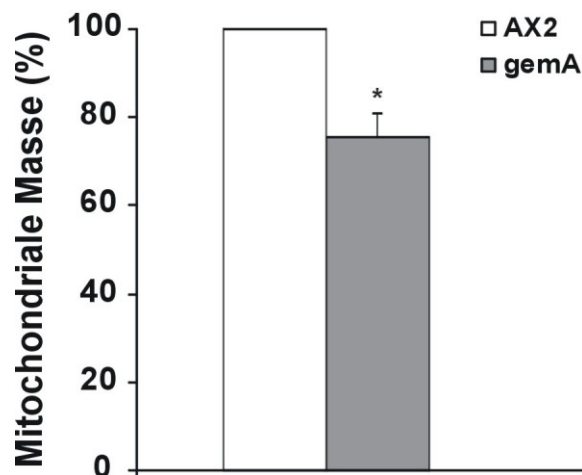


Abb. III-38: Bestimmung der mitochondrialen Masse in AX2 und *gemA*⁻ Zellen. Axenisch gewachsene *D. discoideum* Zellen mit einer Zelldichte von 1×10^7 wurden in Lo-Flo Medium, das zur Vermeidung von Fluoreszenzhintergrund verwendet wird, aufgenommen, einmal in Lo-Flo Medium gewaschen und zwei Stunden darin inkubiert. Für eine weitere Stunde wurden die Zellen 45 min mit 200 nM MitoTracker Green im Dunkeln inkubiert. Als Kontrolle wurde DMSO verwendet. Um ungebundenes MitoTracker Green zu entfernen, wurden die Zellen dreimal gewaschen und die Fluoreszenzen der Zellen am Fluorimeter (MD-5020, PTI) ermittelt (Anregung 490 nm/Emission 516 nm). Angegeben sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen aus fünf unabhängigen Messreihen.* $p \leq 0,001$, Student *t*Test.

3.12.3 Die ATP Konzentration ist in *gemA*⁻ defizienten Zellen signifikant erniedrigt

Mitochondrien konvertieren Energie von Nährstoffmolekülen zu ATP, das anschließend zellulären Reaktionen zugeführt wird. Säugerzellen reagieren auf beeinträchtigte zelluläre Energetik wie z.B. geringerer Nährstoffzufuhr oder erhöhter Energieleistung in verschiedener Art und Weise. Der am besten untersuchte Mechanismus verläuft über die AMP-aktivierte Proteinkinase (AMPK), die den metabolischen Status der Zelle durch Aktivierung katabolischer Prozesse und der Herunterregulierung ATP-abhängiger anabolischer Wege kontrolliert (Hardie und Carling 1997, Young *et al.* 2005), während in *D. discoideum* diverse

zytopathologische Defekte durch chronische AMPK Signalwirkung verursacht werden nicht aber durch zu wenig ATP (Bokko *et al.* 2007).

Zur Bestimmung der ATP-Konzentrationen wurde das ATP Assay ENLITEN Kit verwendet, das auf rekombinanter Luciferase basiert. Die Ermittlung der ATP-Konzentrationen ergab, dass im Vergleich zu den AX2 Wildtypzellen, die ATP Menge in der *gemA* Mutante erheblich geringer ausfiel (Abb. III-39).

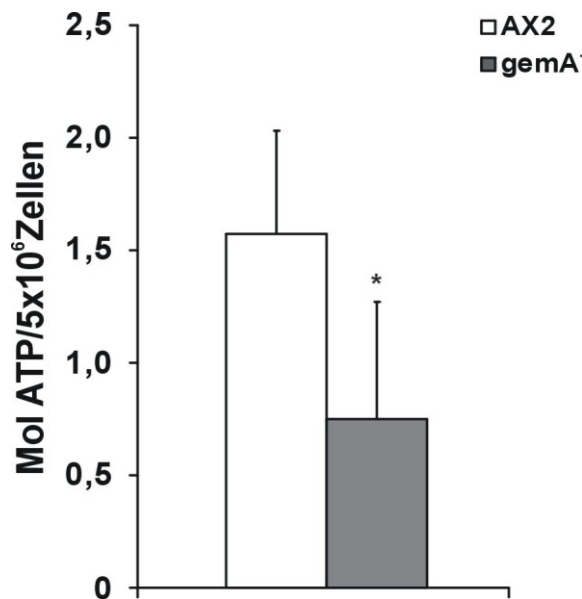


Abb. III-39: ATP Bestimmung in *gemA* defizienten Zellen. Mit Hilfe des Luciferase-basierenden ATP Kits (ENLITEN, Promega) wurde in axenisch gewachsenen Zellen, die ATP Mengen von AX2 Wildtyp Zellen und *gemA* Zellen bestimmt. Nach Waschen mit H₂O, Inkubation bei Raumtemperatur und anschließender Zentrifugation (5 Minuten bei 4000 Upm), wurden die Zellen auf eine 96-well Platte überführt und am Luminometer (Multiskan Ascent) gemessen. Mittels eines ATP-Standards (1x10⁻⁷ bis 1x10⁻¹¹ M) wurden die ATP-Konzentrationen im Überstand ermittelt. Angegeben sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen aus zwei Messreihen mit jeweils n=20-30 Zellproben.* p ≤ 0,001, Student t-Test.

3.12.4 Der Sauerstoffverbrauch ist signifikant erhöht in *gemA* Mutanten

Ein interessanter Aspekt in der Untersuchung der Mutante war die Bestimmung des Sauerstoffverbrauchs. In einer *D. discoideum* Mutante wurden Ereignisse festgestellt, die charakteristisch für den nekrotischen Zelltod sind. Dies ging u.a. mit einem erhöhten Sauerstoffverbrauch einher und führte zu einer perinukleären Zusammenlagerung dilatierter Mitochondrien (Laporte *et al.* 2007). Anhand einer Clark-Typ Sauerstoffelektrode konnte der Sauerstoffverbrauch der Wildtypzellen sowie der *gemA* Nullzellen gemessen und anschließend in einer quantitativen Analyse bestimmt werden. Dabei wurde ein bis zu 40% höherer

Sauerstoffverbrauch in der *gemA* Mutante im Vergleich zur Wildtypzelllinie festgestellt (Abb. III-40).

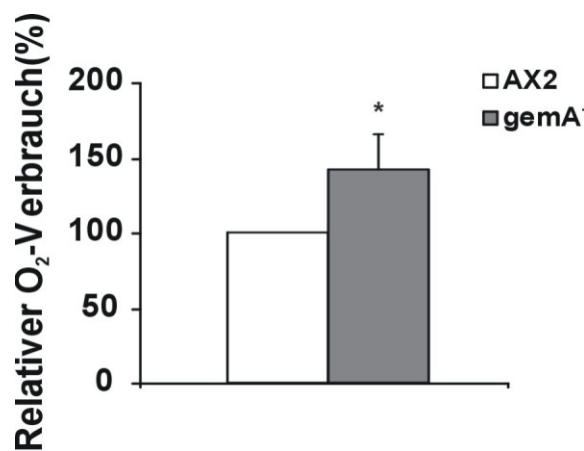


Abb. III-40: Sauerstoffverbrauch von AX2 und *gemA*⁻ Zellen. Der Sauerstoffverbrauch der Zellen wurde polarographisch mit Hilfe einer Clark-Typ Sauerstoffelektrode gemessen. 5×10^6 Zellen wurden nach Waschen und Resuspension in PDF Puffer, in eine Atmungskammer bei 21 °C überführt. Der Sauerstoffverbrauch wurde, über eine Dauer von 5-10 min nach Äquilibration der Elektrode, gemessen. Angegeben sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen aus sechs unabhängigen Messreihen * $p \leq 0,001$, Student tTest.

3.12.5 Der Glukoseverbrauch von *gemA* Mutanten ist signifikant geringer

Das Monosaccharid Glukose stellt für Pflanzen und Tiere eine wichtige Energiequelle für die ATP-Synthese dar und besitzt wichtige Signalfunktionen. Glukose wird über die Glykolyse, die oxidative Decarboxylierung, den Zitratzyklus und die Atmungskette vollständig zu Wasser und Kohlenstoffdioxid abgebaut. Falls Sauerstoff nur in geringen Mengen vorhanden ist, erfolgt der Glukoseabbau anaerob durch die Milchsäuregärung zu Laktat wobei weniger Energie freigesetzt wird. Daher sollte der Glukose -und Laktatverbrauch in *gemA* Knockout Zellen untersucht werden. Dabei wurden die Zellen in Schüttelkultur mit einer Startzelldichte von 3×10^6 Zellen/ml in axenischem Medium, dem Glukose statt Maltose zugesetzt wurde, kultiviert. In 24 Stunden Intervallen und über drei weitere Tage (0-72 Stunden) wurden die Zelldichten gezählt und 1ml Kultur entnommen, abzentrifugiert und die Überstände gesammelt. Anhand eines ABL165 Radiometers, das u.a zur Messung von Elektrolyten im Blut verwendet wird, wurden die Glukosemengen im Überstand gemessen und ausgewertet. Die quantitative Bestimmung, bei der die Zelldichten der beiden Zelllinien und die Glukosekonzentrationen in der Analyse mit berücksichtigt wurden, ergaben einen deutlich erhöhten Verbrauch von Glukose in *gemA* defizienten Zellen (Abb. III-41).

Ein Laktatverbrauch war nicht messbar und konnte daher für weitere Analysen nicht verwendet werden.

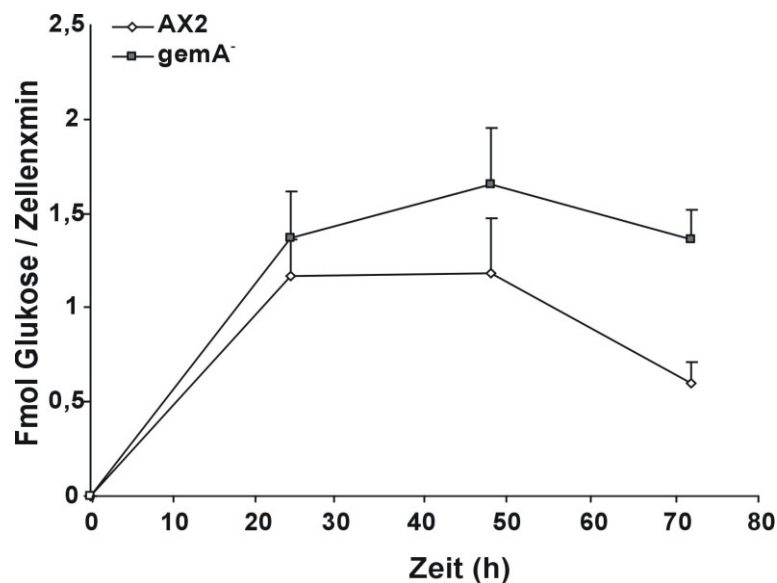


Abb. III-41: Glukoseverbrauch von AX2 und *gemA*⁻ Zellen. Die Kulturen wurden mit einer Zellzahl von 3×10^6 Zellen/ml angeimpft und bei 21 °C auf dem Schüttler bei 160 Upm inkubiert und zu den angegebenen Zeiten gezählt, 1ml Kultur entnommen, abzentrifugiert und die Überstände gesammelt. Die Glukosekonzentrationen der Zellen wurden mit Hilfe des ABL165 Radiometers gemessen. Die Mengen an Glukose sowie die Zellzahlen wurden in der anschließenden Analyse kalkuliert. Angegeben sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen aus zwei unabhängigen Messreihen * $p \leq 0,001$, Student tTest.

3.12.6 Das mitochondriale Transmembranpotential ist in *gemA* Mutanten nicht verändert

Es ist bekannt, dass der Verlust des mitochondrialen, elektrochemischen Potentialgradienten ($\Delta\psi$) ein frühes Ereignis der Apoptose ist. Anhand des kationischen und lipophilen Farbstoffs JC-1 sollte *in vivo* innerhalb der *D. discoideum* Mutante festgestellt werden, ob Veränderungen im mitochondrialen elektrochemischen Potentialgradienten zu detektieren sind (Cossarizza *et al.* 1993). In normalen Zellen konzentriert sich der JC-1 Farbstoff in der mitochondrialen Matrix, wo es rot fluoreszierende Aggregate bildet. Ereignisse wie beispielsweise die Apoptose, die zum Verlust des mitochondrialen Membranpotentials führen können, verhindern die Akkumulation des JC-1 Farbstoffs in den Mitochondrien. Dies führt zu einer Verteilung des Farbstoffs in der ganzen Zelle und zu einer Verschiebung von roter Fluoreszenz (JC-1 Aggregate) zu grüner Fluoreszenz (JC-1 Monomere). Anhand von fluorimetrischen Analysen und anschließender Berechnung der Ratio (590 nm/520 nm), die in

beiden Zelllinien bei ca. 80% lag, konnte kein Unterschied des Mitochondrien-transmembranpotentials der *gemA*⁻ Zellen im Vergleich zu den AX2 Zellen festgestellt werden (Abb. III-42).

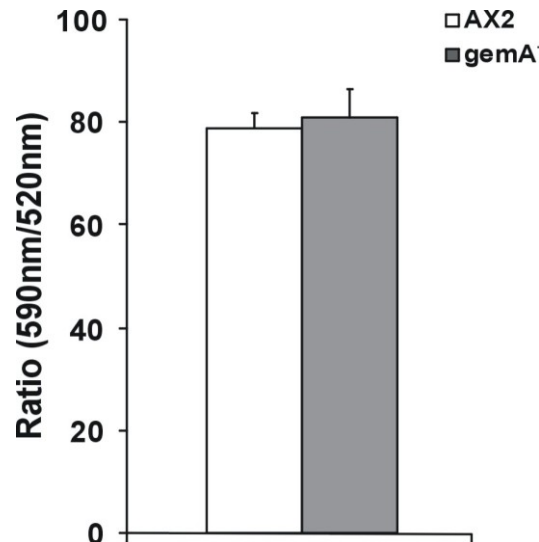


Abb. III-42: Messung des Transmembranpotentials in AX2 und *gemA*⁻ Zellen. Mittels des *Mitochondria Staining Kits* (Sigma) wurden die Messungen an der Fluoroskan Apparatur durchgeführt. JC-1 wurde zur Messung des Membranpotentials verwendet. *D. discoideum* Zellen mit einer Dichte von 2×10^6 wurden mit der zuvor hergestellten JC-1 Färbelösung (200 nM) für 30 Minuten bei 21 °C im Dunkeln inkubiert. Nach anschließendem zweimaligen Waschen mit dem zum Kit dazugehörigen JC-1 Puffer, wurden die Zellen (2×10^4) auf eine 96-well Platte überführt und die Fluoreszenz von Zellen gemessen (Fluoroskan Ascent FL). Für die Ermittlung der JC-1 Aggregate (rote Fluoreszenz) wurde bei 520 nm und für die JC-1 Monomere (grüne Fluoreszenz) bei 590 nm gemessen, nach Anregung bei 488 nm. Angegeben sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen aus zwei Messreihen mit jeweils $n=20-30$ Zellproben.

3.12.7 Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) Produktion

Mitochondrien sind stark in der Produktion der reaktiven Sauerstoffspezies durch die Elektronentransporter der Atmungskette involviert. Ebenfalls sind die mitochondrialen Strukturen sehr empfänglich für den oxidativen Stress, der beispielsweise zu Lipidperoxidation, Proteinoxidation sowie zu Mutationen der mitochondrialen DNA (mtDNA) führen kann (Lenaz *et al.* 2002). Daher sollte die zelluläre ROS Produktion anhand von DCFH-DA (Dichlorofluorescein-Diacetat) Färbung festgestellt werden. Hierfür wurden Wildtyp AX2 Zellen sowie *gemA* defiziente Zellen mit DCFH-DA angefärbt und für 45 Minuten im Dunkeln inkubiert. Nach anschließendem Waschen wurde die Fluoreszenz mit Hilfe der Fluoroskan Apparatur bestimmt. Die Auswertung der relativen Fluoreszenz in AX2 Wildtypzellen und *gemA* defizienten Zellen ergab keine signifikant unterschiedliche Bildung der Reaktiven Sauerstoffspezies (Abb. III-43)

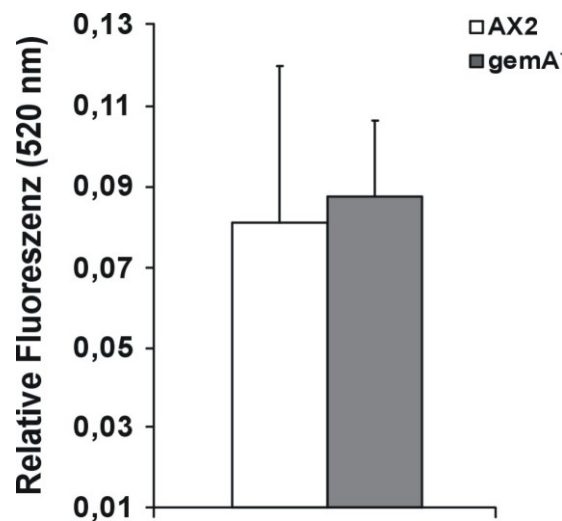


Abb. III-43: Bildung von reaktiver Sauerstoffspezies in AX2 und *gemA*⁻ Zellen. *D. discoideum* Zellen (5×10^6) wurden mit Lo-Flo Medium gewaschen und zwei Stunden darin inkubiert. Für 45 min wurden die Zellen mit 100 nM DCFH-DA im Dunkeln inkubiert. Das deacetylierte DCFH wird dabei bevorzugt durch H_2O_2 und Hyperoxid zum fluoreszierenden Dichlorofluorescein (DCF) oxidiert. Nach dreimaligem Waschen, wurden die Zellen auf eine 96-well Platte überführt und die Fluoreszenz am Fluoroskan Ascent FL bei 525 nm gemessen (Anregung 490 nm). Als Kontrolle wurde DMSO verwendet. Angegeben sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen aus zwei Messreihen mit jeweils $n=20-30$ Zellproben.

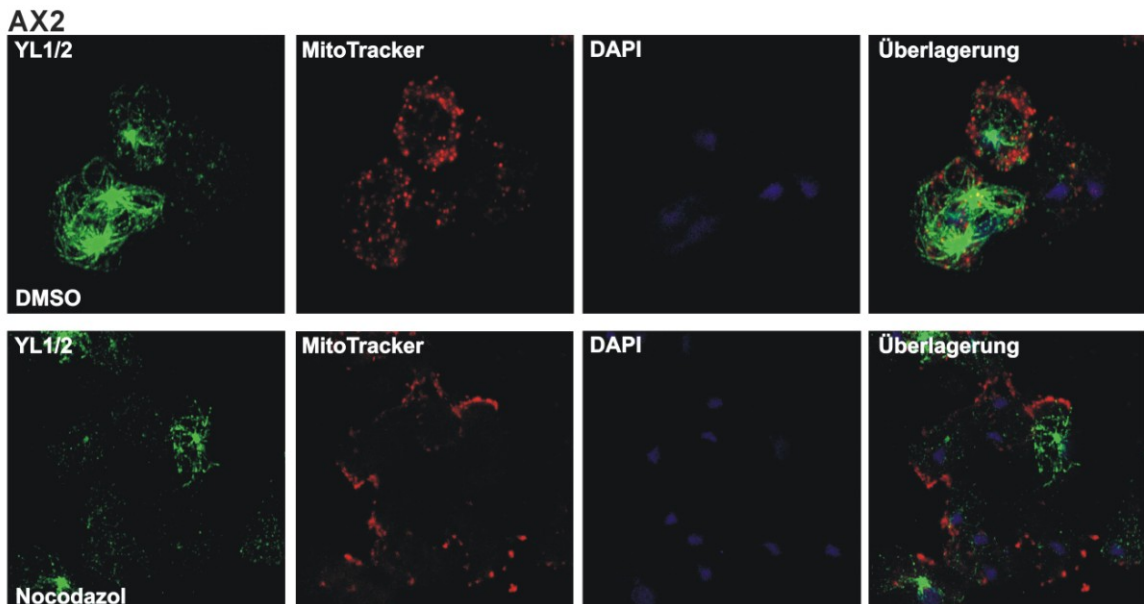
3.13 Rolle des Miro in der mitochondrialen Dynamik

3.13.1 Mitochondrienverteilung in *gemA* defizienten Zellen nach Nocodazolbehandlung

Anhand von indirekten Immunfluoreszenzstudien wurde untersucht, ob eine Behandlung der Zellen mit Nocodazol, einem Inhibitor, der zur Depolymerisierung der Mikrotubuli führt, eine veränderte Verteilung der Mitochondrien zur Folge hat. Es wurde postuliert, dass die Behandlung von *D. discoideum* Wildtypzellen mit Nocodazol erwartungsgemäß zu einem degradierten Mikrotubulinetzwerk führt. Die Mitochondrien bleiben allerdings weiterhin verstreut im Zytoplasma und somit unverändert in ihrer Verteilung. Es wird aber nicht ausgeschlossen, dass die Mikrotubuli eine Rolle im Transport der Mitochondrien spielen (Fields *et al.* 2002). Der Versuch wurde unter ähnlichen Bedingungen durchgeführt, wobei verschiedene Konzentrationen an Nocodazol (10 μ g/ml und 30 μ g/ml) verwendet wurden. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten (ein bis drei Stunden) nach der Nocodazolbehandlung wurden Zellen aus der Schüttelkultur entnommen und fixiert. Die Mikrotubuli wurden mit Hilfe des monoklonalen Tubulin YL1/2 Antikörper visualisiert. In den AX2 Wildtypzellen sowie in der *gemA* Mutante

konnte kein Unterschied in der Verteilung der Mitochondrien festgestellt werden. Die Immunfärbung mit dem Tubulinantikörper zeigte zahlreiche bogenförmige Mikrotubuli, die sich aus dem mikrotubuliorganisierendem Zentrum (*engl.* MTOC) zur Zellperipherie erstrecken (Abb. III-44A und B). Die Behandlung von AX2 Wildtypzellen und der *gemA* Mutante mit dem Inhibitor, resultierte in einem größtenteils degradierten Mikrotubulnetzwerk, wobei punktartige Strukturen sowie ein sternförmiges Gebilde, das dem MTOC entspricht, beobachtet wurden. In beiden Stämmen, sammelten sich die Mitochondrien an der Zellperipherie und erschienen verklumpt (Abb. III-44 A und B).

A



B

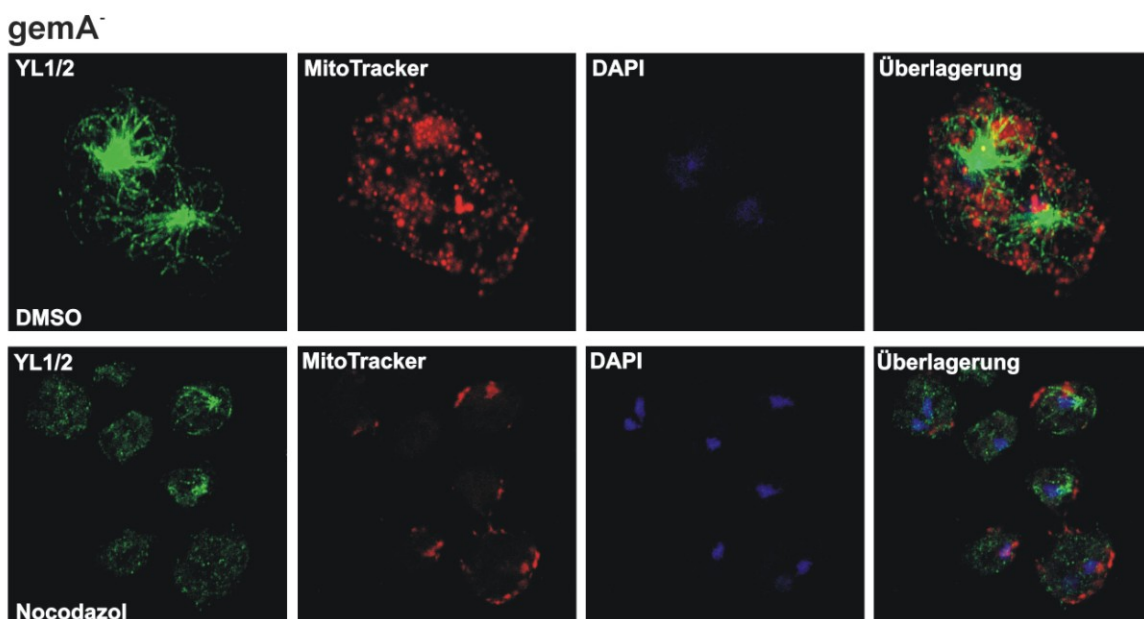


Abb. III-44: AX2 und *gemA* defiziente Zellen vor und nach Behandlung mit Nocodazol (vorherige Seite). Die Zellen wurden mit dem mitochondrialen Farbstoff MitoTracker Red angefärbt und mit Paraformaldehyd/Pikrinsäure fixiert. Anschließend erfolgte eine Immunmarkierung mit dem YL1/2 Tubulinantikörper, DAPI wurde zur Visualisierung der Kerne verwendet. Aufnahmen wurden anhand des konfokalen Laser Scan Mikroskops durchgeführt. **A.** In AX2 Zellen wurde nach Nocodazolbehandlung eine Degradierung der Mikrotubuli und eine Verklumpung der Mitochondrien an der Zellperipherie beobachtet. **B** In *gemA* defizienten Zellen zeigte sich eine ähnliche Verteilung der Mitochondrien wie in den AX2 Zellen. Maßstab, 10µm.

3.13.2 Lokalisation der Mitochondrien an den Mikrotubuli

In Säugern sowie in *D. discoideum* erfolgt der Transport der Mitochondrien entlang der Mikrotubuli (Rapp *et al.* 1996, Wiemer *et al.* 1997), während in Hefen dies ausschließlich an den Aktinfilamenten stattfindet (Hoepfner *et al.* 2001). Um eine mögliche Rolle für Miro in diesem Prozess zu untersuchen, wurde ein Stamm generiert, der sowohl RFP-Tubulin (Rotfluoreszierendes Protein mit β -Tubulin fusioniert) als auch GFP-TM exprimiert. Mit Hilfe dieses Fusionsproteins sollte die Position des Proteins und der Mikrotubuli vor und nach Behandlung mit Nocodazol visualisiert und ursprünglich zur *in vivo* Untersuchung verwendet werden. Allerdings stellte sich heraus, dass die RFP Fluoreszenz zu schwach war, um verwertbare Resultate *in vivo* zu erhalten. Daher wurde die Lokalisations anhand von konfokaler Mikroskopie in fixierten Zellen untersucht. Die Zellbilder zeigen die Lokalisation des Miros, das an der äußeren Mitochondrienmembran vorliegt. Des Weiteren ist das Protein in der Nähe der Mikrotubuli lokalisiert und unterstützt die Hypothese, dass die Mitochondrien mit dem Mikrotubulinetzwerk assoziiert sind (Abb. III-45). Eine Behandlung mit Nocodazol zeigte ein interessantes Resultat; und zwar sammeln sich die Mitochondrien an der Zellperipherie wie schon vorher in (Abb. III-44) beobachtet, aber Miro bleibt offensichtlich mit den Mikrotubuli verbunden. Allerdings ist dies eine Beobachtung, die durch weitere Studien bekräftigt werden muss.

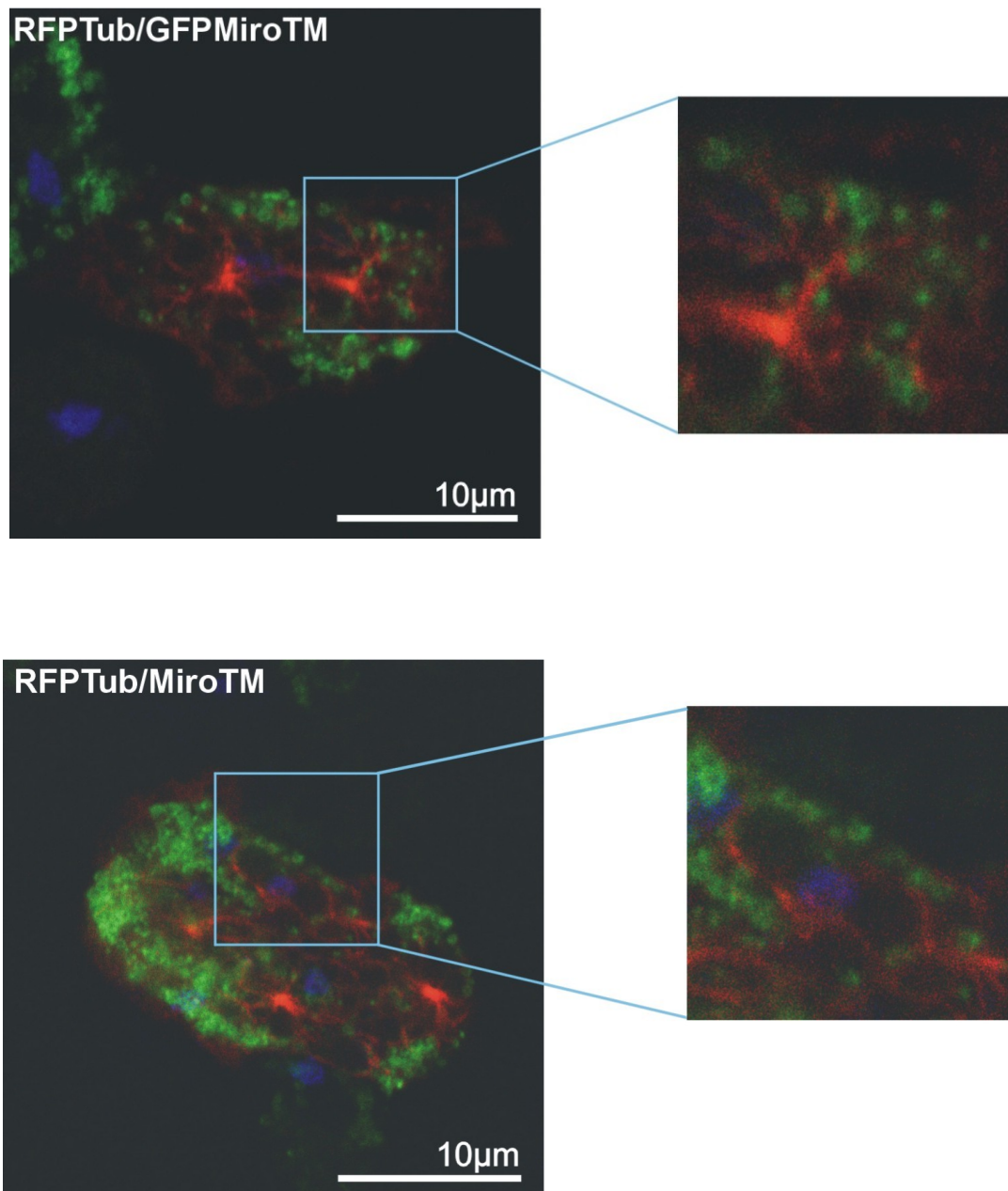


Abb. III-45: Lokalisation der Mitochondrien an den Mikrotubuli. RFP-Tubulin wurde in GFP-MiroTM exprimierende *D. discoideum* Zellen transformiert, um eine gleichzeitige Visualisierung der Mikrotubuli sowie des Proteins zu ermöglichen. Die Zellen wurden mit Methanol fixiert und mit DAPI angefärbt. In beiden Abbildungen ist das GFP-Miro exprimierende Fusionsprotein deutlich an den Mikrotubuli zu erkennen. Maßstab, 10 μ m.

IV Diskussion

A. Die Effekte des YopE

In dieser Arbeit wurde ein durch Tetrazyklin kontrolliertes Vektorsystem erfolgreich für eine *de novo* Expression von *Yersinia* Virulenz-assoziierten Yop Effektorproteinen und seinen GFP-Fusionsderivaten in *D. discoideum* durchgeführt. Die Resultate in Bezug auf die Expression der *Yersinia* YopH, GFP-YopH, GFP-YopJ und GFP-YopM Fusionsproteinen zeigen, dass sie keinen Einfluss auf den Lebenszyklus von *D. discoideum* aufweisen. In Säugerzellen beendet YopH durch Dephosphorylierung frühe Phagozytosesignale von Komponenten des fokalen Adhäsionskomplexes wie FAK, p130Cas und Fyb (Viboud und Bliska 2005). In *D. discoideum* konnte kein Effekt festgestellt werden, vermutlich weil im Genom keine Homologe dieser Proteine bekannt sind. Des Weiteren wurde in vorherigen Studien gezeigt, dass die Protease YopJ die MAPK und NF- κ B Wege inhibiert und die Apoptose fördert (Zhang *et al.* 2005). In *D. discoideum* konnte allerdings kein NF- κ B Weg sowie kein Caspase-vermittelter Apoptoseweg gefunden werden. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass GFP-YopM wie in Hefen und Säugerzellen im Nukleus von *D. discoideum* akkumuliert (Benabdillah *et al.* 2004). Die Expression des Proteins verursacht aber unter den untersuchten Bedingungen, keine signifikanten Defekte. Es besteht daher die Annahme, dass die *Yersinia* Proteine YopH, YopJ und YopM keinen Effekt auf *D. discoideum* haben, weil möglicherweise die Angriffspunkte ihrer Aktionen nicht vorhanden oder so modifiziert sind, dass sie durch die Virulenzfaktoren nicht erkannt werden können.

Im Gegensatz dazu beeinflusst YopE das Aktinzytoskelett von *D. discoideum* auf vielfache Weise. Die durchgeführten Lokalisationsstudien haben gezeigt, dass GFP-YopE an intrazellulären Membranen, insbesondere dem Golgiapparat und in geringerem Maße auch am endoplasmatischen Reticulum lokalisiert ist (Abb. III-2). Die Fraktionierung im diskontinuierlichen Saccharosegradienten und die anschließenden enzymatischen Tests bestätigten die Assoziation mit den intrazellulären Membranen. In Säugerzellen lokalisiert YopE an intrazellulären Membranen wie beispielsweise der perinukleären Membran. Des Weiteren ist bekannt, dass für die intrazelluläre Lokalisation die Aminosäurereste 54-75 von

YopE ausreichend sind (Krall *et al.* 2004). Es wird diskutiert, ob die intrazelluläre Lokalisation von YopE zur Substratspezifität des Enzyms für die verschiedenen Rho GTPasen beiträgt. Diese Idee wird durch Daten in *S. cerevisiae* unterstützt, das keine Homologe für Rac, aber für Rho besitzt. In *S. cerevisiae* lokalisiert YopE ebenfalls an der Plasmamembran (Lesser und Miller 2001). Der Befund, dass in der Amöbe die Lokalisation von YopE derjenigen in Säugerzellen ähnelt (Aili *et al.* 2006), könnte ein Grund dafür sein, dass eine unterschiedlichen Verteilung der Rho GTPasen in Hefen und *D. discoideum* besteht.

In vitro ist YopE ein GAP für Rho, Cdc42 und Rac, und es wird angenommen, dass speziell RhoA- und Cdc42-abhängige Wege die Angriffziele für YopE *in vivo* sind (Black und Bliska 2000, Von Pawel-Rammingen *et al.* 2000). Kürzlich wurde festgestellt, dass Rac1 ebenfalls durch YopE *in vivo* betroffen ist (Andor *et al.* 2001, Aili *et al.* 2006). Es wurde gezeigt, dass selektiv an der Plasmamembran assoziiertes Rac1 ein Ziel von YopE darstellt (Wong und Isberg 2005), obwohl GFP-markiertes YopE an perinukleäre Membranen lokalisiert ist (Krall *et al.* 2004).

Im *D. discoideum* Genom sind keine Homologe von Rho und Cdc42 vorhanden, allerdings wurden 18 *rac* ähnliche Gene identifiziert (Weeks *et al.* 2004, Vlahou und Rivero 2006). Einzig RacH lokalisiert am Golgiapparat, ER und an der Kernhülle (Somesh *et al.* 2006) ähnlich wie es für die Lokalisation von YopE in dieser Arbeit gezeigt werden konnte. Dies führt zu der Annahme, dass RacH ein Ziel für YopE darstellen könnte.

Der *D. discoideum* RacH Überexprimierer zeigte eine reduzierte Wachstumsrate (Somesh *et al.* 2006) ähnlich der Wachstumsrate in YopE überexprimierenden Zellen. Der Wachstumsdefekt in Anwesenheit von YopE fällt allerdings in Flüssigkultur wesentlich deutlicher aus (Abb. III-5). Dies lässt den Schluss zu, dass hierbei verschiedene Rac Proteine involviert sind und beeinflusst werden.

Die anschließende Untersuchung zeigte, dass der Wachstumsdefekt von YopE und GFP-YopE exprimierenden Zellen nicht das Resultat einer inhibierten Zytokinese ist, da die Anzahl der polynukleären Zellen nicht signifikant erhöht ist (Abb. III-6). Vielmehr bestärkt es die Annahme, dass RacE (Larochelle *et al.* 1997) oder auch andere Racs, die primär in die Regulierung der Zytokinese involviert sind, keine Substrate von YopE darstellen.

Die reduzierte Anzahl an Kolonien auf *K. aerogenes* Rasen (Abb. III-7) führt zu der Annahme, dass eine verminderte Aufnahmefähigkeit vorliegt. Dies konnte allerdings in der Untersuchung der Endo- und Exozytose in Schüttelkultur nicht bestätigt werden, da kein verändertes Aufnahmeverhalten beobachtet werden konnte (Abb. III-8). Es ist sehr wahrscheinlich, dass die Expression des GFP-YopE heterogen war und damit der Anteil an moderat GFP-YopE exprimierenden Zellen möglicherweise höher als an stark GFP-YopE exprimierenden Zellen. So konnte in der anschließenden Quantifizierung der relativen Fluoreszenz auf keinen Defekt geschlossen werden (Abb. III-8). Untersuchungen der GFP-Intensitäten von GFP-YopE exprimierenden Zellen, die nach Inkubation mit fluoreszierenden Hefen inkubiert und anschließend fixiert wurden, könnten zur Klärung beitragen, da hier eine Unterscheidung zwischen schwach und stark GFP-YopE exprimierenden Zellen möglich ist. Die Resultate zeigen eindeutig eine verminderte Aufnahme der TRITC-markierten Hefen von stark GFP-YopE exprimierenden Zellen, während schwach oder nicht GFP-YopE exprimierende Zellen eine normale Phagozytosefähigkeit aufwiesen. Des Weiteren ist nicht auszuschließen, dass YopE in *D. discoideum* wie es auch für RacH postuliert wurde, eher bevorzugt in den Verkehrsprozessen der Endosomen involviert ist, nicht aber in den frühen Phasen der Endozytose. RacH soll besonders in den Aktin-basierenden Verkehr von der Plasmamembran zu vesikulären Kompartimenten hin involviert sein (Somesh *et al.* 2006). In Säugerzellen kann kein einzelnes Yop Protein die Phagozytose beeinträchtigen, wahrscheinlich weil die Yop Proteine synergistisch in der Zelle wirken müssen. Alle vier Effektoren, YopE, YopH, YopO/YpkA und YopT sind notwendig, um eine antiphagozytotische Aktion hervorzurufen (Grosdent *et al.* 2002).

Zuvor konnte gezeigt werden, dass eine RacH Überexpression in *D. discoideum* die Aktinpolymerisierung stimuliert (Somesh *et al.* 2006) und aktinzytoskeletale Defekte verursacht, die in einem reduzierten F-Aktingehalt resultieren. Des Weiteren führte eine Überexpression von Rac1 zu einer veränderten Aktinverteilung und ebenfalls zu einer Vielzahl Aktinzytoskelett-spezifischer Defekte (Dumontier *et al.* 2000). Da die Vermutung besteht, dass YopE diese Rho GTPasen als Angriffspunkte wählt, könnten diese Defekte unter anderem die Ursache für die, in dieser Arbeit beobachtete, verminderte Fähigkeit von YopE und

GFP-YopE exprimierenden Zellen sein in Nährmedium zu wachsen und Kolonien auf Bakterienrasen zu bilden.

Obwohl die Rho GTPase RacH als potenzielles Ziel von YopE in Betracht gezogen wird, bestehen phänotypische Unterschiede zwischen RacH defizienten Mutanten und den Defekten, die durch YopE verursacht werden. Während die Chemotaxis in YopE exprimierenden Amöben nicht verändert ist, ist die F-Aktinpolymerisierungsantwort nach cAMP Stimulierung fast vollständig blockiert (Somesh *et al.* 2006). Diese Antwort ist letztlich von RacB und vermutlich auch von Rac1a/b/c abhängig (Chung *et al.* 2000, Dumontier *et al.* 2000, Park *et al.* 2004). Schlussfolgernd könnte eine weitere Rho GTPase ein Ziel von YopE sein.

Wie schon vorher erwähnt, lässt die Assoziation von YopE mit verschiedenen Membrankompartimenten vermuten, dass RacH eine der Rho GTPasen ist, die beeinträchtigt wird und somit ein Ziel für *Yersinia* YopE darstellt. Falls diese Hypothese richtig ist, sollte die Expression von YopE in einem GFP-RacH überexprimierenden Stamm bis zu einem gewissen Grad den Wachstums-, Endozytose- und Zytokinesedefekt sowie die veränderte Vakuolinverteilung revertieren. Diese Defekte sind charakteristisch für den RacH Überexprimierer (Somesh *et al.* 2006). Die blockierte Aktinpolymerisierungsantwort nach cAMP Stimulierung ist ein Hinweis darauf, dass YopE einen inhibitorischen Effekt auf Rac1 hat. Aus diesem Grund, wurde ein *D. discoideum* Stamm generiert, der myc-fusioniertes YopE und GFP-RacH überexprimiert.

Die Untersuchung des Wachstums an diesem Stamm zeigt eine normale Wachstumsrate. Dies bestätigt die Annahme, dass YopE den Effekt in RacH umkehren kann und den Wachstumsdefekt von RacH in *D. discoideum* aufhebt.

Des Weiteren wurde die verminderte Aufnahme von FITC-markiertem Dextran in RacH durch YopE aufgehoben. Dies ist ein weiterer Hinweis auf die Korrelation zwischen RacH und YopE.

Es konnte allerdings kein Einfluss von YopE auf RacH und Rac1 im Zytokineseprozess festgestellt werden, wobei der Zytokinesedefekt in den RacH und Rac1 Überexprimierern generell schwach ausfällt. Zuvor wurde festgestellt, dass dieser Effekt durch andere Rho GTPasen (Larochelle *et al.* 1997) reguliert

wird, daher besteht die Vermutung, dass RacH und Rac1 nicht die einzigen Rho GTPasen sind, die von YopE beeinflusst werden.

Die Untersuchung der Aktivität von Rac1 in GFP-YopE exprimierenden Zellen zeigt ein sehr niedriges Aktivitätsmuster nach Stimulierung mit cAMP. Dies führt zu der Annahme, dass YopE in der Lage ist, die Aktivierung der Rho GTPase Rac1 in *D. discoideum* zu inhibieren und entspricht damit den Beobachtungen, die auch in Säugern gemacht wurden (Aili *et al.* 2006). Diese Resultate bestärken die Annahme, dass YopE ein GAP für Rac1 in *D. discoideum* darstellt.

Ein weiterer Hinweis auf die GAP Funktion von YopE, ist die Beobachtung von GFP-YopE exprimierenden Zellen, die eine weniger starke kortikale Aktinverteilung aufweisen (Abb. III-10). Diese Feststellung korreliert ebenfalls mit der Beobachtung in Säugern, wo eine Störung des peripheren Aktins auf die GAP Funktion von YopE vermuten ließ (Andor *et al.* 2001).

Die im Rahmen dieser Arbeit gesammelten Daten können durch ein hypothetisches Modell des Wirkmechanismus von YopE in *D. discoideum* dargestellt werden. (Abb IV-1). Die Rho GTPase RacH wird gezielt von dem GAP Protein YopE angegriffen. Dies führt zu der in dieser Arbeit beobachteten inhibierten Wachstums- und Endozytoseprozesse, ähnlich wie die in früheren Studien in dem RacH Knockout Stamm beschrieben wurden (Somesh *et al.* 2006). Des Weiteren könnte Rac1 ein mögliches Ziel von YopE sein, da die Rho GTPase ein deutlich vermindertes Aktivitätsmuster in GFP-YopE exprimierenden Zellen aufweist. Weiterhin ist gezeigt worden, dass unter anderem Rac1 in der Aktinpolymerisierungsantwort nach cAMP Stimulierung involviert ist (Chung *et al.* 2000). Im Gegensatz dazu ist diese Antwort in GFP-YopE exprimierenden Zellen fast vollständig blockiert und lässt den Schluss zu, dass YopE, die RhoGTPase Rac1 in ihrer Funktion inhibiert.

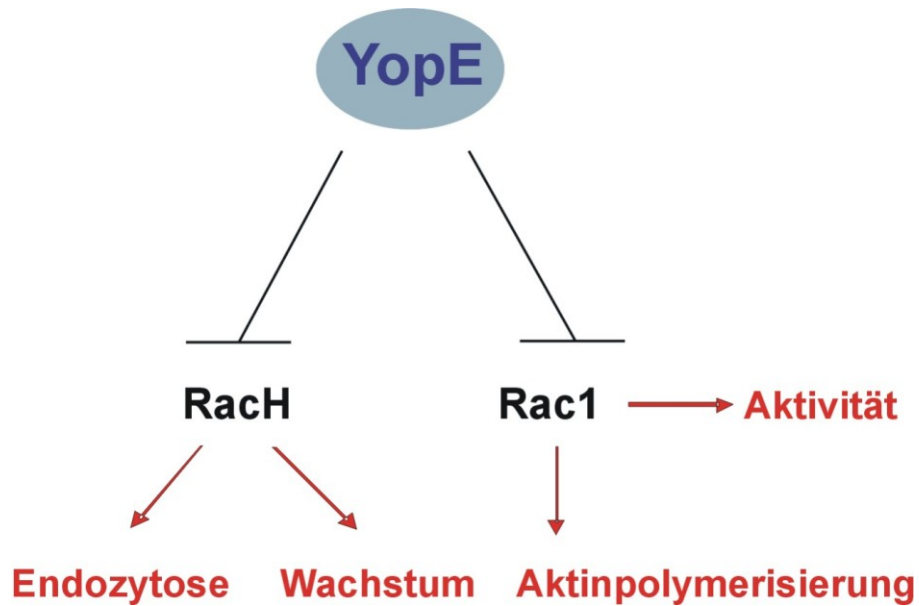


Abb. IV-1: Hypothetisches Modell des Wirkmechanismus von YopE in *D. discoideum*. Die im Rahmen dieser Arbeit gesammelten Daten lassen vermuten, dass die Rho GTPasen RacH und Rac1 potentielle Ziele für YopE darstellen könnten. In dem hypothetischen Modell wird gezeigt, dass das *Yersinia outer protein* YopE die Funktion der Rho GTPase RacH im Wachstums- und Endozytoseprozess revertiert. Die Aktinpolymerisierungsantwort nach cAMP Stimulierung ist bei YopE fast vollständig inhibiert. Für diesen Prozess ist bekannt, dass die Rho GTPasen RacB und Rac1a/b/c involviert sind. Weiterhin konnte keine Aktivität von Rac1 in YopE nach Stimulierung mit cAMP festgestellt werden, dies lässt auf die GAP Funktion des YopE in *D. discoideum* schließen. Die Farbe Rot weist auf eine Inhibierung dieser Prozesse hin.

Durch vier *Yersinia* Yop Effektorproteine konnte hier demonstriert werden, dass *D. discoideum* ein effizienter Modellorganismus für die funktionelle Analyse von bakteriellen Virulenzfaktoren ist. Dieser Organismus bietet ein großes Potential für die Analyse bakterieller und eukaryotischer Interaktionen. Aktinzytoskelett-spezifische Prozesse wie die Endo- und Exozytose, Chemotaxis sowie die Aktinpolymerisierung konnten detailliert untersucht und dabei die GAP Funktion von YopE auf die Rho GTPasen in *D. discoideum* bewiesen werden. Eine Verbindung zu den Resultaten in höheren Organismen konnte dadurch erstellt werden.

B. Charakterisierung von Miro

Proteine der Miro Unterfamilie bestehen aus einem Tandem von zwei GTPase Domänen, die durch eine kalziumbindende EF-Hände Domäne voneinander getrennt sind. Die N-terminale erste GTPase Domäne zeigt Sequenzähnlichkeiten mit anderen Proteinen der Ras Superfamilie (Fransson *et al.* 2003), während die Funktion der zweiten GTPase Domäne noch unbekannt ist. Die Miro Proteine werden durch ihre kurze C-terminale Transmembranregion an die äußere mitochondriale Membran verankert. Sie sind in allen Eukaryonten vorhanden, was auf eine konservierte Funktion durch alle Stämme hindurch schließen lässt.

Die Funktion der Miro Familie wurde bisher in *H. sapiens*, *D. melanogaster*, *S. cerevisiae* und *A. thaliana* analysiert. Die Deletionsmutanten und die Überexprimierer wiesen in allen Homologen, besonders in der Mitochondrienmorphologie Defekte auf. Ebenfalls konnten Interaktionspartner für die humanen Miro Isoformen und das *Drosophila* Miro identifiziert werden. Dabei handelte es sich um Kinesin-bindende Proteine, GRIF-1 und OIP106 in humanen Zellen (Brickley *et al.* 2005), und Milton in *Drosophila* (Stowers *et al.* 2002), die während des Transports der Mitochondrien entlang der Mikrotubuli mit den Miro GTPasen verbunden sind (Fransson *et al.* 2006). Ein Modell zur Bewegungsregulierung von Mitochondrien durch Miro ist erst kürzlich in *Drosophila* beschrieben worden (Glater *et al.* 2006).

Mittels GFP-Miro exprimierenden Fusionsproteinen konnte eine Lokalisation von Miro an den Mitochondrien in *D. discoideum* gezeigt werden. Eine Deletion der Transmembrandomäne von Miro führte zu einer Verteilung des Proteins innerhalb des Zytoplasmas. Diese Beobachtungen sind auch in humanen Zellen (Fransson *et al.* 2006) und in *A. thaliana* (Yamaoka und Leaver 2008) mit den entsprechenden Miro Homologen gemacht worden. Für Proteine der äußeren mitochondrialen Membran ist bekannt, dass sie positiv geladene Aminosäurereste beinhalten, die von einer hydrophoben Transmembransequenz flankiert werden (Wattenberg und Lithgow 2001, Borgese *et al.* 2003). Diese konnte auch für Hefen (Frederick *et al.* 2004) und Mensch (Fransson *et al.* 2006) gezeigt werden. Der Sequenzvergleich der Homologe mit *D. discoideum* Miro zeigte eine ähnliche Aminosäureanordnung (Abb. III-17)

Um die Rolle von Miro in *D. discoideum* zu untersuchen wurde ein Knockout Stamm generiert, mittels verschiedener Analysen die Defizienz des *gemA* Gens bestätigt und für Charakterisierungsstudien verwendet (s. Abschnitt 3.11).

Eine Defizienz des *gemA* Gens führte in *D. discoideum* zu keinen offensichtlichen Veränderungen in der Morphologie der Mitochondrien (Abb. III-36), allerdings wiesen *gemA*⁻ Zellen eine signifikant erniedrigte mitochondrialen Masse auf. Im Gegensatz dazu führte die Defizienz von Miro sowie die Überexpression von dominant negativen und konstitutiv aktiven Mutanten in humanen Zellen, Hefen und *Drosophila* zu sehr deutlichen Veränderungen in der Mitochondrienmorphologie. In humanen Zellen konnte bei den Überexprimierern die Bildung von fadenförmigen und dicht aneinander gepackten Mitochondrien beobachtet werden (Fransson *et al.* 2006), während in Hefen eine Miro Defizienz zu zusammengefallenen, globulären oder trauben-ähnlichen Mitochondrien führt (Frederick *et al.* 2004). Der Verlust von *Drosophila* Miro führte zu einer abnormalen subzellulären Verteilung der Mitochondrien in Nerven und Muskeln (Guo *et al.* 2005).

Des Weiteren wurde das Wachstum der *gemA* defizienten Zellen in Schüttelkultur und auf *K. aerogenes* Rasen erforscht, wobei ein deutlich niedrigerer Wachstumsanstieg in Schüttelkultur (Abb. III-27A) und eine kleinere Kolonienbildung auf dem Bakterienrasen (Abb. III-27B) festgestellt wurde. Der verminderte Wachstumsanstieg der *gemA* defizienten Zellen in Schüttelkultur konnte allerdings nicht auf eine beeinträchtigte Zytokinese zurückgeführt werden (s. Abschnitt 3.11.3.).

Anschließend Versuche mit einer *Rescue* Zelllinie zeigten eine Kompensation des Wachstumsdefekts in Schüttelkultur (Abb. III-28A), während auf dem Bakterienrasen dies nicht der Fall war (Abb. III-28B). Vermutlich ist dieser Defekt auf die GFP-Miro Überexpression zurückzuführen, da der Wachstumsanstieg der *Rescue* Zelllinie ähnlich die der GFP-Miro exprimierende Zelllinien war.

Da das Wachstum auf *K. aerogenes* Rasen mit einer Aufnahme der Bakterien korreliert und ein mitochondriales Protein ebenfalls in Zusammenhang mit diesen Prozessen Defekte gezeigt hat (Torija *et al.* 2006), wurde der Phago- und Pinozytoseprozess sowie die Exozytose von *gemA* defizienten Zellen untersucht.

Die Resultate konnten auf keine Involvierung von *D. discoideum* Miro in diesen Prozessen schließen lassen (Abb. III-29).

Es wurde gezeigt, dass mitochondriale Proteine in Prozesse wie der Phototaxis (Kotsifas *et al.* 2002), Chemotaxis (van Es *et al.* 2001) und Entwicklung (Torija *et al.* 2006) involviert sind. Daher wurden diese im Rahmen dieser Arbeit untersucht. Es konnten allerdings weder im phototaktischen (Abb. III-31) noch im chemotaktischen Verhalten (Abb. III-32) noch in der Entwicklung der *gemA* Mutanten Unterschiede im Vergleich zu den Kontrollzellen festgestellt werden. Die Resultate lassen daher den Schluss zu, dass Miro weder in den Signalwegen der Phototaxis noch der Chemotaxis involviert ist. Ebenfalls konnte im Entwicklungsprozess eine Beteiligung von Miro ausgeschlossen werden, da keine Veränderungen festgestellt werden konnten.

Es ist bekannt, dass Defekte in den Prozessen, die zuvor im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurden, hauptsächlich in einer Umordnung des Aktinzytoskeletts resultieren. Daher wurde die Verteilung von Aktin in *gemA* defizienten Zellen untersucht. Immunfluoreszenzstudien zeigten keine Veränderungen des Verteilungsmusters von Aktin in *gemA*⁻ Zellen. Diese Resultate führen zu der Annahme, dass Miro keine Rolle in der Regulierung des Aktinzytoskeletts spielt.

Um eine Rolle für Miro in der Funktion der Mitochondrien festzustellen, wurden verschiedene mitochondrienspezifische Experimente durchgeführt. Die Messung des Sauerstoff- und Glukoseverbrauchs offenbarte eine wesentlich höhere Verbrauchsrate in den *gemA* defizienten Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen. Im Gegensatz dazu ergaben die Messungen der ATP-Mengen in den *gemA* Mutanten deutlich niedrigere Konzentrationen. Zusammengenommen, könnten diese Resultate in Verbindung mit dem verminderten Wachstum der *gemA* defizienten Zellen in Schüttelkultur stehen.

Der erhöhte Sauerstoffverbrauch, kann dazu führen, dass die *gemA* defizienten Zellen nicht mehr in der Lage sind ein effizientes Wachstum in Schüttelkultur zu zeigen, da ihnen die entsprechende Energie fehlt, um ein Wachstumsmaximum ähnlich der Wildtypzellen zu erreichen.

Des Weiteren ist postuliert worden, dass *D. discoideum* ein ausschließlich aerober Organismus ist (Schiavo und Bisson 1989), diese Behauptung steht allerdings im Widerspruch mit einer früheren Publikation, in der postuliert wurde, dass in *D. discoideum* Laktat in geringen Konzentrationen nachgewiesen werden konnte (Schachner *et al.* 1984). Bei Sauerstoffmangel erfolgt der Glukoseabbau anaerob durch die Milchsäuregärung zu Laktat, dabei wird weniger Energie freigesetzt. Die Resultate in Bezug auf die Glukosemessungen zeigen einen erhöhten Verbrauch an Glukose, während Laktat nicht nachgewiesen werden konnte. Dies bekräftigt die Aussage, dass *D. discoideum* ein ausschließlich aerober Organismus ist. Da kein Umsatz von Milchsäure zu Laktat möglich ist, wird vermehrt Glukose umgesetzt, um einen möglichen Energiemangel der *gemA* defizienten Zellen auszugleichen. Letztlich scheint dies aber nicht zu gelingen, da die ATP-Mengen in den *gemA* defizienten Zellen deutlich niedriger ausfallen. Möglich ist, wie in Torija *et al.* gezeigt, dass niedrige ATP Konzentrationen auf gestörte metabolische Prozesse innerhalb der Mitochondrien schließen lassen (Torija *et al.* 2006). Da es sich allerdings bei Miro um ein Protein der äußeren mitochondrialen Membran handelt, ist es ebenfalls möglich, dass die reduzierte mitochondriale Masse für die geringeren ATP-Mengen verantwortlich ist.

Die Effizienz der Energieproduktion in *gemA* defizienten Zellen scheint beeinträchtigt und ein erhöhter Sauerstoff- und Glukoseverbrauch in diesen Zellen mit geringerer mitochondrialen Masse könnte die niedrigeren ATP-Konzentrationen erklären, da nicht genug Mitochondrien vorhanden sind, um den Energiemangel auszugleichen. Messungen des mitochondrialen Transmembranpotentials sowie der Reaktiven Sauerstoffspezies wiesen auf keine signifikanten Defekte hin, allerdings ist eine Rolle für Miro in der Bioenergetik der Zellen nicht auszuschließen.

In vorherigen Studien wurde postuliert, dass die Behandlung von *D. discoideum* Wildtypzellen mit Nocodazol zu einem degradierten Mikrotubulinetzwerk führt. Die Mitochondrien zeigten allerdings keine Veränderung in ihrer Verteilung und lagen weiterhin verstreut im Zytoplasma vor. Allerdings konnte nicht ausgeschlossen werden, dass die Mikrotubuli eine Rolle im Transport der Mitochondrien spielen (Fields *et al.* 2002). Diese Versuche wurden auch im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt, um die Verteilung der Mitochondrien und eine eventuelle Assoziation

mit den Mikrotubuli vor und nach Behandlung mit Nocodazol in Wildtyp- und *gemA* defizienten Zellen zu untersuchen. Die Behandlung der *D. discoideum* Wildtyp- und Mutantenzellen resultierte erwartungsgemäß in einem degradierten Mikrotubulinetzwerk. Des Weiteren hatten sich die Mitochondrien an die Zellperipherie zurückgezogen und lagen dort verklumpt vor (Abb. 44A und B). Diese Beobachtung steht, zumindest für die Wildtypzellen, im Widerspruch zu der Behauptung von Fields *et al.* Es ist eine eindeutige Umverteilung der Mitochondrien nach Behandlung mit dem Inhibitor Nocodazol festgestellt worden. Bei diesem Versuch wurden dieselben Bedingungen gewählt, wobei auch höhere Konzentrationen an Nocodazol und auch verschiedene Zeitpunkte der Inkubation mit Nocodazol verwendet wurden. Eine Ansammlung der Mitochondrien an der Zellperipherie konnte nach Nocodazolbehandlung trotzdem beobachtet werden. Es bleibt allerdings nicht auszuschließen, dass der in Fields *et al.* verwendete Wildtypstamm eine höhere Widerstandsfähigkeit gegen die Behandlung mit dem Inhibitor aufwies, als der im Rahmen dieser Arbeit verwendete AX2 Kontrollstamm. Die Resultate lassen allerdings den Schluss zu, dass die Mitochondrien mit den Mikrotubuli assoziieren, wie es auch in den weiteren Versuchen festgestellt werden konnte. Eine *gemA* Defizienz schien jedenfalls keinen Einfluss auf die Mitochondrienverteilung oder der Assoziation der Mitochondrien an den Mikrotubuli zu haben.

Es ist bekannt, dass in Säugern der Transport der Mitochondrien entlang der Mikrotubuli erfolgt (Rapp *et al.* 1996, Wiemer *et al.* 1997), während in Hefen dies ausschließlich an den Aktinfilamenten stattfindet (Hoepfner *et al.* 2001). Aus diesem Grund wurde ein Konstrukt generiert, das eine gleichzeitige Visualisierung des Mikrotubulinetzwerks sowie des Miro Proteins und damit der Mitochondrien, erlaubt. *In vivo* sollte die Position des Proteins und die Migration entlang der Mikrotubuli beobachtet werden. Da unter diesen Bedingungen eine *in vivo* Untersuchung nicht möglich war, wurde dies in fixierten Zellen durch direkte Immunfluoreszenz studiert. Das Miro Protein schien an den Mikrotubuli zu lokalisieren, was auf eine Assoziation der Mitochondrien mit den Mikrotubuli hindeutet (Abb. III-45). Eine weitere interessante Beobachtung wurde nach Nocodazolbehandlung der *D. discoideum* Zellen gemacht, die Mitochondrien bzw. die durch DAPI angefärbte mitochondriale DNA sammeln sich an der

Zellperipherie ähnlich der in Abschnitt 3.13.1 beschriebenen Beobachtungen. Allerdings bleibt hier das Miro Protein mit dem Mikrotubulinetzwerk verbunden bzw. in Nähe der Mikrotubuli. Dies konnte bisher noch nicht dokumentiert werden, daher ist es von Notwendigkeit, diese Annahme detaillierter zu untersuchen und zu dokumentieren.

Die zuvor erwähnten Beobachtungen könnten in Zusammenhang mit möglichen Interaktionspartnern von Miro in *D. discoideum* stehen. In humanen Zellen konnte gezeigt werden, dass Miro mit den Kinesin-bindenden Proteinen GRIF-1 and OIP106 interagiert. Dabei wird angenommen, dass die Miro GTPasen eine Verbindung zwischen den Mitochondrien und dem Transportsystem der Mikrotubuli herstellen (Fransson *et al.* 2006). Dies ist ein Prozess, der möglicherweise auch in *D. discoideum* stattfinden könnte.

D. discoideum besitzt Gene für 13 verschiedene Kinesine. DdKif3 ist ein Mitglied der Kinesin-1 Familie, die ihre Energie aus der ATP Hydrolyse beziehen und dadurch entlang der Mikrotubuli wandern können (Rohlk *et al.* 2008). Es ist nicht auszuschließen, dass diese Kinesine potentielle Bindepartner für Miro darstellen könnten.

Im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Sequenzabgleiche mit den putativen Kinesin-bindenden Proteindomänen von GRIF-1, OIP106 und Milton, konnten keine Hinweise auf mögliche Homologe der Kinesin-bindenden Proteine von Mensch und *Drosophila* in *D. discoideum* geben. Immunpräzipitationsstudien zur Identifizierung möglicher Interaktionspartner führten bisher nicht zum gewünschten Erfolg. Weitere Versuche sind notwendig, um potentielle Interaktionspartner von *D. discoideum* Miro zu identifizieren.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass Miro in *D. discoideum* nicht essentiell für die Regulierung der Mitochondrienmorphologie und -verteilung ist, wie es für die Homologe in Mensch, Fliege und Hefen gezeigt werden konnte. Des Weiteren scheint Miro die Aktinzytoskelett-spezifischen Prozesse nicht zu beeinflussen und daher ist eine Rolle für dieses Protein hierbei auszuschließen. Vielmehr scheint Miro im Transport der Mitochondrien entlang der Mikrotubuli involviert zu sein. Seine Lokalisation an den Mitochondrien und in Nähe der

Mikrotubuli lässt eine regulatorische Rolle vermuten ähnlich wie sie in Säugern (Fransson *et al.* 2006) und *Drosophila* (Guo *et al.* 2005) gezeigt wurde.

Daher sind *in vivo* Untersuchungen von wichtiger Bedeutung, die einen Aufschluss darüber geben könnten, ob und wie sich Miro entlang der Mikrotubuli fortbewegt und welche Kriterien entscheidend für die Bewegung sind. In Rice *et al.* wird angenommen, dass die GTP-Hydrolyse oder veränderte Kalziumkonzentrationen zu einer Konformationsänderung von Miro führen und dadurch die Rekrutierung von Milton an Miro regulieren (Rice und Gelfand 2006). In diesem Zusammenhang ist die Identifizierung potentieller Interaktionspartner von Interesse, um einen Einblick in den Transportmechanismus der Mitochondrien entlang der Mikrotubuli in *D. discoideum* geben zu können. Weiterhin sollten zur Klärung der Rolle von Miro, die funktionellen und regulatorischen Eigenschaften der einzelnen Domänen des Miro untersucht werden und welche dieser Domänen ein Ziel für Interaktionspartner darstellen könnten.

Literaturverzeichnis

- Adamson, P., *et al.* (1992). "Post-translational modifications of p21rho proteins." J Biol Chem **267**(28): 20033-8.
- Aepfelbacher, M. (2004). "Modulation of Rho GTPases by type III secretion system translocated effectors of Yersinia." Rev Physiol Biochem Pharmacol **152**: 65-77.
- Aili, M., *et al.* (2006). "Functional analysis of the YopE GTPase-activating protein (GAP) activity of Yersinia pseudotuberculosis." Cell Microbiol **8**(6): 1020-33.
- Andor, A., *et al.* (2001). "YopE of Yersinia, a GAP for Rho GTPases, selectively modulates Rac-dependent actin structures in endothelial cells." Cell Microbiol **3**(5): 301-10.
- Arellano, M., *et al.* (1999). "Rho GTPases in the control of cell morphology, cell polarity, and actin localization in fission yeast." Microsc. Res. Tech. **47**: 51-60.
- Aspenstroem, P. F. und A. Saras (2004). "Rho GTPases have diverse effects on the organisation of the actin filament system." Biochem J **377**: 327-337.
- Aspenstrom, P. (1999). "Effectors for the Rho GTPases." Curr Opin Cell Biol **11**(1): 95-102.
- Benabdillah, R., *et al.* (2004). "Identification of a nuclear targeting signal in YopM from Yersinia spp." Microb Pathog **36**(5): 247-61.
- Bernards, A. (2003). "GAPs galore! A survey of putative Ras superfamily GTPase activating proteins in man and Drosophila." Biochim Biophys Acta **1603**(2): 47-82.
- Bertholdt, G., *et al.* (1985). "Carbohydrate and other epitopes of the contact site A glycoprotein of Dictyostelium discoideum as characterized by monoclonal antibodies." Cell Differ **16**(3): 187-202.
- Birnboim, H. C. und J. Doly (1979). "A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA." Nucleic Acids Res **7**(6): 1513-23.
- Blaauw, M., *et al.* (2000). "Efficient control of gene expression by a tetracycline-dependent transactivator in single Dictyostelium discoideum cells." Gene **252**: 71-82.
- Black, D. S. und J. B. Bliska (2000). "The RhoGAP activity of the Yersinia pseudotuberculosis cytotoxin YopE is required for antiphagocytic function and virulence." Mol Microbiol **37**(3): 515-27.
- Blake, M. S., *et al.* (1984). "A rapid, sensitive method for detection of alkaline phosphatase-conjugated anti-antibody on Western blots." Anal Biochem **136**(1): 175-9.
- Bokko, P. B., *et al.* (2007). "Diverse cytopathologies in mitochondrial disease are caused by AMP-activated protein kinase signaling." Mol Biol Cell **18**(5): 1874-86.
- Borgese, N., *et al.* (2003). "Biogenesis of tail-anchored proteins." Biochem Soc Trans **31**(Pt 6): 1238-42.
- Bottone, E. J. (1997). "Yersinia enterocolitica: the charisma continues." Clin Microbiol Rev **10**(2): 257-76.
- Boureau, A., *et al.* (2007). "Evolution of the Rho family of ras-like GTPases in eukaryotes." Mol Biol Evol **24**(1): 203-16.
- Brickley, K., *et al.* (2005). "GRIF-1 and OIP106, members of a novel gene family of coiled-coil domain proteins: association in vivo and in vitro with kinesin." J Biol Chem **280**(15): 14723-32.
- Bruckner, S., *et al.* (2005). "Yersinia phosphatase induces mitochondrially dependent apoptosis of T cells." J Biol Chem **280**(11): 10388-94.
- Buchsbaum, R. J. (2007). "Rho activation at a glance." J Cell Sci **120**(Pt 7): 1149-52.
- Carter, P. B. (1975). "Pathogenicity of Yersinia enterocolitica for mice." Infect Immun **11**(1): 164-70.
- Chain, P. S., *et al.* (2004). "Insights into the evolution of Yersinia pestis through whole-genome comparison with Yersinia pseudotuberculosis." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(38): 13826-31.
- Chien, A., *et al.* (1976). "Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile Thermus aquaticus." J Bacteriol **127**(3): 1550-7.

- Chimini, G. und P. Chavrier (2000). "Function of Rho family proteins in actin dynamics during phagocytosis and engulfment." Nature Cell Biol. **2**: E191-E196.
- Chisholm, R. L. und R. A. Firtel (2004). "Insights into morphogenesis from a simple developmental system." Nat Rev Mol Cell Biol **5**(7): 531-41.
- Chung, C. Y., *et al.* (2000). "Role of Rac in controlling the actin cytoskeleton and chemotaxis in motile cells." Proc. Natl. Acad. Sci. USA **97**: 5225-5230.
- Coates, J. C. und A. J. Harwood (2001). "Cell-cell adhesion and signal transduction during Dictyostelium development." J Cell Sci **114**(Pt 24): 4349-58.
- Coleman, M. L., *et al.* (2004). "RAS and RHO GTPases in G1-phase cell-cycle regulation." Nat Rev Mol Cell Biol **5**(5): 355-66.
- Cossarizza, A., *et al.* (1993). "A new method for the cytofluorimetric analysis of mitochondrial membrane potential using the J-aggregate forming lipophilic cation 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolcarbocyanine iodide (JC-1)." Biochem Biophys Res Commun **197**(1): 40-5.
- Cosson, P., *et al.* (2002). "Pseudomonas aeruginosa virulence analyzed in a Dictyostelium discoideum host system." J Bacteriol **184**(11): 3027-33.
- de Hostos, E. L., *et al.* (1993). "Dictyostelium mutants lacking the cytoskeletal protein coronin are defective in cytokinesis and cell motility." J Cell Biol **120**(1): 163-73.
- DeLeo, F. R. und B. J. Hinnebusch (2005). "A plague upon the phagocytes." Nat Med **11**(9): 927-8.
- Deleuil, F., *et al.* (2003). "Interaction between the Yersinia protein tyrosine phosphatase YopH and eukaryotic Cas/Fyb is an important virulence mechanism." Cell Microbiol **5**(1): 53-64.
- DerMardirossian, C., *et al.* (2004). "Phosphorylation of RhoGDI by Pak1 mediates dissociation of Rac GTPase." Mol Cell **15**(1): 117-27.
- DiMauro, S. (2004). "Mitochondrial diseases." Biochim Biophys Acta **1658**(1-2): 80-8.
- Dransart, E., *et al.* (2005). "Uncoupling of inhibitory and shuttling functions of rho GDP dissociation inhibitors." J Biol Chem **280**(6): 4674-83.
- D'Souza-Schorey, C. und P. D. Stahl (1995). "Myristoylation is required for the intracellular localization and endocytic function of ARF6." Exp Cell Res **221**(1): 153-9.
- Du, Y., *et al.* (2002). "Role of fraction 1 antigen of Yersinia pestis in inhibition of phagocytosis." Infect Immun **70**(3): 1453-60.
- Duleh, S. N., *et al.* (2005). "Morphological and functional analysis of Rac1B in Dictyostelium discoideum." J Electron Microsc (Tokyo) **54**(6): 519-28.
- Dumontier, M., *et al.* (2000). "Rac1 GTPases control filopodia formation, cell motility, endocytosis, cytokinesis and development in Dictyostelium." J. Cell. Sci. **113**: 2253-2265.
- Eichinger, L., *et al.* (2005). "The genome of the social amoeba Dictyostelium discoideum." Nature **435**(7038): 43-57.
- Ellerbroek, S. M., *et al.* (2003). "Serine phosphorylation negatively regulates RhoA in vivo." J Biol Chem **278**(21): 19023-31.
- Ellis, S. und H. Mellor (2000). "Regulation of endocytic traffic by Rho family GTPases." Trends Cell Biol. **10**: 85-88.
- Erickson, J. W. und R. A. Cerione (2004). "Structural elements, mechanism, and evolutionary convergence of Rho protein-guanine nucleotide exchange factor complexes." Biochemistry **43**(4): 837-42.
- Farnsworth, C. C., *et al.* (1994). "Rab geranylgeranyl transferase catalyzes the geranylgeranylation of adjacent cysteines in the small GTPases Rab1A, Rab3A, and Rab5A." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(25): 11963-7.
- Faure, J., *et al.* (1999). "Phosphoinositide-dependent activation of Rho A involves partial opening of the RhoA/Rho-GDI complex." Eur J Biochem **262**(3): 879-89.
- Fields, S. D., *et al.* (2002). "Mitochondrial membrane dynamics are altered in cluA-mutants of Dictyostelium." J Muscle Res Cell Motil **23**(7-8): 829-38.
- Foultier, B., *et al.* (2003). "Identification of substrates and chaperone from the Yersinia enterocolitica 1B Ysa type III secretion system." Infect Immun **71**(1): 242-53.

- Francou, C. und J. Caen (1972). "A technic for the separation of rat platelet populations on a discontinuous sucrose gradient (application for platelet preservation)." Rev Eur Etud Clin Biol **17**(4): 426-7.
- Fransson, A., *et al.* (2003). "Atypical Rho GTPases have roles in mitochondrial homeostasis and apoptosis." J Biol Chem **278**(8): 6495-502.
- Fransson, S., *et al.* (2006). "The atypical Rho GTPases Miro-1 and Miro-2 have essential roles in mitochondrial trafficking." Biochem Biophys Res Commun **344**(2): 500-10.
- Frederick, R. L., *et al.* (2004). "Yeast Miro GTPase, Gem1p, regulates mitochondrial morphology via a novel pathway." J Cell Biol **167**(1): 87-98.
- Frederick, R. L., *et al.* (2008). "Multiple pathways influence mitochondrial inheritance in budding yeast." Genetics **178**(2): 825-37.
- Gao, Y., *et al.* (2001). "Trp(56) of rac1 specifies interaction with a subset of guanine nucleotide exchange factors." J Biol Chem **276**(50): 47530-41.
- Gerisch, G. und H. U. Keller (1981). "Chemotactic reorientation of granulocytes stimulated with micropipettes containing fMet-Leu-Phe." J. Cell Sci. **52**: 1-10.
- Glater, E. E., *et al.* (2006). "Axonal transport of mitochondria requires milton to recruit kinesin heavy chain and is light chain independent." J Cell Biol **173**(4): 545-57.
- Gorska-Andrzejak, J., *et al.* (2003). "Mitochondria are redistributed in Drosophila photoreceptors lacking milton, a kinesin-associated protein." J Comp Neurol **463**(4): 372-88.
- Grosdent, N., *et al.* (2002). "Role of Yops and adhesins in resistance of Yersinia enterocolitica to phagocytosis." Infect Immun **70**(8): 4165-76.
- Guo, X., *et al.* (2005). "The GTPase dMiro is required for axonal transport of mitochondria to Drosophila synapses." Neuron **47**(3): 379-93.
- Hacker, U., *et al.* (1997). "Fluid-phase uptake by macropinocytosis in Dictyostelium." J Cell Sci **110 (Pt 2)**: 105-12.
- Hagele, S., *et al.* (2000). "Dictyostelium discoideum: a new host model system for intracellular pathogens of the genus Legionella." Cell Microbiol **2**(2): 165-71.
- Hall, A. (1998). "Rho GTPases and the actin cytoskeleton." Science **279**: 509-514.
- Hall, A. L., *et al.* (1988). "Relationship of pseudopod extension to chemotactic hormone-induced actin polymerization in amoeboid cells." J. Cell. Biochem. **37**: 285-299.
- Hancock, J. F., *et al.* (1990). "A polybasic domain or palmitoylation is required in addition to the CAAX motif to localize p21ras to the plasma membrane." Cell **63**(1): 133-9.
- Hardie, D. G. und D. Carling (1997). "The AMP-activated protein kinase--fuel gauge of the mammalian cell?" Eur J Biochem **246**(2): 259-73.
- Hoepfner, D., *et al.* (2001). "A role for Vps1p, actin, and the Myo2p motor in peroxisome abundance and inheritance in Saccharomyces cerevisiae." J Cell Biol **155**(6): 979-90.
- Hoffman, G. R., *et al.* (2000). "Structure of the Rho family GTP-binding protein Cdc42 in complex with the multifunctional regulator RhoGDI." Cell **100**(3): 345-56.
- Howard, P. K., *et al.* (1988). "Establishment of a transient expression system for Dictyostelium discoideum." Nucleic Acids Res **16**(6): 2613-23.
- Inoue, H., *et al.* (1990). "High efficiency transformation of Escherichia coli with plasmids." Gene **96**(1): 23-8.
- Jenne, N., *et al.* (1998). "Targeted gene disruption reveals a role for vacuolin B in the late endocytic pathway and exocytosis." J Cell Sci **111 (Pt 1)**: 61-70.
- Keep, N. H., *et al.* (1997). "A modulator of rho family G proteins, rhoGDI, binds these G proteins via an immunoglobulin-like domain and a flexible N-terminal arm." Structure **5**(5): 623-33.
- Kessin, R. H. (2006). "The secret lives of Dictyostelium." Methods Mol Biol **346**: 3-14.
- Kotsifas, M., *et al.* (2002). "Chaperonin 60 and mitochondrial disease in Dictyostelium." J Muscle Res Cell Motil **23**(7-8): 839-52.
- Krall, R., *et al.* (2004). "Intracellular membrane localization of pseudomonas ExoS and Yersinia YopE in mammalian cells." J Biol Chem **279**(4): 2747-53.
- Kreff, M. und C. J. Weijer (1989). "Expression of a cell surface antigen in Dictyostelium discoideum in relation to the cell cycle." J Cell Sci **93 (Pt 1)**: 199-204.

- Krontiris, T. G. und G. M. Cooper (1981). "Transforming activity of human tumor DNAs." Proc Natl Acad Sci U S A **78**(2): 1181-4.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature **227**(5259): 680-5.
- Laporte, C., *et al.* (2007). "A necrotic cell death model in a protist." Cell Death Differ **14**(2): 266-74.
- Larochelle, D. A., *et al.* (1996). "A novel member of the rho family of small GTP-binding proteins is specifically required for cytokinesis." Mol. Biol. Cell **133**: 1321-1329.
- Larochelle, D. A., *et al.* (1997). "Role of the *Dictyostelium* racE in cytokinesis: Mutational analysis and localization studies by use of green fluorescent protein." Mol. Biol. Cell **8**: 935-944.
- Leiting, B. und A. Noegel (1988). "Construction of an extrachromosomally replicating transformation vector for *Dictyostelium discoideum*." Plasmid **20**(3): 241-8.
- Lenaz, G., *et al.* (2002). "Role of mitochondria in oxidative stress and aging." Ann N Y Acad Sci **959**: 199-213.
- Lesser, C. F. und S. I. Miller (2001). "Expression of microbial virulence proteins in *Saccharomyces cerevisiae* models mammalian infection." Embo J **20**(8): 1840-9.
- Lundin, A. und A. Thore (1975). "Analytical information obtainable by evaluation of the time course of firefly bioluminescence in the assay of ATP." Anal Biochem **66**(1): 47-63.
- Maniak, M., *et al.* (1995). "Coronin involved in phagocytosis: dynamics of particle-induced relocalization visualized by green fluorescent protein tag." Cell **83**: 915-924.
- Marenne, M. N., *et al.* (2003). "Genetic analysis of the formation of the Ysc-Yop translocation pore in macrophages by *Yersinia enterocolitica*: role of LcrV, YscF and YopN." Microb Pathog **35**(6): 243-58.
- Marin-Garcia, J. und M. J. Goldenthal (2008). "Mitochondrial centrality in heart failure." Heart Fail Rev **13**(2): 137-50.
- McElroy, W. D. und M. A. DeLuca (1983). "Firefly and bacterial luminescence: basic science and applications." J Appl Biochem **5**(3): 197-209.
- McTaggart, S. J. (2006). "Isoprenylated proteins." Cell Mol Life Sci **63**(3): 255-67.
- Mehta, D., *et al.* (2001). "Protein kinase C- α signals rho-guanine nucleotide dissociation inhibitor phosphorylation and rho activation and regulates the endothelial cell barrier function." J Biol Chem **276**(25): 22614-20.
- Mejia, E., *et al.* (2008). "Yersinia controls type III effector delivery into host cells by modulating Rho activity." PLoS Pathog **4**(1): e3.
- Monnat, J., *et al.* (1997). "Dictyostelium discoideum protein disulfide isomerase, an endoplasmic reticulum resident enzyme lacking a KDEL-type retrieval signal." FEBS Lett **418**(3): 357-62.
- Moon, S. Y. und Y. Zheng (2003). "Rho GTPase-activating proteins in cell regulation." Trends Cell Biol **13**(1): 13-22.
- Naktin, J. und K. G. Beavis (1999). "Yersinia enterocolitica and Yersinia pseudotuberculosis." Clin Lab Med **19**(3): 523-36, vi.
- Nellen, W., *et al.* (1984). "DNA-mediated transformation in *Dictyostelium discoideum*: regulated expression of an actin gene fusion." Mol Cell Biol **4**(12): 2890-8.
- Neuhoff, V. und H. M. Poehling (1980). "Dansylated proteins as marker proteins during isoelectric focusing." Hoppe Seylers Z Physiol Chem **361**(1): 77-8.
- Noegel, A. A., *et al.* (2004). "The cyclase-associated protein CAP as regulator of cell polarity and cAMP signaling in *Dictyostelium*." Mol Biol Cell **15**(2): 934-45.
- Ogawa, S., *et al.* (2000). "The mitochondrial DNA of *Dictyostelium discoideum*: complete sequence, gene content and genome organization." Mol Gen Genet **263**(3): 514-9.
- Palmer, L. E., *et al.* (1998). "YopJ of *Yersinia pseudotuberculosis* is required for the inhibition of macrophage TNF- α production and downregulation of the MAP kinases p38 and JNK." Mol Microbiol **27**(5): 953-65.
- Park, K. C., *et al.* (2004). "Rac regulation of chemotaxis and morphogenesis in *Dictyostelium*." EMBO J **21**: 4177-4189.

- Parkhill, J., *et al.* (2001). "Genome sequence of *Yersinia pestis*, the causative agent of plague." Nature **413**(6855): 523-7.
- Pechlivanis, M. und J. Kuhlmann (2006). "Hydrophobic modifications of Ras proteins by isoprenoid groups and fatty acids--More than just membrane anchoring." Biochim Biophys Acta **1764**(12): 1914-31.
- Peck, J., *et al.* (2002). "Human RhoGAP domain-containing proteins: structure, function and evolutionary relationships." FEBS Lett **528**(1-3): 27-34.
- Pendergrass, W., *et al.* (2004). "Efficacy of MitoTracker Green and CMXRosamine to measure changes in mitochondrial membrane potentials in living cells and tissues." Cytometry A **61**(2): 162-9.
- Perry, R. D. und J. D. Fetherston (1997). "*Yersinia pestis*--etiologic agent of plague." Clin Microbiol Rev **10**(1): 35-66.
- Perucho, M., *et al.* (1981). "Human-tumor-derived cell lines contain common and different transforming genes." Cell **27**(3 Pt 2): 467-76.
- Pukatzki, S., *et al.* (2006). "Identification of a conserved bacterial protein secretion system in *Vibrio cholerae* using the *Dictyostelium* host model system." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(5): 1528-33.
- Rapp, S., *et al.* (1996). "Microtubule-based peroxisome movement." J Cell Sci **109** (Pt 4): 837-49.
- Rauchenberger, R., *et al.* (1997). "Coronin and vacuolin identify consecutive stages of a late, actin-coated endocytic compartment in *Dictyostelium*." Curr Biol **7**(3): 215-8.
- Rice, S. E. und V. I. Gelfand (2006). "Paradigm lost: *milton* connects kinesin heavy chain to *miro* on mitochondria." J Cell Biol **173**(4): 459-61.
- Rivero, E. u. (2006). "*Dictyostelium Discoideum* Protocols." Humana Press.
- Rivero, F., *et al.* (2002). "Defects in cytokinesis, actin reorganization and the contractile vacuole in cells deficient in RhoGDI." Embo J **21**(17): 4539-49.
- Rohlk, C., *et al.* (2008). "Properties of the Kinesin-1 motor DdKif3 from *Dictyostelium discoideum*." Eur J Cell Biol **87**(4): 237-49.
- Rossmann, K. L. und J. Sondek (2005). "Larger than Dbl: new structural insights into RhoA activation." Trends Biochem Sci **30**(4): 163-5.
- Saiki, R. K., *et al.* (1988). "Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase." Science **239**(4839): 487-91.
- Sambrook, J., *et al.* (1989). Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sambrook, J. und D. W. Russell (2001). Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 3rd ed. Cold Spring Harbor, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sander, E. E. und J. G. Collard (1999). "Rho-like GTPases: their role in epithelial cell-cell adhesion and invasion." Eur J Cancer **35**(9): 1302-8.
- Schachner, E., *et al.* (1984). "Specific changes in lactate levels, lactate dehydrogenase patterns and cytochrome b559 in *Dictyostelium discoideum* caused by queuine." Eur J Biochem **139**(3): 481-7.
- Schapira, A. H. (1998). "Mitochondrial dysfunction in neurodegenerative disorders." Biochim Biophys Acta **1366**(1-2): 225-33.
- Schiavo, G. und R. Bisson (1989). "Oxygen influences the subunit structure of cytochrome c oxidase in the slime mold *Dictyostelium discoideum*." J Biol Chem **264**(13): 7129-34.
- Schotte, P., *et al.* (2004). "Targeting Rac1 by the *Yersinia* effector protein YopE inhibits caspase-1-mediated maturation and release of interleukin-1beta." J Biol Chem **279**(24): 25134-42.
- Seabra, M. C. und G. L. James (1998). "Prenylation assays for small GTPases." Methods Mol Biol **84**: 251-60.
- Shao, F. (2008). "Biochemical functions of *Yersinia* type III effectors." Curr Opin Microbiol **11**(1): 21-9.
- Shih, C., *et al.* (1981). "Transforming genes of carcinomas and neuroblastomas introduced into mouse fibroblasts." Nature **290**(5803): 261-4.

- Simpson, P. A., *et al.* (1984). "Monoclonal antibodies prepared against *Dictyostelium* actin: characterization and interaction with actin." J. Cell. Biol. **1**: 287-295.
- Skrzypek, E., *et al.* (1998). "Targeting of the *Yersinia pestis* YopM protein into HeLa cells and intracellular trafficking to the nucleus." Mol Microbiol **30**(5): 1051-65.
- Solomon, J. M., *et al.* (2003). "Intracellular replication of *Mycobacterium marinum* within *Dictyostelium discoideum*: efficient replication in the absence of host coronin." Infect Immun **71**(6): 3578-86.
- Somesh, B. P. und R. H. Insall (2003). "RacG uses alternative signalling pathways to regulate morphology, phagocytosis and chemotaxis in *Dictyostelium*." submitted.
- Somesh, B. P., *et al.* (2006). "Dictyostelium RacH regulates endocytic vesicular trafficking and is required for localization of vacuolin." Traffic **7**(9): 1194-212.
- Somesh, B. P., *et al.* (2006). "RacG regulates morphology, phagocytosis, and chemotaxis." Eukaryot Cell **5**(10): 1648-63.
- Stowers, R. S., *et al.* (2002). "Axonal transport of mitochondria to synapses depends on Milton, a novel *Drosophila* protein." Neuron **36**(6): 1063-77.
- Suggs, S. V., *et al.* (1981). "Use of synthetic oligonucleotides as hybridization probes: isolation of cloned cDNA sequences for human beta 2-microglobulin." Proc Natl Acad Sci U S A **78**(11): 6613-7.
- Sulakvelidze, A. (2000). "Yersiniae other than *Y. enterocolitica*, *Y. pseudotuberculosis*, and *Y. pestis*: the ignored species." Microbes Infect **2**(5): 497-513.
- Takahashi, K., *et al.* (1997). "Direct interaction of the Rho GDP dissociation inhibitor with ezrin/radixin/moesin initiates the activation of the Rho small G protein." J. Biol. Chem. **272**: 23371-23375.
- Takai, Y., *et al.* (2001). "Small GTP-binding proteins." Physiol Rev **81**(1): 153-208.
- ten Klooster, J. P. und P. L. Hordijk (2007). "Targeting and localized signalling by small GTPases." Biol Cell **99**(1): 1-12.
- Torija, P., *et al.* (2006). "Functional genomics in *Dictyostelium*: MidA, a new conserved protein, is required for mitochondrial function and development." J Cell Sci **119**(Pt 6): 1154-64.
- Towbin, H., *et al.* (1979). "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications." Proc. Natl. Acad. Sci. USA **76**: 4350-4354.
- Trosky, J. E., *et al.* (2008). "Yersinia outer proteins: Yops." Cell Microbiol **10**(3): 557-65.
- Trulzsch, K., *et al.* (2004). "Contribution of the major secreted yops of *Yersinia enterocolitica* O:8 to pathogenicity in the mouse infection model." Infect Immun **72**(9): 5227-34.
- Van Aelst, L. und C. D'Souza-Schorey (1997). "Rho GTPases and signaling networks." Genes Dev. **11**: 2295-2322.
- van Es, S., *et al.* (2001). "Tortoise, a novel mitochondrial protein, is required for directional responses of *Dictyostelium* in chemotactic gradients." J Cell Biol **152**(3): 621-32.
- Veltman, D. und P. J. M. V. Haastert (2003). "Regulation of *Dictyostelium* guanylyl cyclases." Protist **154**: 33-42.
- Veltman, D. und P. J. Van Haastert (2003). "Regulation of *Dictyostelium* guanylyl cyclases." Protist **154**(1): 33-42.
- Viboud, G. I. und J. B. Bliska (2005). "Yersinia outer proteins: role in modulation of host cell signaling responses and pathogenesis." Annu Rev Microbiol **59**: 69-89.
- Viboud, G. I., *et al.* (2003). "Proinflammatory signalling stimulated by the type III translocation factor YopB is counteracted by multiple effectors in epithelial cells infected with *Yersinia pseudotuberculosis*." Mol Microbiol **47**(5): 1305-15.
- Vlahou, G. und F. Rivero (2006). "Rho GTPase signaling in *Dictyostelium discoideum*: insights from the genome." Eur J Cell Biol **85**(9-10): 947-59.
- Vogel, G., *et al.* (1980). "Mechanism of phagocytosis in *Dictyostelium discoideum*: phagocytosis is mediated by different recognition sites as disclosed by mutants with altered phagocytotic properties." J Cell Biol **86**(2): 456-65.

- Von Pawel-Rammingen, U., *et al.* (2000). "GAP activity of the Yersinia YopE cytotoxin specifically targets the Rho pathway: a mechanism for disruption of actin microfilament structure." *Mol Microbiol* **36**(3): 737-48.
- Wallraff, E. und H. G. Wallraff (1997). "Migration and bidirectional phototaxis in Dictyostelium discoideum slugs lacking the actin cross-linking 120 kDa gelation factor." *J Exp Biol* **200**(Pt 24): 3213-20.
- Wattenberg, B. und T. Lithgow (2001). "Targeting of C-terminal (tail)-anchored proteins: understanding how cytoplasmic activities are anchored to intracellular membranes." *Traffic* **2**(1): 66-71.
- Weeks, G. G., *et al.* (2004). "The Small GTPase Superfamily."
- Wehland, J., *et al.* (1983). "A rat monoclonal antibody reacting specifically with the tyrosylated form of alpha-tubulin. I. Biochemical characterization, effects on microtubule polymerization in vitro, and microtubule polymerization and organization in vivo." *J Cell Biol* **97**(5 Pt 1): 1467-75.
- Weiner, O. H., *et al.* (1993). "The actin-binding protein comitin (p24) is a component of the Golgi apparatus." *J Cell Biol* **123**(1): 23-34.
- Wennerberg, K. und C. J. Der (2004). "Rho-family GTPases. It's not only Rac and Rho." **1301-1312**.
- Wennerberg, K., *et al.* (2005). "The Ras superfamily at a glance." *J Cell Sci* **118**(Pt 5): 843-6.
- Wiemer, E. A., *et al.* (1997). "Visualization of the peroxisomal compartment in living mammalian cells: dynamic behavior and association with microtubules." *J Cell Biol* **136**(1): 71-80.
- Wilczynska, Z., *et al.* (1997). "Mitochondrial mutations impair signal transduction in Dictyostelium discoideum slugs." *Biochem Biophys Res Commun* **234**(1): 39-43.
- Wilkins, A., *et al.* (2005). "The Dictyostelium genome encodes numerous RasGEFs with multiple biological roles." *Genome Biol* **6**(8): R68.
- Williams, C. L. (2003). "The polybasic region of Ras and Rho family small GTPases: a regulator of protein interactions and membrane association and a site of nuclear localization signal sequences." *Cell Signal* **15**(12): 1071-80.
- Williams, R. S., *et al.* (2006). "Towards a molecular understanding of human diseases using Dictyostelium discoideum." *Trends Mol Med* **12**(9): 415-24.
- Wittinghofer, A. und N. Nassar (1996). "How Ras-related proteins talk to their effectors." *Trends Biochem Sci* **21**(12): 488-91.
- Wong, K. W. und R. R. Isberg (2005). "Yersinia pseudotuberculosis spatially controls activation and misregulation of host cell Rac1." *PLoS Pathog* **1**(2): e16.
- Yaffe, M. P., *et al.* (2003). "Mitochondrial positioning in fission yeast is driven by association with dynamic microtubules and mitotic spindle poles." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(20): 11424-8.
- Yamaoka, S. und C. J. Leaver (2008). "EMB2473/MIRO1, an Arabidopsis Miro GTPase, is required for embryogenesis and influences mitochondrial morphology in pollen." *Plant Cell* **20**(3): 589-601.
- Young, G. M., *et al.* (2000). "Motility is required to initiate host cell invasion by Yersinia enterocolitica." *Infect Immun* **68**(7): 4323-6.
- Young, L. H., *et al.* (2005). "AMP-activated protein kinase: a key stress signaling pathway in the heart." *Trends Cardiovasc Med* **15**(3): 110-8.
- Zhang, Y., *et al.* (2008). "Type III secretion decreases bacterial and host survival following phagocytosis of Yersinia pseudotuberculosis by macrophages." *Infect Immun* **76**(9): 4299-310.
- Zhang, Y., *et al.* (2005). "Inhibition of MAPK and NF-kappa B pathways is necessary for rapid apoptosis in macrophages infected with Yersinia." *J Immunol* **174**(12): 7939-49.
- Zhou, H., *et al.* (2005). "Yersinia virulence factor YopJ acts as a deubiquitinase to inhibit NF-kappa B activation." *J Exp Med* **202**(10): 1327-32.

Zusammenfassung

Alle humanpathogene *Yersinia* Spezies teilen sich ein Virulenz-assoziiertes TypIII Sekretionssystem, das Yop Effektorproteine in die Wirtszellen translozieren, um die durch Infektionen induzierten Signalantworten entgegenzuwirken und die Phagozytose zu verhindern. In dieser Arbeit wurde *D. discoideum* als Modellorganismus verwendet, um die Yop Proteinfunktion in zellulären Prozessen zu untersuchen. Die *Y. pseudotuberculosis* YopE, YopH, YopM und YopJ Proteine wurden *de novo* in *D. discoideum* exprimiert und ihre Effekte auf das vegetative Wachstum, der Phagozytose und Aktinpolymerisierung untersucht. Es konnten für YopH, YopJ und YopM keine Defekte aufgezeigt werden, während die Expression von YopE, das ein GAP für Rho GTPasen ist und zu zerstörten Aktinfilamenten in Säugerzellen führt, in einer reduzierten Wachstumsrate in Schüttelkultur und auf Bakterienrasen resultiert. Des Weiteren assoziiert GFP-markiertes YopE an intrazellulären Membranen, im Speziellen dem Golgiapparat und weniger auffallend am ER. YopE-exprimierende Zellen wiesen weniger F-Aktin auf, eine veränderte Aktinverteilung und zeigten eine beeinträchtigte Aktinpolymerisierungsantwort durch cAMP Stimulierung, obwohl die Chemotaxis und andere Aktinvermittelte Prozesse wie die Zytokinese nicht beeinflusst wurden. Eine starke GFP-YopE Expression resultierte in einer verminderten Phagozytose. Weiterhin führte eine Expression von GFP-YopE in den Rho GTPasen RacH und Rac1 Überexprimierern zu einer Inhibierung ihrer Funktion in *D. discoideum* und bestätigten somit die Funktion von YopE als GAP Protein.

Die Proteine der Miro Familie bestehen aus einem Tandem von zwei GTPase Domänen, die eine EF-Hände Domäne flankieren und eine C-terminale Transmembrandomäne. Die N-terminale GTPase Domäne hat Sequenzähnlichkeiten zu anderen Proteinen der Ras Superfamilie, während die Funktion der zweiten GTPase bisher unbekannt ist. Die Miro Familie ist in allen Eukaryonten vorhanden, was auf eine konservierte Funktion durch alle Stämme hindurch schließen lässt. Mit *D. discoideum* als Modellorganismus wurden die biochemischen und funktionellen Aspekte der Rolle von Miro untersucht. Ein Miro Gen (*gemA*) wurde bisher in *D. discoideum* identifiziert. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Miro Proteine durch ihre Transmembrandomäne an

der äusseren mitochondrialen Membran verankert werden. Durch einen generierten Knockoutstamm war es möglich, Aktinzytoskelett-spezifische Prozesse und die mitochondriale Funktion von Miro zu untersuchen. Die Analysen von *gemA* defizienten Zellen zeigten signifikante Defekte im Sauerstoff- und Glukoseverbrauch sowie reduzierte ATP Konzentrationen, die durch einen möglichen Energiemangel oder durch eine reduzierte mitochondriale Masse verursacht wurden. Des Weiteren wurde eine Assoziation des Miro mit dem Mikrotubulinetzwerk beobachtet; dies könnte auf eine Rolle des Miro im Transport der Mitochondrien entlang der Mikrotubuli vermuten lassen. Weitere Untersuchungen sind notwendig, um potentielle Interaktionspartner zu identifizieren und die Rolle des Miro im Zusammenhang mit dem Mitochondrientransport in *D. discoideum* zu bekräftigen.

Summary

All human pathogenic *Yersinia* species share a virulence-associated type III secretion system that translocates Yop effector proteins into host cells to counteract infection-induced signaling responses and prevent phagocytosis.

In this study *D. discoideum* was utilized as model organism for analyzing Yop protein function on cellular processes. The *Y. pseudotuberculosis* YopE, YopH, YopM and YopJ proteins were expressed *de novo* within *D. discoideum* and their effect on vegetative growth, phagocytosis, and actin polymerization was analyzed. No severe effect was observed for YopH, YopJ, YopM, but expression of YopE, which is a GAP for Rho GTPases that leads to disruption of actin filaments in mammalian cells, was shown to be harmful for *D. discoideum* and resulted in a strong growth inhibition in axenic medium and on bacterial lawn. Furthermore, we found that GFP-labeled YopE associates with intracellular membranes, particularly with the Golgi apparatus and less visibly with the ER. YopE expressing cells had less F-actin and showed an impaired actin polymerization response upon cAMP stimulation, although chemotaxis and other actin-mediated processes such as cytokinesis were apparently unaffected. Strong GFP-YopE expression was shown to result in a reduced phagocytosis. Furthermore, expression of GFP-YopE in strains that overexpress Rho GTPases RacH and Rac1 led to strong inhibition of their functions in *D. discoideum* and confirmed the GAP function of YopE.

Proteins of the Miro family consist of a tandem of two GTPase domains, which is separated by a linker region containing two calcium-binding EF hand motifs. The N-terminal GTPase domain has sequence similarity with proteins of the Ras superfamily, whereas the second GTPase domain is of unknown function. The Miro family is represented in all eukaryotes, suggestive of a conserved function throughout the phyla. Using *D. discoideum* as a model organism research on the biochemical and functional aspects was possible to uncover the role of Miro. One Miro gene (*gemA*) has been identified in *D. discoideum*. Miro proteins are anchored to the outer mitochondrial membrane by virtue of a short transmembrane region as shown in this study for the *D. discoideum* homolog too. Actin cytoskeleton specific processes as well as the mitochondrial function of Miro were studied by using a generated knockout construct. Investigations of *gemA* deficient

cells revealed significant defects in oxygen and glucose consumption as well as less ATP levels, which might be due to a deficiency of energy or to the noticed reduced mitochondrial mass. Furthermore an association of Miro with the microtubule network was observed, which might suggest a role for Miro in the transport of mitochondria along the microtubules. Further analyses are necessary for the identification of potential interaction partners to underscore a role for Miro in the trafficking processes of *D. discoideum*.

Erklärung

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbstständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit - einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen-, die anderen Werken in Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; dass sie – abgesehen von unten angegebenen Teilpublikationen - noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, dass ich eine solche Teilpublikation vor Abschluss des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen dieser Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Prof. Dr. Angelika A. Noegel und PD Dr. Francisco Rivero Crespo betreut worden.

Köln, den 09.12.2008

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Zentrums für Biochemie, die mich bei der Anfertigung dieser Dissertation unterstützt haben, bedanken.

PD Dr. Francisco Rivero für die Bereitstellung der interessanten Themen, deine stetige Diskussions- und Hilfsbereitschaft und besonders auch für die Möglichkeit an nationalen und internationalen Kongressen teilzunehmen.

Prof. Dr. Angelika A. Noegel für die Möglichkeit zur Durchführung dieser Arbeit an ihrem renommierten Institut unter sehr guten Arbeitsbedingungen.

Prof. Dr. Siegfried Roth für die Übernahme des Zweitgutachtens und Prof. Dr. Peter Kloppenburg für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes.

Besonderer Dank gilt meiner Arbeitsgruppe: Eva-Maria, Jessica und Marion, für eure tolle Unterstützung und Zusammenarbeit und für viele unvergesslich humorvolle und schöne Momente.

Ein großer Dank geht an...

Rosi, Christoph und Ludwig für eure Hilfsbereitschaft und Anregungen zu meiner Arbeit, Dörte, Budi und Gudrun für eure stetige und freundliche Hilfe bei organisatorischen und EDV-Angelegenheiten und den guten Seelen des Instituts, Brigitte, Bärbel und Sonja, meinen Großmeister B(erthold), für deine Hilfe bei der Antikörpergenerierung und dein großes Herz sowie Maria, Martina und Rolf für eure wertvollen Ratschläge.

Ein herzlicher und besonderer Dank geht an...

meine Dicty Sister Mary, dem Gym Master Sascha und dem B-Girl Ria, für eure Motivation, Unterstützung und euren Humor:)

Ich möchte mich herzlichst bei allen meinen lieben ehemaligen und aktuellen Kollegen bedanken: Hua, Akis, Yvonne, Hafi, Tanja, Verena, Subhanjan, Anne, Christian, Rashmi, Charles, Vivek, Raphael, Kalle, Margit, Kristina und Surayya.

Ein besonders liebevoller und großer Dank gilt meiner Familie und meinen Freunden, für eure immerwährende Unterstützung und euer Vertrauen, in jeglicher Hinsicht!

Name Georgia Vlahou
Geburtsdatum 07.11.1976
Geburtsort Köln
Staatsangehörigkeit griechisch

Schulbildung:

1983-1987 Städt. Kath. Grundschule, Köln
Besuch der griechischen Grundschule, Köln
1987-1996 Hansa-Gymnasium, Köln
Besuch des griechischen Gymnasiums bis 1993

Hochschulbildung:

10/1996-02/2003 Studium der Biologie mit Abschluss des Vordiploms an der Universität zu Köln
04/2003-04/2004 Hauptstudium der Biologie an der Universität zu Köln
11/2004-08/2005 Diplomarbeit mit dem Thema "Rho GTPasen abhängige Signaltransduktion: die Funktion von RacG," im Fachbereich Biologie der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität zu Köln
seit Oktober 2005 Praktische Durchführung der Dissertation bei Prof. Dr. Angelika A. Noegel in der Arbeitsgruppe PD Dr. Francisco Rivero Crespo am Institut für Biochemie der Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln mit dem Thema „Charakterisierung des *Yersinia* Effektorproteins YopE und der mitochondrialen GTPase Miro in *D. discoideum*“

Publikationen aus der Diplomarbeit:

Baggavalli P. Somesh, **Georgia Vlahou**, Miho Iijima, Robert H. Insall, Peter Devreotes, and Francisco Rivero. RacG Regulates Morphology, Phagocytosis, and Chemotaxis. *Eukaryot Cell*. 5:1648-63 (2006)

Georgia Vlahou and Francisco Rivero. Rho GTPase signaling in *Dictyostelium discoideum*: Insights from the genome. *Eur. J Cell Biol*. 85:947-959 (2006)