

Aus dem Adolf-Butenandt- Institut für Physiologische Chemie,
Stoffwechselbiochemie, Molekularbiologie und Zellbiologie der
Ludwig-Maximilians-Universität München
Vorstand: Prof. Dr.rer.nat. Dr.med. Walter Neupert

Molekulare Grundlagen der Infektion amöboider Zellen durch pathogene Bakterien

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von
Stephan Schwager

aus
München

2004

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Michael Schleicher

Mitberichterstatter: Prof. Dr. R. Haas
Prof. Dr. Chr. Prinz

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter:

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. K. Peter

Tag der mündlichen Prüfung: 11.11.2004

Teile dieser Arbeit wurden bereits zuvor veröffentlicht:

Schwager, S., Hägele, S., Hacker, J. and Schleicher, M.; (2000); Dictyostelium as a model system for Legionella infection: search for essential host proteins. Eur. J. Cell Biol. 79:130 (Poster-Präsentation beim ELSO Meeting, Genf, 09/2000)

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	1
2	Einleitung	3
2.1	Intrazelluläre Erreger	3
2.1.1	Legionellen	3
2.1.2	Listeria	8
2.1.3	Mycobakterien	10
2.2	Natural Resistance Associated Protein (Nramp)	13
2.2.1	Nramp in Säugetieren	13
2.2.2	Nramp in anderen Organismen	17
2.3	<i>Dictyostelium discoideum</i> als Modellsystem	19
2.4	Ziel der Arbeit	22
3	Ergebnisse	23
3.1	Analyse der Nramp-Sequenzen	23
3.1.1	Identifikation zweier Nramp Homologe in <i>D. discoideum</i>	23
3.1.2	Charakterisierung der Proteinsequenzen	27
3.1.3	Phylogenitätsanalyse	31
3.1.4	Hydrophobizitätsplots	32
3.2	Molekularbiologische Charakterisierung	35
3.2.1	Northern- und Southernblotting	35
3.2.2	Klonierung von DdNrampA und B zur Überexpression in <i>E. coli</i>	38
3.2.3	Herstellung von Antikörpern	41
4	Diskussion	51

5	Material und Methoden	58
5.1	Material	58
5.1.1	Enzyme, Antikörper, Inhibitoren und Antibiotika	58
5.1.2	Reagenzien	59
5.1.3	Medien	59
5.1.4	Puffer und Lösungen	61
5.1.5	Bakterienstämme	61
5.1.6	<i>Dictyostelium discoideum</i> Stämme	61
5.1.7	Vektoren	62
5.1.8	Radiochemikalien	62
5.1.9	Geräte	62
5.1.10	Sonstige Materialien	63
5.1.11	Zentrifugen und Rotoren	63
5.1.12	Computerprogramme zur Sequenzanalyse und Datendarstellung	63
5.2	Methoden	64
5.2.1	<i>D. discoideum</i> Kulturen	64
5.2.2	Entwicklung von <i>D. discoideum</i>	64
5.2.3	Sporenkonservierung	65
5.2.4	Einfrieren von <i>Dictyostelium</i> -Zellen	65
5.3	Molekularbiologische Methoden	66
5.3.1	Präparation von Plasmid-DNA	66
5.3.2	Präparation chromosomaler DNA aus <i>D. discoideum</i>	68
5.3.3	Verdau mit Restriktionsenzymen	69
5.3.4	Elektrophorese von DNA in Agarosegelen	69
5.3.5	Fragment-Isolierung aus DNA-Gelen	70
5.3.6	„Southernblotting“	72
5.3.7	Radioaktive Markierung von DNA-Proben	73
5.3.8	Hybridisierung mit radioaktiv markierten Proben	74
5.3.9	Isolierung von Gesamt-RNA aus <i>D. discoideum</i>	75
5.3.10	Elektrophorese von RNA in Agarosegelen	76
5.3.11	„Northernblotting“	76
5.3.12	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	77
5.3.13	Oligonukleotide	78
5.3.14	Klonierung von DNA-Fragmenten in Vektor-DNA	79

5.3.15	Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> Zellen für die Elektroporation	81
5.3.16	Transformation von <i>E. coli</i> Zellen durch Elektroporation	81
5.3.17	<i>E. coli</i> Dauerkulturen	82
5.4	Proteinchemische Methoden	82
5.4.1	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	82
5.4.2	Coomassie-Blau-Färbung von Proteinen	83
5.4.3	„Westernblot“	83
5.4.4	Proteinbestimmung	84
5.4.5	Herstellung von <i>D. discoideum</i> Proteinproben	85
5.4.6	Induktion und Reinigung von rekombinanten Proteinen	86
5.4.7	Reinigung von MBP-Fusionsproteinen mit Hilfe einer Amylosesäule	87
5.4.8	Kopplung synthetischer Peptide an Haemocyanin	88
5.4.9	Herstellung und Überprüfung von Antikörpern	88
	Abkürzungen	90
	Lebenslauf	105
	Danksagung	106

Kapitel 1

Zusammenfassung

Im Laufe der Evolution haben bakterielle Erreger und Wirtszellen zum Teil sehr komplizierte Strategien entwickelt, die Infektion zu erleichtern bzw. zu verhindern. Es war das Ziel dieser Arbeit, in einem Modellorganismus Faktoren zu untersuchen, die in Makrophagen als „natürliche Resistenz-assoziierte Proteine“ (Nramp) beschrieben worden waren. Proteine der Nramp-Familie erfüllen in verschiedensten, genetisch zum Teil weit von einander entfernten Organismen wichtige Aufgaben bei der Einstellung von intrazellulären Ionenkonzentrationen. In der vorliegenden Arbeit werden zwei Homologe der Nramp Familie in der Amöbe *Dictyostelium discoideum* untersucht. Das DdNrampA Gen ist 1890 Basenpaare (Bp) lang, während DdNrampB 1713 Bp umfasst und ein 138 Bp langes Intron enthält. Das Vorhandensein beider Gene wurde mittels „Southernblotting“ verifiziert, die Expression sowie deren Regulation zu verschiedenen Zeitpunkten in der Entwicklung von *D. discoideum* wurden durch „Northern“-Analysen untersucht. Unter Verwendung von computergestützten Vorhersagen wurde eine phylogenetische Einordnung der *D. discoideum* Nramp-Homologe in die Nramp-Familie vorgeschlagen. Ebenso wurden die Hydrophobizitätseigenschaften und damit die mögliche Lage der Transmembran-Domänen durch Softwareanalyse untersucht. Durch Klonieren unterschiedlicher Regionen von DdNramp-Proteinen in Expressionsvektoren wurden Teile von DdNramp in *E. coli* überexprimiert und der Versuch unternommen, die Expression des re-

kombinanten Proteins zu optimieren. Zur Herstellung von Antikörpern wurden auch Regionen der DdNramp-Homologe ausgewählt, die in Form synthetisch hergestellter Peptide zur Immunisierung von Kaninchen verwendet wurden. Die erhaltenen Seren wurden durch „Westernblot“ und Immunfluoreszenz auf das Vorhandensein von DdNramp-Antikörpern überprüft.

Die Experimente zeigten eindeutig, dass *D. discoideum* zwei Nramp Gene enthält, die für Proteine mit 12 Transmembrandomänen kodieren. Die Nramp-Homologe in *D. discoideum* sind vor allem in der Vesikelmembran angereichert, was mit ihrer vermuteten Funktion als Ionenporter übereinstimmen würde.

Kapitel 2

Einleitung

2.1 Intrazelluläre Erreger

Um den Abwehrmechanismen des Wirtsorganismus zu entgehen, haben sich Erreger über die Evolution hinweg verschiedenste Strategien zugelegt. Eine Möglichkeit ist die Produktion von Zytotoxinen, die Makrophagen und andere Zellen der Immunantwort in ihrer Funktion beeinträchtigen. Andere Bakterien verändern die Proteine, die auf ihrer Oberfläche exprimiert werden, um so die gegen sie gerichteten Antikörper und damit die humorale Immunreaktion des Wirtes wirkungslos zu machen. Einige Erreger entziehen sich sowohl den spezifischen als auch den unspezifischen Abwehrmaßnahmen, indem sie die Fähigkeit haben, intrazellulär, zum Teil sogar innerhalb der Abwehrzellen des Wirtes zu überleben. Diese Gruppe, zu der z.B. *Salmonella ssp.*, *Mycobacterium ssp.*, *Listeria ssp.* und *Legionella ssp.* gehören, soll hier anhand einiger Beispiele näher vorgestellt werden.

2.1.1 Legionellen

Allgemeines Die zu den gramnegativen, aeroben Bakterien gehörenden Legionellen wurden erstmals im Jahre 1976 beschrieben, als es bei einem Kongress amerikanischer Berufssoldaten zum ersten Ausbruch der deshalb so benannten Legionärskrankheit gekommen war. Der Erreger *Legionella pneumophila*

ruft bei den fast ausschließlich im Rahmen einer Grundkrankheit immunsupprimierten Personen zwei bis zehn Tage nach der Ansteckung eine multifokale, nekrotisierende Pneumonie hervor. Die Letalität beträgt hierbei mehr als 20%, kann sich aber bei einer nosokomialen Infektion auf bis zu 50% steigern [51]. Zumeist kommt die Legionärskrankheit aber als mehr oder weniger große Epidemie vor, da die Übertragung über Aerosole aus keimhaltigem Wasser z.B. aus Sprinkleranlagen, Sprudelbädern, Klimaanlage, Duschen oder anderen künstlichen Wassersystemen erfolgt. Daneben existiert eine weitere durch Legionellen verursachte Krankheit, das Pontiac-Fieber, das Symptome einer nichtpneumonischen, fieberhaften Erkrankung hervorruft, jedoch selbstlimitierend und seltener als die Legionärskrankheit ist [51].

Überleben im menschlichen Wirt *L. pneumophila* wird im Körper zwar von Makrophagen phagozytiert, kann aber die Reifung der Phagozytosevesikel verhindern. Eine Fusion mit Lysosomen und die damit verbundene Absenkung des pH-Wertes findet in diesem Stadium nicht statt, vielmehr umgeben sich die Vesikel mit endoplasmatischem Retikulum und gehen in eine Phase der Replikation über. Zuletzt erfolgt die Fusion der so entstandenen Vesikel mit lysosomalen Vesikeln und die infizierte Zelle geht durch Lyse zugrunde. Dabei werden Legionellen frei, die erneut andere Zellen infizieren können (zusammengefasst in [84]). Nach Bindung durch Komplement und *L. pneumophila*-spezifischen Antikörper können die Makrophagen nur einen kleinen Teil der Erreger abtöten. Innerhalb der Zellen sind die Bakterien dann unabhängig vom vorausgegangenen Kontakt mit Komplement oder Antikörpern in der Lage sich zu teilen [46]. Zur Bekämpfung von oxidativem Stress, wie er durch die von Fresszellen sezernierten reaktiven Sauerstoffspezies entsteht, besitzen die Legionellen verschiedene Enzyme wie z.B. eine zytoplasmatische Eisen-Superoxid-Dismutase (FeSOD), eine periplasmatische Kupfer-Zink-Superoxid-Dismutase und eine periplasmatische Katalase/Peroxidase (KatA) [84].

Am Beginn des eigentlichen Infektionszyklus steht die Aufnahme in die Wirtszelle. Der Komplementfaktor C3, der an das „major outer membrane protein“ (MOMP) von *L. pneumophila* bindet, ermöglicht dabei die Aufnahme über den CR1 und CR3 Rezeptor auf der Makrophagenmembran. Die Aufnahme auf diesem Weg scheint aber eher unbedeutend zu sein, da sich in der Lunge relativ wenig Komplement befindet und *L. pneumophila* auch in der Abwesenheit von Komplement in Makrophagen aufgenommen wird. Es wird daher angenommen, dass ein lipid- oder kohlehydrathaltiges Protein die Bindung über Kohlehydrate auf der Wirtszellmembran vermittelt. Auch über eine Rolle von Typ IV Pili, wie sie auch in Neisserien oder *Pseudomonas aeruginosa* vorkommen, und Hsp60, analog dem in *Haemophilus ducreyi*, *Helicobacter pylori*, *Mycobacterium avium* und *Salmonella typhimurium* wird bei der Adhäsion an die Membran der Wirtszellen diskutiert [1, 32]. Wichtig für das weitere Überleben der Legionellen innerhalb des Makrophagen ist die Verhinderung einer Fusion des Phagosoms mit Lysosomen, die zu einer Ansäuerung und damit verbundenen Lyse der Bakterien führen würde. Die Art und Weise, wie *Legionella* dies erreicht, ist nicht abschließend geklärt, doch finden sich hierfür verschiedene Theorien:

A) Bemerkenswert ist die Bildung von kleinen Tochtervesikeln um das *Legionella*-enthaltende Phagosom, die ihren Ursprung möglicherweise in diesem Vesikel haben und Proteine enthalten könnten, die für die Fusion des Phagosoms mit dem lysosomalen Kompartiment notwendig sind [47].

B) *L. pneumophila* besitzt eine Reihe von Genen, die Ähnlichkeit mit denen eines Typ IV Sekretionssystems haben. Diese Gene werden mit *dot* („defective for organelle trafficking“) und *icm* („intracellular multiplication“) bezeichnet, da Mutationen in diesen loci entweder die typische Isolierung des Phagosoms oder die Vermehrung in der Wirtszelle verhindern. Ursprünglich war das Typ IV System für den Transfer von DNA in andere Zellen zuständig [94, 50]. Der genaue Mechanismus des *dot/icm* Systems ist bis jetzt ungeklärt, jedoch könnte dabei der Export eines noch nicht bekannten Effektors eine Rolle spielen. Außerdem

scheinen die von *dot/icm* codierten membranassoziierten Proteine notwendig zu sein, um Poren in der Membran des Phagosoms zu erzeugen, die die weitere Reifung des Phagosoms verhindern können. Das Toxin selbst, das für die Bildung dieser Poren verantwortlich ist, ist aber ebenfalls noch nicht identifiziert [53].

C) Trotz dieser Ergebnisse gibt es auch Hinweise auf einen von *dot* unabhängigen Mechanismus der Abkopplung des *Legionella* Phagosoms vom üblichen Phagozytoseablauf [50]. Auch die Bildung von Phospholipasen, wie sie in *L. pneumophila* nachgewiesen werden konnten, sowie die Produktion von Lektinen und die Sekretion einer schwachen Base wie Ammoniak könnten die Fusion zwischen Phagosom und lysosomalem Kompartiment blockieren [84].

Im weiteren Verlauf folgt das *Legionella*-Phagosom einem Weg, der interessanterweise dem eines Autophagosoms ähnelt. Es findet eine Assoziation mit Mitochondrien statt und die Vakuole umgibt sich mit endoplasmatischem Retikulum. In dieser Phase vermehrt sich *L. pneumophila*, vermutlich unter Ausnutzung von Nährstoffen in diesem Kompartiment [85]. Die Expression von Proteinen verändert sich, Proteine, die für den Schutz des Phagosoms verantwortlich waren, werden nicht mehr synthetisiert, und es findet schließlich doch eine Fusion mit Lysosomen statt. Die Bakterien sind in diesem Stadium säure-resistent und innerhalb dieses Phagolysosoms metabolisch aktiv [84]. Für die Evasion von *L. pneumophila* aus Makrophagen scheint die Auslösung der Apoptose eine Rolle zu spielen. So finden sich experimentell bei infizierten Zellen eine fragmentierte DNA, ein Abbau der Poly-(ADP-Ribose)polymerase sowie das Erscheinen von Phosphatidylserin auf der Oberfläche der Zellen, Zeichen, die für den Beginn der Apoptose typisch sind [28, 41]. Zu den bakteriellen Toxinen, die für die eigentliche Lyse und damit Nekrose der Wirtszelle notwendig sind, gehören Legiolysin (kodiert von *lly*) sowie Msp (kodiert von *mshA*), eine Zinkmetallprotease. Die Fähigkeit Poren in die Wirtszellmembran einzufügen, ist ebenfalls Bedingung für das Verlassen des Phagolysosoms [4].

Überleben in Amöben *L. pneumophila* ist an den Menschen als Wirt nicht ausreichend angepasst. Es fehlen die für eine Übertragung von Mensch zu Mensch nötigen Pathogenitätsfaktoren, wie sie z.B. *Haemophilus influenzae*, *Bordetella pertussis* oder *M. tuberculosis* besitzen. Eine Infektion des Menschen ist für *Legionella* also eine Sackgasse und für das Überleben der Spezies nicht geeignet. Die Fähigkeit von *L. pneumophila*, in Anwesenheit von menschlichen Monozyten zu überleben, deutet jedoch darauf hin, dass es innerhalb der Entwicklung der Spezies einen Selektionsdruck gegeben haben muss. Da sich die Ausbildung dieser Merkmale wegen der fehlenden Fähigkeit zur Transmission nicht innerhalb eines menschlichen Wirtes abgespielt haben kann, kommen für die Ausübung des Selektionsdrucks vor allem Amöben in Betracht. Tatsächlich ist *L. pneumophila* in der Lage, verschiedene Amöben und auch andere Protozoen zu infizieren. Diese bewohnen genau wie *Legionella* künstliche Wassersysteme und können dort oftmals mit diesen zusammen nachgewiesen werden. Namentlich ist die Vermehrung von *L. pneumophila* innerhalb von *Acanthamoeba*, *Naegleria* und weiteren Amöbenspezies, darunter auch *D. discoideum* bestätigt worden [42]. Neben weitgehenden Gemeinsamkeiten in der Infektion von Protozoen und der von Makrophagen [29] existieren jedoch auch Unterschiede zwischen diesen beiden Wirtssystemen. So zeigt sich beispielsweise eine Mutante für das *rpoS*-Gen als infektiös für *A. castellanii*, nicht jedoch für Makrophagen. Es wurde daneben eine Gruppe von Genen, benannt *mil* („macrophage-specific infectivity loci“) beschrieben, die ebenfalls für die Infektion von Makrophagen notwendig ist, nicht jedoch für die von Amöben [30]. Eine Mutation in *lspGH* (kodiert für ein Protein eines Typ II Sekretionssystems) führt dagegen zu abgeschwächter Virulenz in *A. castellanii*, nicht aber in Makrophagen. Weiterhin konnte bis jetzt bei der Infektion von Amöben keine Induktion des Zelluntergangs durch Apoptose beobachtet werden, wie er bei Makrophagen auftritt [41].

2.1.2 Listeria

Listeria monocytogenes ist ein aerob wachsendes, peritrich begeißeltes Stäbchen. Bei Infektion des Menschen ruft es bei immunkompetenten Personen entweder keine oder lediglich grippeähnliche Symptome hervor. Es kann bei Immunsupprimierten jedoch zur Ausbildung einer Sepsis und/oder Meningoenzephalitis führen. Bei Schwangeren kann eine Infektion zur Entwicklung einer konatalen Listeriose führen, bei der der Fetus durch Sepsis und Bildung multipler Abszesse und Granulome gefährdet wird und die letztlich zum Abort führen kann. Listerien kommen in der Umwelt ubiquitär vor, eine Ansteckung mit höherer Keimzahl kann jedoch auch über kontaminierte Nahrungsmittel erfolgen [51]. Wie *L. pneumophila* kann auch *L. monocytogenes* Makrophagen infizieren und sie nutzen, um sich in ihnen zu vermehren. *L. monocytogenes* ist jedoch auch in der Lage nicht-phagozytierende Zellen z.B. in Gehirn, Plazenta und Leber zu infizieren und dabei epitheliale Barrieren zu überwinden (zusammengefasst in [15]).

Die Infektion beginnt mit der Aufnahme durch Phagozytose im Falle von Phagozyten oder induzierter Phagozytose bei normalerweise nicht-phagozytierenden Zellen. Dieser Prozess wird durch zwei Proteine von *L. monocytogenes* ausgelöst, Internalin A (InlA) und Internalin B (InlB). Je nach infizierter Zelllinie sind dabei InlA, InlB oder beide zusammen zum Eindringen in die Wirtszelle notwendig. Internalin A bindet an das Protein E-Cadherin und ist damit in der Lage, die Phagozytose in nicht-phagozytierenden Zellen auszulösen. E-Cadherin findet sich im basolateralen Anteil von Epithelzellen an den sogenannten „Zonae adhaerentes“ und spielt eine Rolle bei der Polarisierung, der Differenzierung und Interaktion von Zellen untereinander. Über die weiteren Signaltransduktionsschritte und Mechanismen der InlA vermittelten Aufnahme ist jedoch wenig bekannt [61, 76]. InlB hat eine ähnliche Struktur wie InlA, beide besitzen Leucin-reiche repetitive Sequenzen („Leucin-rich-repeats“: LRRs; 8 LRRs in InlB und 15 LRRs in InlA). InlB bindet an gC1q-R/p32, den Re-

zeptor für die globuläre Domäne des Komplementfaktors C1q. Dieser Rezeptor besitzt aber keine Merkmale eines Transmembran- oder Glykosyl-PI (GPI) verankerten Proteins und scheint deshalb als alleiniger Rezeptor fraglich [61, 76]. Als weiterer Rezeptor für InlB an Säugetierzellen wurde Met identifiziert, der Rezeptor für HGF („hepatocyte growth factor“). Die Bindung an den Liganden führt zu Autophosphorylierung von Met, der Aktivierung von p85/p110 PhosphoInositol-3-kinase (PI3-kinase) sowie zur Tyrosin-Phosphorylierung von Gab1 und Cbl. Die genauen Mechanismen der Aufnahme von *L. monocytogenes* und die Beziehung zwischen gC1q-R/p32 und Met sind jedoch noch unklar [76]. Die Lipide PI(3,4)bisphosphat und PI(3,4,5)trisphosphat, die bei der Aktivierung von p85/p110 entstehen, sind jedoch „second messenger“, wie sie bei Endozytoseprozessen zu finden sind, und könnten über weitere Zwischenschritte zur Aufnahme von *L. monocytogenes* beitragen [15, 48]. Einmal innerhalb der Zelle, verlässt *L. monocytogenes* das Phagosom nach ca. 30 min. Zur Lyse der Membran des Phagosoms dient dabei Listeriolysin O (LLO), ein sezerniertes, Poren-induzierendes Protein. Nach Erreichen des Zytosols beginnt *L. monocytogenes* mit der intrazellulären Teilung und vermag sich innerhalb der Zelle zu bewegen [14]. Verantwortlich dafür ist vor allem das bakterielle Protein ActA. Es induziert die Aktivierung einer Reihe von Proteinen des Wirtes, die für die Regulation des Zytoskeletts notwendig sind. ActA kann an G-Aktin binden und zusammen mit dem Arp2/3-Komplex des Wirtes F-Aktin polymerisieren. Damit ähnelt es in seiner Funktion und Wirkung den Proteinen der WASP- („Wiscott-Aldrich Syndrom Protein“) Familie der Säuger. ActA bindet mit seiner zentralen, Prolin-reichen Domäne außerdem an VASP („vasodilator-stimulated phosphoprotein“). VASP wird durch cGMP und cAMP abhängige Kinasen phosphoryliert und ist in der Lage, Profilin, ein G-Aktin bindendes Protein, zu rekrutieren. Damit stellt es dem Arp2/3 Komplex indirekt G-Aktin zur Polymerisierung zu F-Aktin zur Verfügung. Daneben sind aber auch α -Actinin, Cofilin/ADF, Vinculin, Villin, Talin und Fimbrin an der Bewegung

von *L. monocytogenes* beteiligt [14, 56]. *L. monocytogenes* ist im Rahmen dieser Bewegung auch in der Lage Protrusionen der Zellmembran zu erzeugen, die bis in benachbarte Zellen reichen. Das Bakterium sitzt dann innerhalb eines Zellausläufers, umgeben von einer doppelten Zellmembran. Um dieses Vesikel zu verlassen, benötigt *L. monocytogenes* genau wie beim primären Phagozytosevesikel LLO sowie zusätzlich eine Phospholipase (PLCB) [34]. LLO besitzt aber auch die Fähigkeit, MAP-Kinasen zu stimulieren, die Apoptose und Proteine der Zell-Zellhaftung in Wirtszellen zu induzieren, sowie NF- κ B in den Zellkern zu verlagern. Bei der Aktivierung von NF- κ B ist auch InI_B, das primär die Aufnahme in Zellen reguliert, beteiligt [15, 14].

2.1.3 Mycobakterien

Zur Gattung Mycobakterium gehören mehrere für den Menschen pathogene Spezies, darunter *M. tuberculosis*, *M. leprae*, *M. bovis* und *M. avium*. Durch die Zunahme von immunsupprimierten Patienten, die an der Immunschwäche AIDS leiden, und dem gehäuften Auftreten von medikamenten-resistenten Stämmen gewinnen Infektionen mit Mycobakterien in den letzten Jahrzehnten wieder an Bedeutung. Man geht davon aus, dass ca. ein Drittel der Erdbevölkerung mit *M. tuberculosis* infiziert ist, wenn auch nur bei ca. 5% die Krankheit Tuberkulose tatsächlich ausbricht [69]. Eine *M. tuberculosis*-Infektion äussert sich meist in einer auf die Lunge beschränkten granulomatösen Entzündung, die bei geschwächter Abwehrlage aber disseminieren oder sich auf andere Organe ausdehnen kann. *M. leprae* ruft vor allem Läsionen an Haut, Schleimhäuten und Nervenscheiden hervor, die zu den typischen Hautveränderungen und Nervenlähmungen führen [51].

Die Immunreaktion des Menschen wird charakterisiert durch die Aktivierung von Natürlichen Killerzellen, TH₁-Helferzellen und Makrophagen mit Ausschüttung der Interleukine 2, 12 und IFN γ . TNF α spielt eine entscheidende Rolle bei der Abwehr der Infektion und der Ausbildung der Symptome der

Tuberkulose (Gewichtsverlust, Fieber, Gewebsläsionen) [69]. Obwohl Mycobakterien fähig sind, praktisch alle Gewebearten zu infizieren, finden auch sie in menschlichen Makrophagen eine Nische, die sie vor der humoralen Abwehr des Wirtes schützt und in der sie sich vermehren können. Ähnlich wie bei *L. pneumophila* sind Komponenten des Komplementsystems an der Aufnahme von pathogenen Mycobakterien beteiligt. Neben der im Rahmen der natürlichen Immunreaktion vorkommenden Opsonierung, besitzt *M. avium* einen alternativen Weg zur Bereitstellung von Komplementfaktoren:

Der aktivierte Faktor C2a lagert sich an *M. avium* an und bildet eine C3-Konvertase, die den Faktor C3 in zwei Bruchstücke, C3a und C3b spaltet. So entstandenes C3b bindet kovalent an Moleküle an der Bakterienmembran und ermöglicht die Phagozytose über CR1 Rezeptoren der Makrophagen [73, 23]. Auch eine Beteiligung von Cholesterin in der Zellmembran der Wirtsmakrophagen ist beschrieben worden. Am Ort der Entwicklung des Phagosoms ist Cholesterin dabei stark angereichert, und eine pharmakologische Reduzierung des Cholesterinanteils in der Zellmembran führt zu einer bis zu 85%-igen Reduktion der Infektion durch *M. bovis* und *M. tuberculosis*. Die glykolipidreiche Zellwand der Mycobakterien könnte für diese Reaktion verantwortlich sein. Cholesterin ist zwar zur Aufnahme von Mycobakterien notwendig, jedoch ist die so gesteuerte Aufnahme von der durch den Rezeptor für Komplementfaktor 3 vermittelten unabhängig [33]. Auch von Mannose-Rezeptoren, die mannosylierte Strukturen auf der Membran binden, Fc-Rezeptoren, die IgG opsonierte Bakterien erkennen und Scavenger-Rezeptoren konnte gezeigt werden, dass sie bei der Infektion von Makrophagen beteiligt sind [7, 65, 23]. Entscheidende Bedeutung für die erfolgreiche Infektion und das Überleben in den Fresszellen hat für Mycobakterien die Fähigkeit, die Ansäuerung des mycobakteriellen Phagosoms zu verhindern. Zu diesem Zweck verhindern Mycobakterien die Fusion des Phagosoms mit dem lysosomalen Kompartiment, nachweisbar durch die fehlende Anreicherung von spät-endosomalen und lysosomalen Markern wie LAMP1

und β -Hexoaminidase [44]. Die Aktivität des ATP-abhängigen Protonentransporters ist in *M. avium*-enthaltenden Phagosomen im Vergleich zu anderen Phagosomen herabgesetzt, wenn auch noch nachweisbar, was zu einer niedrigeren Azidität bzw. einem entsprechend höheren pH führt [82]. Analyse der Proteine der mycobakteriellen Phagosomen hat ergeben, dass sich hier Rab5, nicht jedoch Rab7 befindet. Rab5 ist ein Marker für frühe Endosomen, während Rab7 sich auf der Membran später Endosomen befindet und als GTPase an der Regulation von Fusionsprozessen während der Entwicklung von Phagosomen beteiligt ist. Dies spricht für eine Behinderung der Phagosomenreifung auf der Stufe zwischen frühem und spätem Endosom [92]. Die Inhibierung der Fusion von Lysosom und Phagosom wird durch TACO („Tryptophan Aspartat-Containing Protein“) vermittelt, ein Makrophagenprotein auf der Oberfläche von Phagosomen, das mehrere WD repeats enthält. TACO wird an die Membran des entstehenden Phagosoms rekrutiert, wo lebende, virulente Mycobakterien in der Lage sind, dieses Molekül zu halten, während es von Phagosomen mit toten Mycobakterien abdiffundiert und die Fusion mit Lysosomen erlaubt [65]. An der Anreicherung von TACO am entstehenden Phagosom scheint das Cholesterin der Wirtszelle beteiligt zu sein, da sein Fehlen zu einer ausbleibenden TACO-Anreicherung führt [33]. Hinweise auf die Wichtigkeit von TACO bei der Isolierung des Mycobakterienphagosoms gibt auch die Tatsache, dass die Kupffer-Zellen der Leber, die Mycobakterien erfolgreich abtöten können, kein TACO exprimieren [65]. Wie für *L. pneumophila* konnte gezeigt werden, dass auch Mycobakterien fähig sind, Amöben zu infizieren. *M. avium* gelangt in die Zelle und kann sich innerhalb einer Vakuole, die nicht mit Lysosomen fusioniert, teilen. Die Infektion von *A. castellanii* erhöht dabei sogar die Virulenz von *M. avium* sowohl in vitro für menschliche Makrophagen als auch im Mausmodell [12].

2.2 Natural Resistance Associated Protein (Nramp)

2.2.1 Nramp in Säugetieren

Auf der Suche nach Determinanten für die Immunität gegenüber intrazellulären Erregern auf molekularer Ebene fand man bereits in den siebziger Jahren Orte auf dem Genom von Mäusen, die an der Abwehr von Erregern der Gattung *Leishmania*, *Salmonella* und *Mycobakterium* beteiligt waren. Dieser Locus wurde als *bcg*, *lty* und *lsh* benannt und auf Chromosom 1 lokalisiert. Das Resistenz vermittelnde Allel wird mit Bcg^r („resistant“), das für eine größere Empfänglichkeit für Erreger stehende Allel mit Bcg^s („susceptibility“) bezeichnet [37]. Als mögliches Produkt dieses Locus wurde durch „positional cloning“ ein ca. 56 KDa großes Protein gefunden, das Nramp1 („Natural Resistance-Associated Macrophage Protein“) benannt wurde. Es besitzt voraussichtlich 12 transmembranale (TM) Domänen, eine glykosylierte extrazytoplasmatische Domäne zwischen TM 7 und 8, ein mögliches Phosphorylierungsmotiv und zeigt strukturelle Merkmale eines Ionenkanals. Bei weiterer Analyse des Gens wurde außerdem ein sogenanntes „binding-protein-dependent-transport system inner membrane component signature“ Motiv beschrieben, das in bakteriellen ATPasen für die Bindung des peripheren ATP-bindenden Abschnitts mit den Membrananteilen des Transporters verantwortlich ist [11]. Beim Menschen wurden Polymorphismen von NRAMP1 mit einer größeren Empfänglichkeit für Tuberkulose- und Leprainfektionen in Verbindung gebracht. Nramp1 mRNA wird fast ausschließlich in Zellen der monozytären und granulozytären Linie gebildet, ist aber beim Menschen auch in der Milz, Leber und Lunge nachweisbar [27]. In Experimenten mit Makrophagen konnte gezeigt werden, dass IFN- γ und LPS (Lipopolysaccharid) die Expression von Nramp1 induzieren [6]. Nramp1 wird im Anschluss an die Phagozytose entlang des tubulären Netzwerkes von der Kernregion an die Membran des Phagosoms rekrutiert. Dort ist Nramp1 in Vesikeln zu finden, die positiv für LAMP1, einem Marker für späte Endosomen/Lysosomen

[74, 38], und nach Meinung einiger Autoren auch positiv für Kathepsin L und D sind, beides Marker für Lysosomen [74]. Analyse der Sequenz des Nramp1 Gens von Mäusen, die für die Infektion mit verschiedenen Mycobakterien empfänglicher waren als vergleichbare Maus-Stämme, zeigte, dass eine einzige Punktmutation Gly169Asp in TM4 für die vermehrte Empfindlichkeit verantwortlich war [27]. Auch auf zellulärer Ebene konnte gezeigt werden, dass Nramp1 für die Fähigkeit, intrazelluläre Erreger abzutöten notwendig ist. So ist *M. avium* in Nramp1^{-/-} Zellen in der Lage, sich um den Faktor 10⁸ besser zu vermehren als in Nramp1^{+/+}-Zellen (gemessen an der Zunahme von „colony forming units“: CFUs). Auch wurde in Nramp1^{+/+}-Zellen eine vermehrte Fusion von *M. avium* Phagosomen mit Lysosomen beobachtet, die in Nramp1^{-/-} ausblieb [27]. Funktionsfähiges Nramp1 ist an der Ansäuerung des Phagosoms beteiligt, die wichtig für Erzeugung eines bakteriziden Milieus in diesen Vesikeln ist. Phagosomen aus Nramp1^{-/-} Zellen haben einen pH von $6,6 \pm 0,05$, während Nramp1^{+/+} Phagosomen den pH bis auf $5,5 \pm 0,06$ absenken können. Beteiligt an dieser stärkeren Ansäuerung ist eine vermehrte Fusion mit endo-/lysosomalen Vesikeln, die in ihrer Plasmamembran eine H⁺-ATPase besitzen [40].

Die strukturellen Merkmale von Nramp1 weisen auf eine primäre Funktion als Ionenkanal hin (siehe Abbildung 2.1). Die genaue Bedeutung von Metallionen wie Fe²⁺ bei der Infektion konnte noch nicht abschließend geklärt werden. Von Gomes *et al.* wird berichtet, dass ein Überschuss an Eisen die Fähigkeit von Bcg^r Mäusen, eine *M. avium* Infektion zu beherrschen, abschwächt [35]. Dagegen führt eine künstliche Eisenspiegelanhebung auf 0.005-0.05 μM in Versuchen von Zwilling *et al.* zu einer verringerten intrazellulären Vermehrung von *M. avium* in Bcg^r Makrophagen, während dieses Milieu das Wachstum in Bcg^s Makrophagen eher stimuliert [100]. Über die Richtung eines möglichen Transports von divalenten Kationen über eine Plasmamembran hinweg gibt es gegensätzliche Theorien:

Einerseits wurde ein Import von Eisen in das Phagosom beschrieben, verbun-

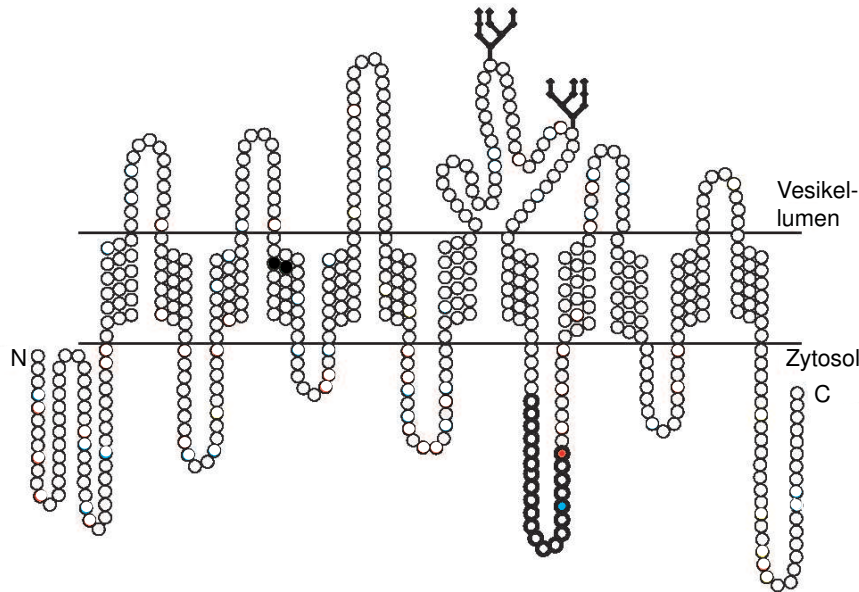


Abbildung 2.1: Darstellung der Struktur von Nramp1 (nach [39]). Das „consensus transport motif“ ist dick gedruckt, die symbolisch dargestellten Zuckerreste entsprechen glykosylierten Aminosäuren. Die schwarz ausgefüllten Kreise geben die Aminosäuren an, die für den *Bcg^s*-Phänotyp bzw. den Defekt der Belgrade Ratte verantwortlich sind. Die Position von N- und C-Terminus ist angegeben, beide liegen intrazytoplasmatisch.

den mit verstärkter Bildung von Hydroxylradikalen. Diesem Modell zufolge soll das im Phagosom zusätzlich vorhandene Eisen über die Fenton/Haber-Weiss-Reaktion zur Bildung reaktiver O_2 -Spezies führen, die zur Bekämpfung der intrazellulären Erreger beitragen [35]. Andererseits konnte eine andere Gruppe zeigen, dass Nramp1^{+/+} Makrophagen Mn^{2+} Ionen schneller aus einem künstlich mit Mn^{2+} angereicherten Phagosom eliminieren können als Nramp1^{-/-} Makrophagen. Dieser beschleunigte Efflux ist abhängig von der Rekrutierung und Funktion der H^+ -ATPase an der phagosomalen Membran [49]. Hinweise auf eine breitere Substratspezifität bringt ein ebenfalls in Säugetieren vorkommendes Homolog von Nramp1, Nramp2.

Nramp2 wird im Gegensatz zu Nramp1 in einer ganzen Reihe von Geweben exprimiert, vor allem aber in Duodenum und Niere. Das Nramp2/DCT1 der Ratte besitzt wie Nramp1 die Merkmale eines Ionenkanals und ist in der La-

ge, mehrere divalente Kationen wie Zn^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Cd^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} und Pb^{2+} , nicht aber Mg^{2+} oder Ca^{2+} in die Zelle hinein zu transportieren, wobei der Transport sowohl abhängig von einem Protonengradienten als auch dem Membranpotential ist. Der Transport erfolgt als Symport mit H^+ -Ionen und nutzt diesen als Energiequelle [39]. Nramp2 befindet sich im Duodenum auf dem Bürstensaum der Dünndarmzotten und existiert in zwei Isoformen, die durch alternatives Splicing entstehen können. Das C-terminale Ende der RNA der Isoform I ist verschieden von dem der Isoform II und enthält zusätzlich in ihrer 3' untranslatierten Region ein IRE („iron response element“), das durch Bindung an spezielle Proteine die Stabilität und Translation der mRNA reguliert. Nramp2 Isoform I wird unter Bedingungen eines Eisen-Mangels sowohl im proximalen Duodenum als auch in der Niere verstärkt exprimiert [9]. Bei zwei mutierten Rattenstämmen, der „Belgrade“ b-Ratte und der mk-Ratte, findet sich eine identische Mutation des Nramp2 Kanals in Form einer „missense“ Mutation G185R, die zu fehlender Kanalfunktion und bei beiden Stämmen zu einer mikrozytären Anämie führt. Nramp2 gilt daher als das bedeutendste Transferrin-unabhängige Eisenabsorptionssystem des Darms [26]. Nramp2 wird auch in Zellen außerhalb des Darms exprimiert und ist innerhalb dieser Zellen sowohl auf frühen endosomalen Vesikeln zusammen mit Transferrin als auch in geringem Maße auf der Zellmembran lokalisiert. Aufgrund dieser Kollokalisierung wird eine Beteiligung am Export von Eisen aus Phagosomen diskutiert. Fe^{3+} wird im Blut gebunden an Transferrin transportiert und via eines Transferrinrezeptors auf der Zellmembran in die Zelle aufgenommen. Innerhalb der Phagosomen löst sich Eisen von Transferrin, nachdem durch die Fusion mit Lysosomen ein saurer pH erreicht ist. Fe^{3+} wird anschließend im Phagolysosom durch Reduktasen zu Fe^{2+} reduziert und aus den Vesikeln heraustransportiert [36]. Wie Nramp1 wird auch Nramp2 in mit *M. avium* infizierten Zellen vermehrt exprimiert, wogegen die Expression von mRNA für den Transferrin-Rezeptor bei Infektion abnimmt [99].

2.2.2 Nramp in anderen Organismen

Neben den Nramp Homologen in verschiedenen Säugetieren konnten auch in anderen, zum Teil evolutiv sehr weit entfernten Organismen Proteine der Nramp Familie nachgewiesen werden. Der Grad der Konservierung ist dabei erstaunlich hoch. Nramps von *Oriza sativa* (OsNramp1) und *Drosophila melanogaster* (Mvl) z.B. zeigen eine Identität von 40.1% bzw. 54.9% der Aminosäuren zu Nramp1 in Säugern [11]. In der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* existieren drei Gene der Nramp-Familie, *smf1*, *smf2* und *smf3*. Die Produkte dieser drei Gene sind alle am Transport divalenter Kationen beteiligt, sind aber innerhalb der Zelle unterschiedlich verteilt und werden unterschiedlich reguliert. Smf1p und Smf2p sind an der Akkumulation von intrazellulärem Mangan beteiligt und werden von Mn^{2+} Ionen und dem *bsd2* Genprodukt reguliert. Smf1p findet sich an der Zelloberfläche, während Smf2p auf intrazellulären Vesikeln lokalisiert ist. Smf3p ist bei hohen intrazellulären Eisenspiegeln vermindert nachweisbar, während es von Mn^{2+} und Bsd2p unabhängig ist. Smf3p befindet sich unabhängig von der Eisenkonzentration auf der Membran der Vakuole [67]. Trotz der großen evolutiv Entfernung der Organismen ist die Aminosäurefolge der Smf Proteine der Hefe zu etwa 26% identisch mit der von humanem Nramp2. Die Ähnlichkeit auf Ebene der Aminosäureabfolge spiegelt sich auch in einer ähnlichen Funktionalität wieder. So ist Nramp2 in der Lage, den Phänotyp einer *smf1p/smf2p* Mutante von *S. cerevisiae* aufzuheben, die auf mit Chelatoren versehenem Medium nicht wachsen kann [66]. *Arabidopsis thaliana* exprimiert sechs verschiedene Nramp Proteine, AtNramp1-6. Expression von AtNramp1, 3 oder 4 in einem mutierten Hefestamm, der einen Eisenaufnahmedefekt besitzt, kann diesen beheben. Überexpression dieser Gene führt zu einer erhöhten Empfindlichkeit gegenüber Kadmium, einem Spurenelement, das auf Pflanzen toxisch wirkt. Unter Eisenmangel wird die Produktion von AtNramp1, 3 und 4 erhöht, die von AtNramp2 dagegen nach unten reguliert. Ein

IRE wie bei DCT1/Nramp2 in Säugern wurde dagegen bei *A. thaliana* nicht gefunden [89, 16].

Einen interessanten Phänotyp, nämlich die Änderung des Fress- bzw. Geschmacksverhaltens zeigt die Ausschaltung des *malvolio* Gens (*mvl*) bei *D. melanogaster* [17]. Veränderung des Fress-/ Geschmacksverhaltens von *D. melanogaster* kann Hinweise auf die Gehirn- bzw. Neuronenfunktion als Ganzes geben. *mvl* wird diesem Phänotyp entsprechend nicht nur auf Makrophagen, sondern auch auf Neuronen des peripheren und zentralen Nervensystems gefunden. Überexpression von menschlichem Nramp1 war genau wie die Substitution von Fe^{2+} und Mn^{2+} Ionen in der Lage das geänderte Verhalten von *D. melanogaster* aufzuheben. Auch diese Erkenntnisse zeigen die über die Evolution konservierte Funktionalität von Nramp als Kanal für divalente Kationen.

Zu Nramp homologe Proteine konnten auch in verschiedensten Prokaryonten gefunden werden [10]. Sowohl *E. coli* als auch *S. enterica ssp. typhimurium* besitzen ein Protein MntH („ H^+ coupled manganese transport“), das eine ca. 35%-ige Identität mit dem Nramp von Säugetieren zeigt. *P. aeruginosa* besitzt zwei MntH Homologe. Wie der Name impliziert, ist MntH in *E. coli* und *S. typhimurium* für den Transport von Mangan in die Bakterienzelle notwendig und stellt das einzige System für die Aufnahme dieses Ions in *E. coli* und *S. typhimurium* dar [52]. Der durch MntH vermittelte Transport ist nur durch Kadmium in physiologischen Konzentrationen ($K_i = 1\mu\text{M}$) hemmbar, während die Konzentrationen der K_i von Fe, Ni, Cu, Zn oberhalb von $100\mu\text{M}$ liegen und damit wohl in vivo keine Rolle spielen. Die Aktivität von MntH ist wie die der Nramps aus Säugetieren pH-abhängig und steigt mit der Konzentration an H^+ -Ionen im umgebenden Medium. Die Expression wird von der Konzentration an Sauerstoffradikalen und der Anwesenheit von Metallionen geregelt. Mn^{2+} ist Kofaktor der Superoxid-Dismutase (MnSOD), die für die Elimination von Superoxidmolekülen ($\cdot\text{O}_2^-$) notwendig ist. Das *mntH*-Gen besitzt eine Konsensus Bindungsstelle für das *fur* Repressor-Gen, das von Fe und Mn akti-

viert wird und die Transkription eisenabhängiger Proteine steuert [52]. Auch für *M. tuberculosis* wurde ein Nramp Homolog *mramp* beschrieben. Injektion von *mramp* mRNA erhöht die Aufnahme von Eisen und Zink in *Xenopus laevis* Oozyten, ein Prozess, der wie bei anderen Nramp-Homologen von einem sauren pH abhängig ist. Mangan- und Kupferionen inhibieren den Transport und sind somit auch ein mögliches Substrat für den Transport mittels Mramp [3].

2.3 *Dictyostelium discoideum* als Modellsystem

D. discoideum ist eine Amöbe, die in der Wildnis bevorzugt in den obersten Humusschichten des Bodens lebt, wo sie sich von Bakterien und Hefezellen ernährt. Unter Laborbedingungen gelingt die Anzucht relativ großer Mengen von Amöben aber auch in nährstoffhaltigem Medium in Schüttelkultur oder auf mit *Klebsiella aerogenes* bewachsenen Nähragarplatten. Unter Nährstoffmangel ist *D. discoideum* in der Lage, sich zu einem mehrzelligen Organismus zu entwickeln. Mittels eines cAMP-Signales bewegen sich etwa 100.000-150.000 Zellen aufeinander zu und bilden ein Pseudoplasmodium, den sog. „slug“. Innerhalb dieses Organismus differenzieren sich die Zellen zu zwei unterschiedlichen Zellarten, den Prä-Stiel- und den Prä-Sporenzellen. Dieses mehrzellige slug-Stadium kann sich in Richtung einer Lichtquelle oder eines Temperaturgradienten bewegen, um z.B. bessere Nahrungsbedingungen zu finden. Alternativ kann der Entwicklungszyklus aber fortgesetzt werden, indem sich die Zellen zu Sporen und Stielzellen differenzieren. Es kommt zur Aufrichtung des slugs und der Ausbildung eines sporenhaltigen Fruchtkörpers, der nun den Stielzellen aufsitzt. Die Sporenzellen aus dem Fruchtkörper werden freigesetzt und können unter geeigneten Bedingungen wieder zu einzelligen Amöben auskeimen und weiterleben. Unter Laborbedingungen dauert ein solcher Entwicklungszyklus ca. 24 h (zusammengefasst in [63]).

D. discoideum ist ein haploider Organismus und besitzt ein ca. 34 Megabasen umfassendes Genom auf sechs Chromosomen. Das Genom ist mit

ca. 77% A+T sehr AT reich und mit ca. 3KB/Gen auch sehr kompakt. Dank des *Dictyostelium*-Genomprojektes sind im Moment 90% der Gene sequenziert und auf die Daten kann über die Internetseite des Projektes (<http://www.uni-koeln.de/dictyostelium>) zugegriffen werden [22]. Da sich *D. discoideum* durch Phagozytose von Bakterien ernährt und durch sein dynamisches Zytoskelett hoch beweglich ist, kann es als Modellorganismus für menschliche Leukozyten dienen [20]. Die Prozesse bei der Partikel- und Flüssigkeitsaufnahme sind zum Verständnis der Pathogen-Wirtsinteraktion von besonderem Interesse. An ihnen ist bei *D. discoideum* als wichtiger Faktor unter anderem das Zytoskelett beteiligt [70]. Aktin polymerisiert in der Umgebung des sich bildenden Phagosoms und entstehendes F-Aktin (Filamentäres Aktin) wird für die Bildung von Membranprotrusionen, die den Partikel umschließen benötigt. Proteine, die die Polymerisation von Aktin regulieren, sind demzufolge ebenfalls für korrekt ablaufende Phagozytose notwendig. Zu ihnen gehören ABP-120 (Dd-filamin), ein Aktin-vernetzendes Protein, Coronin, sowie das Aktin-bindende DAip1. Eine Mutation der Profilin-Gene führt in *D. discoideum* zwar zu einer verminderten Makropinozytose und Flüssigkeitssezernierung, jedoch interessanterweise zu einer Zunahme der Phagozytose um den Faktor zwei [88]. Scar ist als ein Mitglied der WASp Familie ebenfalls in die Steuerung der Aktinpolymerisation involviert, indem es den Arp2/3 Komplex rekrutieren bzw. aktivieren kann. Eine Deletion im *scar*-Gen führt zu einem verringerten Gehalt an F-Aktin in der Zelle sowie einer geringeren Phagozytose- und Pinozytoserate [75]. Auch Ausschaltung von Talin, einem Protein, das das Aktin-Zytoskelett mit der Zellmembran verbindet, führt zu einer geringeren Phagozytoseaktivität im Vergleich zum Wildtyp [70]. Proteine aus der Gruppe der „kleinen G-Proteine“ spielen eine Rolle bei der Internalisierung von Flüssigkeiten und Partikeln ebenso wie bei der Regulierung des Weges der Vesikel innerhalb der Zelle. Dazu gehören neben Ras und Rac auch die Familie der Rho-Proteine (zusammengefasst in [70]). Rab7, ein Mitglied der Rab-Proteine, kontrolliert die Aufnahme und Sezernie-

rung von Flüssigkeit, Retention lysosomaler Proteine sowie die Phagozytose. Rab7 lässt sich in *D. discoideum* auf der Oberfläche sowohl früher als auch später Endosomen nachweisen. Wird dominant negatives Rab7 in Zellen exprimiert, führt dies zu einer fehlenden Anreicherung von lysosomalen Markern an den Phagosomen [71]. Phospholipase C (PLC), die PIP_2 in die „second messenger“ DAG und IP_3 spaltet, ist ebenfalls für die Phagozytose in *D. discoideum* notwendig. Über die genauen Ziele dieser Signalkaskade herrscht jedoch noch keine Klarheit. Im Unterschied zu Säugetierzellen zeigt jedoch die Phagozytose bei *Dictyostelium* keine Abhängigkeit von PI3-Kinasen, die PIP_2 zu PIP_3 phosphorylieren [70]. Sowohl die Organisation und Funktion des Zytoskeletts als auch die Vorgänge bei Phagozytose sind bei *D. discoideum* gut erforscht [63, 70]. *D. discoideum* lässt sich darüber hinaus leicht in größeren Mengen in Schüttelkultur heranziehen und ist als haploider Organismus durch eine große Anzahl von Techniken leicht gentechnisch zu verändern. Dazu zählen: Homologe Rekombination, Antisense RNA-Strategien, REMI („restriction-enzyme-mediated integration“), „transposon-tagging-like“ Mutagenese und die Expression von GFP-Fusionsproteinen [63]. Zusammen mit ersten Versuchen zur Infektion von *D. discoideum* mit pathogenen Bakterien [42] macht dies *Dictyostelium* zu einem interessanten Modellorganismus für das Verständnis von Interaktionen zwischen Pathogenen und ihren Wirtszellen.

2.4 Ziel der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit sollte es sein, die Existenz von Proteinen der Nramp-Familie in *D. discoideum* nachzuweisen. Die Eigenschaften der *Dictyostelium* Nramp-Homologe sollte auf DNA- und Aminosäureebene theoretisch überprüft werden. Mittels der Erzeugung von DdNramp-GFP Fusionsproteinen sollte die genaue Lokalisierung der Nramp-Proteinen in der *Dictyostelium*-Zelle nachgewiesen werden. Für die Herstellung von Antikörpern sollten Teile von DdNramp bzw. vollständige DdNramps rekombinant in Bakterienzellen überexprimiert und zur Immunisierung von Kaninchen verwendet werden.

Kapitel 3

Ergebnisse

3.1 Analyse der Nramp-Sequenzen

3.1.1 Identifikation zweier Nramp Homologe in *D. discoideum*

Vor vier Jahren konnte *D. discoideum* als Modell für die Infektion mit intrazellulären Erregern erstmals etabliert werden [42]. Da Nramp-Proteine, die an der Abwehr intrazellulärer Erreger wie *Leishmania*, *Legionella* und *Mycobakteria* beteiligt sind, in einer Vielzahl von Organismen nachgewiesen werden konnten, wurde das Vorhandensein eines solchen Nramp-Homolges auch in *D. discoideum* untersucht. Durch Vergleich des menschlichen Nramp1 mit den Datensätzen der *D. discoideum* Genomdatenbank in Jena, konnten mehrere Bruchstücke von *D. discoideum* DNA identifiziert werden, die hohe Homologie (>75%) zu HsNramp1 haben (siehe Abbildung 3.1). Durch passendes Aneinanderfügen der homologen *D. discoideum* DNA Sequenzen mittels der Programme GELMERGE und GELASSEMBLE des GCG (Genetics Computer Group)-Programmpaketes wurde eine zusammenhängende Konsensussequenz geschaffen. Dabei zeigte sich, dass zwei unabhängige Gene mit hoher Homologie zu HsNramp1 im Genom von *D. discoideum* auf Chromosom 2 vorhanden sind, die im folgenden mit DdNrampA und DdNrampB bezeichnet werden. Zur Aufklärung der 5' und 3' Enden der identifizierten Genabschnitte wurden diese erneut mit den Datensätzen der Jena-Genomdaten durch Verwendung von BLAST verglichen und die erhaltenen DNA-Abschnitte an die Konsensussequenzen an-

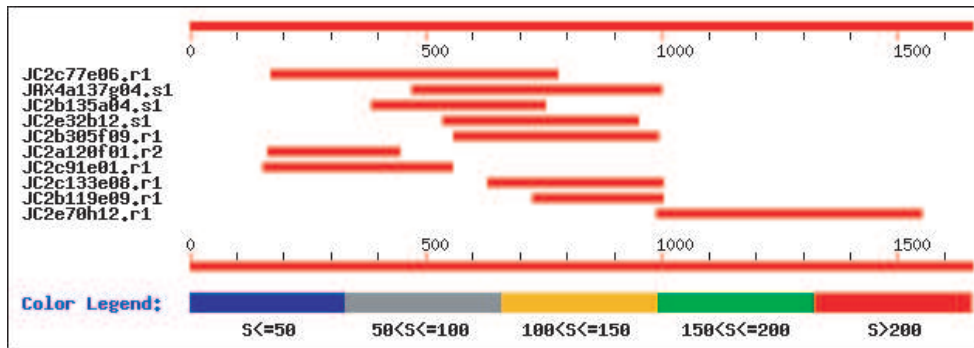


Abbildung 3.1: Graphische Darstellung des Ergebnisses einer BLAST-Suche (TBLASTX) mit der *Nramp1*-DNA Sequenz aus *Homo sapiens* gegen die *D. discoideum* Datenbank des GSC Jena. Die Länge der Fragmente wird in Basenpaaren angegeben. Die Farbwerte codieren für die programmintern vergebenen S-Werte. Hohe S-Werte sprechen für eine hohe Signifikanz der Homologie.

gehängt. Die Lokalisation der Start- und Stopcodons des DdNrampA- und DdNrampB-Gens wurde durch die von GSC Jena bereitgestellte Genvorhersage mit dem Programm GeneID vorhergesagt (siehe Abbildung 3.2 und 3.3).

In der 5' und 3' Richtung außerhalb des offenen Leserahmens befinden sich sehr AT-reiche Regionen und mehrere Stop-Codons in allen Leserahmen, was die Vorhersage der Software zusätzlich stützt. Sowohl der offene Leserahmen von DdNrampA als auch der von DdNrampB enden mit dem bei *D. discoideum* am häufigsten vorkommenden Stop-Codon TAA. Das DdNrampA-Gen hat eine Länge von 1890 Basenpaaren und besteht aus einem einzigen Exon. 60 Basenpaare vor dem 3' Ende von DdNrampA befindet sich die Konsensussequenz für das eukaryontische Polyadenylierungssignal. DdNramp B ist 1713 Basenpaare lang und besitzt ein 138 Basenpaare langes Intron am Anfang des Gens. Die Lokalisation des Introns von DdNrampB wurde ebenfalls mit Hilfe der GeneID Vorhersage über das GSC Jena festgestellt. Das Intron ist von den eukaryontischen Konsensussequenzen für den Beginn (GT) bzw. das Ende (AG) eines Introns flankiert. Die aus der Jenaer Genomdatenbank entnommenen Sequenzdaten für DdNrampA und DdNrampB wurden durch die Sequenzierung der Klone JC2a11a12, JC2c91e01 und JC2b81d09 für DdNrampA bzw. JC2c77e06, JAX4a137g04 und JC2b305f09 für DdNrampB nochmals bestätigt.

```

TTTTTTTTTT TTTTTTTTTT ATTTATTTTC CTTTTTTTAT TTCTTTATTC CTTAGTATTT
TTCTATTAATA CTATGGTAGT GGCATAGTAT ATTTATATCT ATAATTTCTC ATAAAACAAT
TATTAATAAAA AAAAAATAAA AAAATAAAAN CTTAATTGTC AACCTATTTA CTTTTCTTTA
TTGATTTTAA AGTGGNTACC CCCATTTTTA AAAAATTTTT TTTTTTATTT TTTTATTTAT
TTTTTTATTT ATTTTTTTTT TAATTATCAT AAAAAATGTT TAAAATAATT ATTTATATTT
TCATCATTGG GCGCCATCAT ATTATTATTT ATTAAAAAAA AAAAAAAA TAAATGCSTT
GAAAATGAAT ATGAATAATA ATAATAATAA TAAAAAATTA AATAAAGAAA ATTTAAATGA
AATTGAAAAT TGGAATGAAA TAGAGTTAAC AGATTATAAG AAACAAGGTT TAGATGAAGG
TCCATCAAGT AATATTTTAT TATTTGAAAG TAATGGTAAT GTTGTTAATG GTAGTATTGA
AGATTCACCA AAGCAACAAC AACAACAACA ACAACAACA CAACAACAAC AACAACAACA
ACAACAACAA CAACAACAAC AACAAAATAT AATATCATCA GATGAGGAAA TTGAAGATAA
ACCATTTCAA GATAGAGATA GTAATATTGG TGATGGTAGT GATATCGATA GTAGTGGTGA
TTCAATCGAT ATAGAGAATA CTGATTATTC AATATTGGTA CCATTCGAAG ATGAAGAAAA
CAACAATGGA AGTAAAAGTA AATTTTCAAT TAAAAAATTA AAATCATTTT TAGGACCTGC
ATTATTTATA TCGGTGGGAT ATATGGATCC AGGTAATTGG GCAACAGATT TAGAAGGTGG
GTCAAGATTT GGGTATCAAT TAATGTGGGT ATTATTATTT TCAAATATTA TGGCACTATT
TTTACAAACT TTGGTGATAA AATTAGCATT GGTGACAAAG AATGATTTAG CTCAACAATG
TAGAAAAGAG TATAGTAAAA CCGTGAATAT ATTCCTATGG TTAATATTAG AGTTGGCAAT
AATTTCAACA GATTTAGCAG AGGTTATTGG TACAGCAATT GGTTTGAATA TTCTATTTGG
CTTACCGTTG ATTGCAGGCG TTGCTATCAC TTCATTGGAT ACTCTACTGT TTTTAGCCAT
TCAAAGATGG GGTATTAGGA AATTGGAATT GTTAATTCTA TTACTTTTAT CAATGATAAC
AATGTGTTTT GTGATAGAAC TTTTCCTTAG CAAACCAATT GCGTCCGAGG TTTTCTCTGG
TTTCGTGCCA AGGTAAATA GTGATAGTGT TATGGTTGCA ACTGGCATCG TTGGTGCTAC
CACTATGCC CATAATTTGT TTTTACATGG TAGTGTGGTG AAATCAAGAA AGATTCCAAA
CGATCGTAGA AAATCAGTGA TCAAACAAGC TTACCGTTAT AACGTTATCG ATACGGTTTT
GGCTTTGAAT TGTGCATTCT TTGTTAATAT CGCAATATTA ATGTTGGCTG CCTCTGTCTT
TTGGAATCA AATATCCAAG TAACCGAATT GTCAGAGGCC TATAGATTAT TAACTAAAT
AATGGATGGG AAATTAGCCG CAGTTTTATT TGGGTTGGGT TTGTTCTTGG CTGGTCAATC
CTCAACTATC ACCGGTACAA TGGCGGGCCA AATAGTTATG GAAGGTTTCA TAAAATTAAG
AATTAACCT TGGTTAAGAA GATTCATAAC TCGACTTTTG GCTATAATCC CCGCCGCTAT
TGTTATCATT GTTTTAGGTG ACAAAGGTAC CTATACCCTA TTAATTATCT CACAAGTGCT
TTTATCAATT GGTTTACCTT TTGCTGTGGT CCCCTTAATC ATTTTCACAA GTTCTTACGA
AATAATGGGT GAATTTAAAA ATAGGTTGTC AATTATTAT ATCAATTCAA TAATTGCTCT
ATTCATTAT GGTTTAAAT TAGCAACTAT TTTTCAATTA ATTAATGATT TCCTTCATAA
TGATTCAATA ATTTCAAAAT GTTTAACAAT TATCTTTTTA ATCCCTTAT CAATTGCTTT
ATGTTGTTTA TTATTATGGT TAATAATTTT TAAAATTAAT TTCTTTACAA ATTTATTATC
AAAAATTTTT AATAATAATA ATAATAATAA TAAATAAAAT ATTATAAATA ATAATAATAA
TTATTCTGGT AATACAATTA ATAATCAAAC TATACAATAA ATTAAAAAAA TAAAAAATAA
AAAATTTAAT ATGTGTGAAA TAATAATTTA TTATTTAAT TAACAAAGAT GTAATGTTGT
CTTTTTTTGA ATTTTACATT TAATTACAAC CACATGAGCC ACCACTTGGT AACATTGAGG
ATGATTTCAT AGCAACTGAT GCATCAACCA TAACAGTAAC

```

Abbildung 3.2: Der *DdNrampA* ORF, 1890 Bp mit umgebenden Sequenzen. Das *DdNrampA* Start- und Stopcodon ist grau unterlegt, das Polyadenylierungssignal ist unterstrichen.

```

AACTAATAAT AATATCCTTT TAAAAAAAAA AATAGATAAT CAAAAATAAA TCAATAAAAA
TAGCCACGAG GCATCAATTA TTTTAACAGA GTTTGAATTA ATTGAATTA AATACTGAAA
AGATAGAAAA TAATAAAAAAT ATGACACCCA GAATTGAAAG TGAGGAATCT GCTCCTCTAG
TAAATAAAAA CAACAACAAT AATAACGATA ATAATAATAA TAATAATGTT GATGAAGAAA
ACCCTTTAAT AATAGAAAGT GGTATTCCAA TTGAAGATTT AGAACAAAAA AATAAACCAT
ATTTAATTAAGT AGTACCAAAAT ATGATAAAC CAGATTCTGT AAGTTTTTAT JTTTCATTTT
TTTTTTTTTT TTTTTTATTA ATAATAATAA TAATAATAAA AATTATTTAT TAATTTTTTA
TTCTTTTTTT TTTTTTAATT AAAAAAAAGA AATGGATAAA TTTTAAAACA TTATGGGCAT
TTACAGGACC AGGATTTTTA ATGAGTATAG CATATTTAGA TCCTGGTAAT TTAGAGAGTG
ATATTCAAGC AGGAGCAATG GCAGGATATC AATTACTTTG GGTATTATTT TGGTCAACAG
TTATTGGATT TTGGTTACAA ATGTTAGCAT CAAGATTGGG TGTGTGAACA GGTAACATT
TAGCTGAACA TTGTAGAGAA CAATATCCAA AGACACCAAG GCTATTGTTA TGGTTAATGA
CAGAGTTGGC CATTATAGGT AGTGATATTC AAGAGGTTAT CGGTAAGTGC ATTGCCTTGC
AAATCTTATC GAATGGACAT ATACCATTAT GGGCTGGTGT ATTATTCACT GCAGCTGATA
CATTACACATT TTTATTTTTA GAGAAATATG GTATTAGAAA GTTGGAGGCA TTCTTTTGTCT
CCTTGATTGC AATCATGGCC ATTTCTTTTTG GTGTAGAATA CATCATTAGC AAGCCCGACC
AAATTGAGGT GGTA AAAAGGT GTATTCATAC CATTATGCTC ACAGAACAAC ATTTCCCAAG
CTGTGGGTAT CTTGGGGGCA GTTGTAAATGC CACATAATAT CTACTTACAT AGCGCTTTGG
TACAGTCAAG AGAAATCGAT AGAAAGATG AACTCAAGT AAAAATCGCA AATAAATACA
ATCGTTTAGA ATCTGCATTC GCATTGATCA TCTCTTTTAT TATTAATCTA TTATTGGTAT
CAGTTTTTCG TAAAGGATTC TATGGAGAAA CTACAGAGAT TGGGTTATCA TCGGCTGCTG
ATTTCTTAT GGACAAGTAT GGTAAGGTTG CAAAATACAT TTGGGCAATC GGTTTTATTTA
GTGCTGGTCA ATGCTCGACT ATGACAGGTA CCTATAGTGG TCAATTTGTA ATGGAAGGTT
TCTTAAAATT AAAAATCGCC CCTTGAAAAA GATTATTAAT CACCCGTTGT ACCGCTATCG
TTCTGCTAT GGTGTTGCT ATATTATCGA CTTCTCATT GGATTCTTTA GATCAATGGT
TAAACATTTT GCAAAGTATT CAATTACCCT TTGCAGTGGT ACCTGTATTA TTATTTACAA
GCTCTGAGAA AATTATGGGT TCAAAAATTTA AAAATCATTG GTTAAATAAT CAATTTGTTA
GATTTTTATC ACTATTAATC ATTGCAATCA ACATTTATTT AATTATCACT TTCTCAATGC
AAATCTCTGA ATCAGCTTGG ATGATTTCAA TAGTTTCAAT ATCTTTCTTT TTTTATTTCA
TTTTCATAGT TTATTTATCA ATGGGTCAAG AAAACTTTAA TTCTATGACT AAAAAAATCA
AAAATTTATT TAATAATAAT TCAAATCAAA CTTATAATAA TATTAATTAT TAATAATTTT
TTTTTTTTTT ATTTAATTGA TAAAAAAAAA AAAATTAATA TATTAAATA AATAAATAAT
AATAATAAAT ATATAACTTT TTTTTTTTTT CTATTCAAAT AATTATCTTT TTTTAATTTT
TTTCTATTCA AATACCCTAA

```

Abbildung 3.3: Der *DdNrampB* ORF, 1713 Bp umfassend mit umgebenden Sequenzen. Das Start- und Stopcodon ist grau unterlegt, das Polyadenylierungssignal ist unterstrichen. Das 138 Bp lange Intron ist gestrichelt hervorgehoben.

3.1.2 Charakterisierung der Proteinsequenzen

Aus den Daten der DNA-Struktur folgt für das DdNrampA-Protein theoretisch eine Länge von 630 Aminosäuren und eine Molekülmasse von 69,3 KDa. DdNrampB ist 525 Aminosäuren lang und hat eine Molekülmasse von 57,8 KDa. Mit Hilfe des paarweisen Vergleichs nach dem Schema von Smith and Waterman [78] wurden die Ähnlichkeiten der Nramp-Homologe aus *D. discoideum* untereinander bzw. zu denen anderer Organismen untersucht. Beim Vergleich der beiden Nramps aus *Dictyostelium* ergibt sich eine Identität von 32% bzw. eine Ähnlichkeit von 57% der Proteinsequenz. Im Vergleich zu den Homologen im Menschen (60%/80% Identität/Ähnlichkeit), den MntH1/2-Proteinen aus *P. aeruginosa* (47%/66%) und Smf1p und Smf2p aus *S. cerevisiae* (45%/69%) zeigen DdNrampA und DdNrampB damit eher wenig Übereinstimmung untereinander.

Bei der Analyse der Primärstruktur der verschiedenen Vertreter der Nramp-Familie finden sich überraschend hohe Identitäts- bzw. Ähnlichkeitswerte bei genetisch sehr weit entfernten Organismen. *Mus musculus* Nramp1 hat 28% Identität mit Hefe, 40% mit *Oriza sativa* und 55% mit *Drosophila melanogaster* (bzw. 46%, 58%, 73% Ähnlichkeit). Bei DdNrampA fällt vor allem eine hohe Homologie zu MntH-Vertretern aus *P. aeruginosa* mit 28% (46% Ähnlichkeit) zu MntH1 und 31% (50% Ähnlichkeit) zu MntH2 auf (für weitere Werte siehe Tabelle 3.1). DdNrampB ist zu 42% identisch mit humanem Nramp1 und zu 45% identisch mit humanem Nramp2 (68 bzw. 69% Ähnlichkeit) (siehe auch Abbildung 3.4).

Wie bei Nramp aus Säugern ist auch bei *D. discoideum* die Ähnlichkeit zu den Nramp-Homologen AtNramp1& 2 mit ca. 63% sehr hoch (Identität \sim 36%). Besonders die Bereiche, die innerhalb der vorhergesagten Transmembrandomänen liegen (siehe Kapitel „Hydrophobizitätsplots“), zeigen einen hohen Grad an Konservierung über die Evolution hinweg. Die N- und C-Termini der Nramp-

DdNrampA	1	MNNNNNNKLNKENLNEIENWNEIELTDYKKQGLDEGPSSNIYLFESNGN	50
DdNrampB	1	-----	1
HsNramp2	1	-----	1
HsNramp1	1	-----	1
DdNrampA	51	VVNGSIEDSPKQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQNISSDEEIEDKPFQ	100
DdNrampB	1	-----MTPRIESEESAPLVNKNNNNNNDNNN	26
HsNramp2	1	-----MVLGPEQKMSDDSVS-GDHGESASLG	25
HsNramp1	1	-----MT-GDKGPQRLSG	12
DdNrampA	101	DRDSNIGDGSDDSSDSIDIENTDYSILVPPDEENNNGSKSKSIKKL	150
DdNrampB	27	NNNVDEENPLIIESGIPIED-----LCKNKYLIKKWINFKTL	65
HsNramp2	26	NINPAYSNPLSQSPDSEH-YFATY----FNKISTEYEEYSQSFRRKL	70
HsNramp1	13	SSYGSISSPTSPFPQAPPRETY----LSKIPIEDTKPGTFLRKL	58
DdNrampA	151	KSLLCPALFTSVMDPGNWATDIEGCSRFCYQMWVLLFSNIMAFLOT	200
DdNrampB	66	WAFITGPGFLMSTAYLDPGNIESDLCACAMACYQLLWVLFWSIVIFWLOM	115
HsNramp2	71	WAFITGPGFLMSTAYLDPGNIESDLCSCAVAGFKLLWLLALLALVGLLOR	120
HsNramp1	59	WAFITGPGFLMSTAYLDPGNIESDLCQCPVAGFKLLWVLLWAVLGLLOR	108
DdNrampA	201	IVIKKALVTKNDLAQQRKENSKTVNIFLWLLLELATISTLAEVIGTAL	250
DdNrampB	116	LASRLGVVTKHLAEHREQYPKTFRLLLWVMTLALIGSDIQEVIGTAL	165
HsNramp2	121	LAARLGVVTKHLAEVHROYPKVPFVILWVWELALIGSDMOEVIGSAL	170
HsNramp1	109	LAARLGVVTKDLGVEVHLYYKVPFVILWVWELALVGSDMOEVIGTAL	158
DdNrampA	251	GLNITFG--LPTIAGVAITSLDILLALATQRFTRKLELLILLLSMITM	298
DdNrampB	166	ALQILSNCHITPLWAGVIFAAVITTELFTEKYCIKLEAFTCSLALIMAI	215
HsNramp2	171	AINLLSVCRIPLWGGVLIITADTIVELFDKYCIKLEAFTGFLTITIMAI	220
HsNramp1	159	AFNLLSARIPLWGGVLIITVDTTEFLFDNYCIKLEAFTGLLITIMAI	208
DdNrampA	299	CVIEFLFLSKPIASEVFSG-EVPRLNS--D-SVMVATGIVGATTMPHNLF	344
DdNrampB	216	SFCVVEYIISKPDIEVKGVEIPLS---QNNISQAVGILGAVVMPHNIY	262
HsNramp2	221	TFQVEYVTVKPSQSLKGMVPS-SGCRTPQTEQAVGIVGAVIMPHNMY	270
HsNramp1	209	TFQVEYVVARVEGALLRGLPLSPGCGHPEILLQAVGIVGAVIMPHNIY	258
DdNrampA	345	LFGSVKSRKPNDRRKSVIKQYRNVDTVLAINCAFFVIAITIMIAA	394
DdNrampB	263	LHSALVKSREIDR-KSETQVKIANKNRLESAFALIIISFIINLLVSVFA	311
HsNramp2	271	LHSALVKSROVNI-NNKQEVREAIKFFTESCIALFVSIINLVVSVFA	319
HsNramp1	259	LHSALVKSREIDR-AREVDIREALMFLLEATLISVSIINLVVMAAEG	307
DdNrampA	395	SVWKSNIQVTELSERYR-----LITK-----LMD-----G	420
DdNrampB	312	KGAYGETEIGLSSAID-----LMDK-----Y	335
HsNramp2	320	EAEFGKINEQVVEVCINTSSP-HAGLTPKDNSTLAVDIYKGGVVLGCYFG	368
HsNramp1	308	QAYQKIKQAAFNICANSSLHDYAKIPMNATVAVDIYQGGVILGCLFG	357
DdNrampA	421	KLAVLEGLGFLAGQSSTIFGTMAQIVMEGFIKIRIKPWLRFIFRLL	470
DdNrampB	336	KVKKYIWAIGLFSAGCSTMTGTYSQFVMEGFIKIKIAPWKLILITRCT	385
HsNramp2	369	PALYIWAIVGILLAGQSSTMTGTYSQFVMEGFINIKWSREARVLLTRSI	418
HsNramp1	358	PALYIWAIVGILLAGQSSTMTGTYSQFVMEGFIKIRWSREARVLLTRSC	407
DdNrampA	471	AITFAAIVITVLGDKGYTLLIISQVLLSGLPFAVVELIITTSYETV-	519
DdNrampB	386	AIVSAMVAILLS-TSHSDSDQWLNILQSIQLPFAVVELITTSSEKIG	434
HsNramp2	419	AITFETLLVAVFQDVEHTGMNDFLNVLOSILQPEALIFILITTSLRPVM-	467
HsNramp1	408	AITFETVLVAVFRDLRDSGNDLLNVLOSILQPEALIFILITTSMPETLV-	456
DdNrampA	520	GEFKRSIIILINSIIFLIGLNLATFQLINDFLNDSIISKCLTIIF	569
DdNrampB	435	SKKHWLNNQVRFSLILAINIYLIITFSMQISESA-W-----MIS	477
HsNramp2	468	SDFANGGWRITAGGIIVLICSINMFFVVVYVVDLGVAVLV--VAAVS	515
HsNramp1	457	QEFANGLKNVVTSSIMVLVCTINLFFVVSYPSPIPPAYEG--LAALLA	504
DdNrampA	570	LIPHSIALCCILLWLLISKINFTNLLSKIFNNNNNNNNKINNNNYS	619
DdNrampB	478	IVSISFFFIFIVYLSMQENFNFSMTKKIKN-----FNNSNQT	518
HsNramp2	516	VAYVGFVYLGWQCLIALMSFLDCGHTCHLGLTAQ---PEYLLNTMDA	562
HsNramp1	505	AAYGLSTLVVITCCLAHCATLAHSSHFF-----YGLLEEDH	544
DdNrampA	620	GNTINNQTIQ	629
DdNrampB	519	YNNINY----	524
HsNramp2	563	DSLVSRL----	568
HsNramp1	545	KGETSG----	550

Abbildung 3.4: Graphische Darstellung eines ClustalW Multiple Alignments von *D. discoideum* DdNrampA und B, sowie der menschlichen Nramp-Homologe HsNramp1 und 2. Die dunkel unterlegten Aminosäuren sind in 3 der 4 Proteine gleich, die hell unterlegten Aminosäuren besitzen in 3 von 4 Proteinen gleiche Eigenschaften (hydrophob/hydrophil, basisch/sauer etc.).

Proteine sind dagegen uneinheitlich und zeigen untereinander wenig Übereinstimmung. Ohne Einbeziehung der N-terminalen Aminosäuren bis zum Beginn der ersten vorhergesagten Transmembranregion steigt der Anteil an identischen Aminosäuren zwischen DdNrampA und HsNramp1 auf 31%, bei zusätzlichem Weglassen der C-terminalen Aminosäuren nach dem letzten Transmembrandurchgang sogar auf 33%. DdNrampA und DdNrampB besitzen im Bereich ihres N-Terminus einen Bereich mit mehreren Asparaginresten (DdNrampA: 6, DdNrampB 2x6 unterbrochen durch ein Aspartat), der in anderen Vertretern der Nramp-Familie nicht vorkommt. DdNrampA besitzt einen weiteren Abschnitt von 17 Aminosäuren am C-Terminus, der 14 Asparagine enthält. Das Vorkommen der asparaginreichen Abschnitte und eine Folge von 24 Glutaminresten N-terminal verleihen dem N- und C-Terminus eine sehr hohe Polarität.

Tabelle 3.1: Vergleich der verschiedenen Nramp-Vertreter mit Angabe der Aminosäuren-Identität (Ähnlichkeiten in Klammern). Identitätswerte $> 0,30$ sind fett gedruckt, Übereinstimmung von Homologen im selben Organismus kursiv gedruckt.

	Dd-NrampA	Dd-NrampB	Hs-Nramp1	Hs-Nramp2	Pa-MntH1	Pa-MntH2	Smf1p	Smf2p	At-Nramp1	At-Nramp2
DdNrampA	1	<i>0,32</i> <i>(0,57)</i>	0,26 <i>(0,52)</i>	0,26 <i>(0,57)</i>	0,28 <i>(0,46)</i>	0,31 <i>(0,50)</i>	0,26 <i>(0,51)</i>	0,27 <i>(0,50)</i>	0,32 <i>(0,58)</i>	0,29 <i>(0,54)</i>
DdNrampB	—	1	0,42 <i>(0,68)</i>	0,45 <i>(0,69)</i>	0,27 <i>(0,48)</i>	0,30 <i>(0,54)</i>	0,28 <i>(0,53)</i>	0,27 <i>(0,54)</i>	0,36 <i>(0,65)</i>	0,46 <i>(0,70)</i>
HsNramp1	—	—	1	<i>0,60</i> <i>(0,80)</i>	0,26 <i>(0,46)</i>	0,31 <i>(0,54)</i>	0,24 <i>(0,49)</i>	0,27 <i>(0,52)</i>	0,35 <i>(0,62)</i>	0,41 <i>(0,65)</i>
HsNramp2	—	—	—	1	0,25 <i>(0,47)</i>	0,30 <i>(0,54)</i>	0,26 <i>(0,52)</i>	0,26 <i>(0,53)</i>	0,36 <i>(0,62)</i>	0,43 <i>(0,66)</i>
PaMntH1	—	—	—	—	1	<i>0,47</i> <i>(0,66)</i>	0,25 <i>(0,45)</i>	0,29 <i>(0,48)</i>	0,30 <i>(0,51)</i>	0,27 <i>(0,49)</i>
PaMntH2	—	—	—	—	—	1	0,29 <i>(0,51)</i>	0,33 <i>(0,53)</i>	0,36 <i>(0,59)</i>	0,29 <i>(0,54)</i>
Smf1p	—	—	—	—	—	—	1	<i>0,45</i> <i>(0,69)</i>	0,28 <i>(0,53)</i>	0,25 <i>(0,49)</i>
Smf2p	—	—	—	—	—	—	—	1	0,29 <i>(0,52)</i>	0,25 <i>(0,51)</i>
AtNramp1	—	—	—	—	—	—	—	—	1	<i>0,35</i> <i>(0,63)</i>
AtNramp2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1

3.1.3 Phylogenitätsanalyse

Cellier *et al.* [10] haben in ihrer Arbeit eine Analyse der Herkunft der Mnth/Nramp-Homologe bei Prokaryoten durchgeführt und ein Modell vorgeschlagen, nach dem eine Gruppe von bakteriellen *mntH*-Genen durch horizontalen Gentransfer von Eukaryoten auf Prokaryoten übertragen wurde. Um die Herkunft der beiden Nramp-Homologe in *D. discoideum* aufzuklären, wurde eine Phylogenitätsanalyse mit Hilfe von PROTDIST aus dem PHYLIP-Programmpaket [25] durchgeführt (siehe Abbildung 3.5).

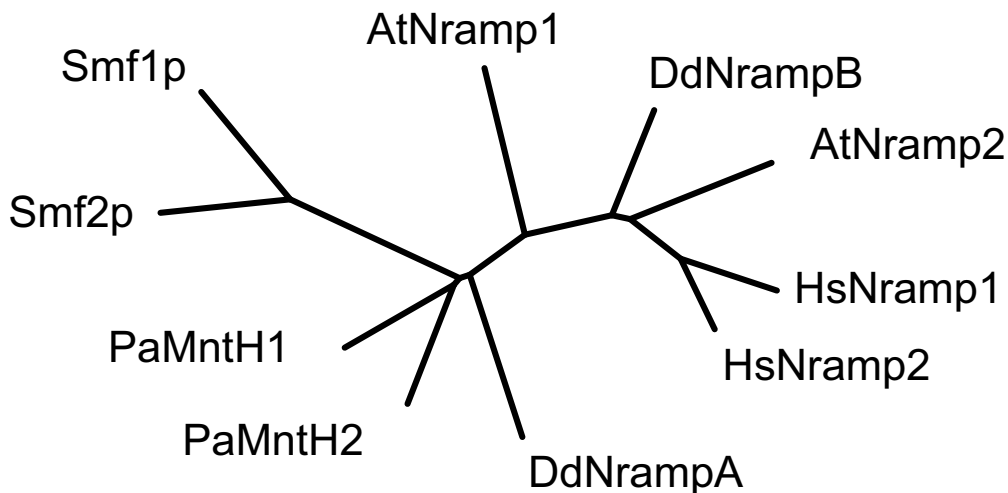


Abbildung 3.5: Phylogenitätsbaum von *DdNrampA* bzw. *B* und deren Homologe in *H. sapiens* (*HsNramp1* und *HsNramp2*), in *A. thaliana* (*AtNramp1* und *AtNramp2*) in *S. cerevisiae* (*Smf1p* und *Smf2p*) sowie in *P. aeruginosa* (*PaMntH1* und *PaMntH2*). Die Längen der einzelnen Äste drücken die genetische Distanz zwischen zwei Proteinen aus.

Zugrunde lag dabei ein Clustal W Multiple Alignment [90] der untersuchten Proteinsequenzen. Während sich die Homologe innerhalb derselben Spezies bei *S. cerevisiae* und unter den Säugern sehr ähneln und deshalb auch graphisch als Gruppe dargestellt sind, sind *DdNrampA* und *DdNrampB* nicht einer gemeinsamen Gruppe zuzuordnen. *DdNrampB* steht phylogenetisch eher den Nramp-Homologen der Säugetiere bzw. der Pflanzen nahe. *DdNrampA* dagegen wird in Abbildung 3.5 in dieser Darstellung in die Nähe der Nramp-Homologe aus *P. aeruginosa* und *S. cerevisiae*, also der Prokaryoten und der Pilze gerückt.

Die graphische Darstellung mittels eines Phylogenitätsbaumes ist jedoch sehr empfindlich in Bezug auf die Auswahl und Änderungen in den untersuchten Sequenzen.

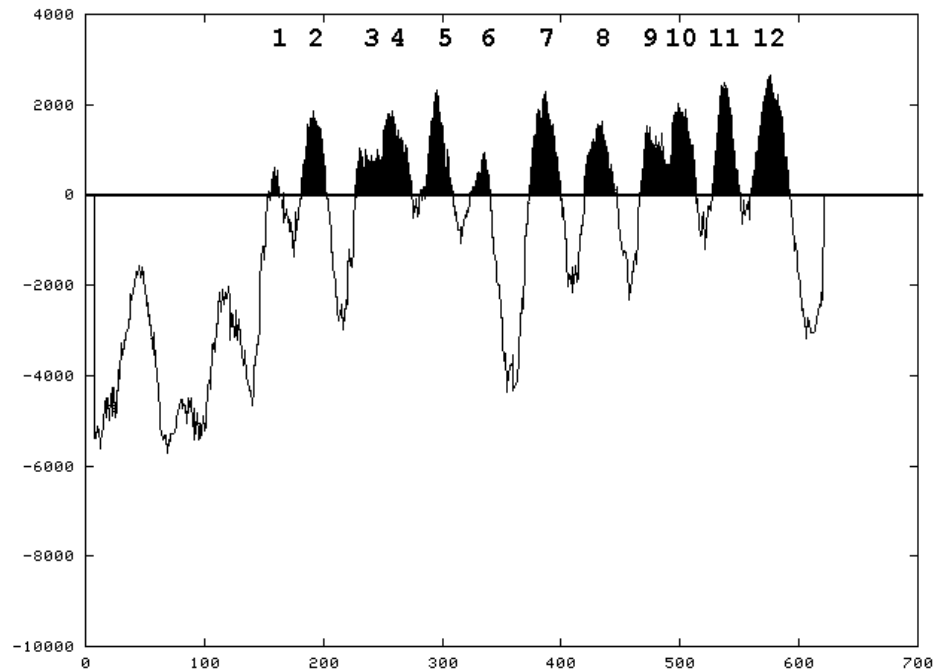
3.1.4 Hydrophobizitätsplots

Um Aussagen über die mögliche Membrantopologie eines Proteins machen zu können, bedient man sich der Analyse seines Hydrophobizitätsprofils. Zur Herstellung eines solchen Profils existiert eine Vielzahl von Methoden. Zur Analyse der Nramp-Homologe aus *D. discoideum* wurde die Internet-basierende Vorhersage von Tmpred genutzt.

DdNrampA besitzt nach dieser Vorhersage 12 transmembranale Domänen (TM) mit dem N- und C-Terminus auf der zytoplasmatischen Seite der Membran (siehe Abbildung 3.6). Die innerhalb der Membran gelegenen Anteile umfassen zwischen 17 (TM3) und 26 (TM11) Aminosäuren. Die Bereiche außerhalb der Membran sind teilweise nur 6 Aminosäuren lang (TM3/4 und TM9/10), können aber auch bis zu 30 Aminosäuren umfassen (TM7/8). Der sehr hydrophile N-Terminus ist 149 Aminosäuren lang, der ebenfalls hydrophile C-Terminus 42 Aminosäuren (siehe auch das Kapitel „Charakterisierung der Proteinsequenzen“).

Für DdNrampB wird eine ähnliche Topologie vorhergesagt, allerdings besitzt es nur 11 Membrandurchgänge (siehe Abbildung 3.6). Der N-Terminus würde bei diesem Modell innerhalb des Zytoplasmas liegen, der C-Terminus dagegen im Extrazellulärraum oder im Vesikellumen. Die Proteinabschnitte außerhalb der Transmembranregionen sind bei DdNrampB zwischen 10 (TM10/11) und 58 (TM2/3) lang und damit etwas länger als die von DdNrampA. Der N-Terminus von DdNrampB besitzt zwar auch ausgeprägt hydrophile Abschnitte, ist jedoch mit 58 Aminosäuren deutlich kürzer. Der C-Terminus ist nach der Tmpred Vorhersage 31 Aminosäuren lang. Das Vorkommen von vielen geladenen Aminosäuren, sowie die relativ hydrophilen Aminosäuren im Bereich von TM3/4

DdNrampA



DdNrampB

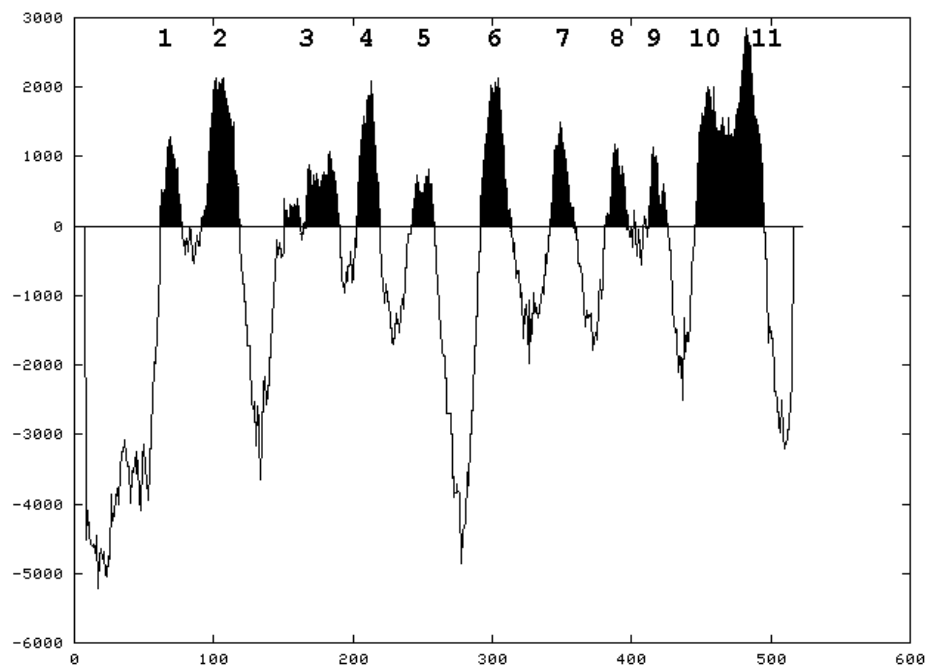


Abbildung 3.6: *TMpred* Vorhersage für die Transmembrandomänen von *DdNrampA* und *DdNrampB*. Auf der y-Achse stehen positive Werte für Hydrophobizität, negative für Hydrophilie. Auf der x-Achse sind die Aminosäuren der *DdNramp*-Homologe von N- zu C-Terminus aufgetragen. Die hydrophoben Bereiche mit Werten > 0 sind schwarz gefärbt. Die vorhergesagten Membrandurchgänge (TM 1-12 bzw. 1-11) sind nummeriert.

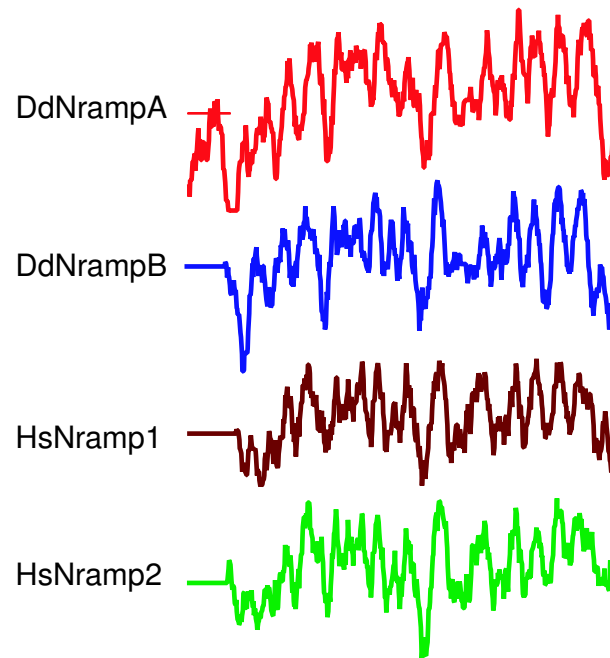


Abbildung 3.7: Vergleich der Hydrophobizitätsprofile von *DdNrampA* und *DdNrampB* aus *D. discoideum* und *HsNramp1* und 2 aus *H. sapiens*. Werte oberhalb der eingezeichneten Nulllinie sprechen für Bereiche hoher Hydrophobizität, Werte unterhalb für solche niedriger Hydrophobizität.

erschweren jedoch die akkurate Vorhersage der Membrandurchgänge in diesem Abschnitt von *DdNrampA* und *B* und haben so Einfluss sowohl auf die Gesamtanzahl an vorhergesagten TMs als auch auf die Lokalisation des N- und C-Terminus [11]. Ausgehend von einem ClustalW Multiple Alignment [90] wurden die Nramp-Homologe von Mensch und *D. discoideum* nach der Methode von Kyte und Doolittle [54] auch auf Ebene der Hydrophobizitätseigenschaften miteinander verglichen (siehe Abbildung 3.7).

Wie erwartet ergab sich dabei eine hohe Übereinstimmung im Hydrophobizitätsprofil im Bereich der Membrandurchgänge. Die bei *D. discoideum* sehr auffälligen hydrophilen Bereiche am N-Terminus sind beim Menschen jedoch nicht in dieser Ausprägung vorhanden.

3.2 Molekularbiologische Charakterisierung von DdNramp-Homologen

3.2.1 Northern- und Southernblotting

Um die Ergebnisse, die anhand der Datenbankeinträge des GSC Jena gefunden wurden, zu bestätigen, wurden die DdNrampA- und DdNrampB-Gene analysiert. Als Sonde zur Detektion von DdNrampA wurde ein 1069 Bp langes Fragment aus dem Klon JC2ca11a12 mit dem Restriktionsenzym KpnI ausgeschnitten. Dieses Fragment stellt den Bereich von Bp 387 bis Bp 1456 von DdNrampA dar (siehe auch Abbildung 3.8).

Hybridisierung der gesamten DdNrampA-DNA ergab eine große Zahl von unspezifischen Banden, die wohl auf das Vorkommen zahlreicher AAT und CAA-Wiederholungen zurückzuführen sind. Diese Motive im 5' und 3'-Bereich der DdNrampA-DNA sind im Genom von *D. discoideum* sehr verbreitet. Bei der Spaltung der genomischen DNA mit EcoRI ergab sich ein einzelnes Fragment von ca. 8 KB, bei der Spaltung mit HindIII zeigten sich die erwarteten zwei Fragmente von 4 KB und 1,2 KB. Im kombinierten Verdau mit EcoRI und HindIII finden sich zwei Fragmente von 2,8 KB und 1,2 KB.

Für die Darstellung von DdNrampB im Southern-Blot wurde die DNA des Klons JAX4a137g04 verwendet, der dem Bereich Bp 628 bis Bp 1579 von DdNrampB entspricht (Abbildung 3.8). DdNrampB besitzt keine internen EcoRI oder HindIII Schnittstellen. Entsprechend finden sich beim Verdau mit EcoRI und HindIII nur einzelne Banden von 5,5 KB respektive 5 KB. Im Doppelverdau EcoRI/HindIII stellt sich ebenfalls eine Bande von 5 KB Größe dar. Die Durchführung der Hybridisierung unter „low stringency“-Bedingungen mit dem Nachweis von jeweils nur einer einzigen Bande bei Verwendung von DdNrampA bzw. DdNrampB-spezifischen Sonden lässt auf die Existenz von nicht mehr als zwei Nramp-Homologen in *D. discoideum* schließen. Dies ist konsistent mit dem Fehlen weiterer Nramp-homologer Abschnitte in der Datenbank des GSC Jena.

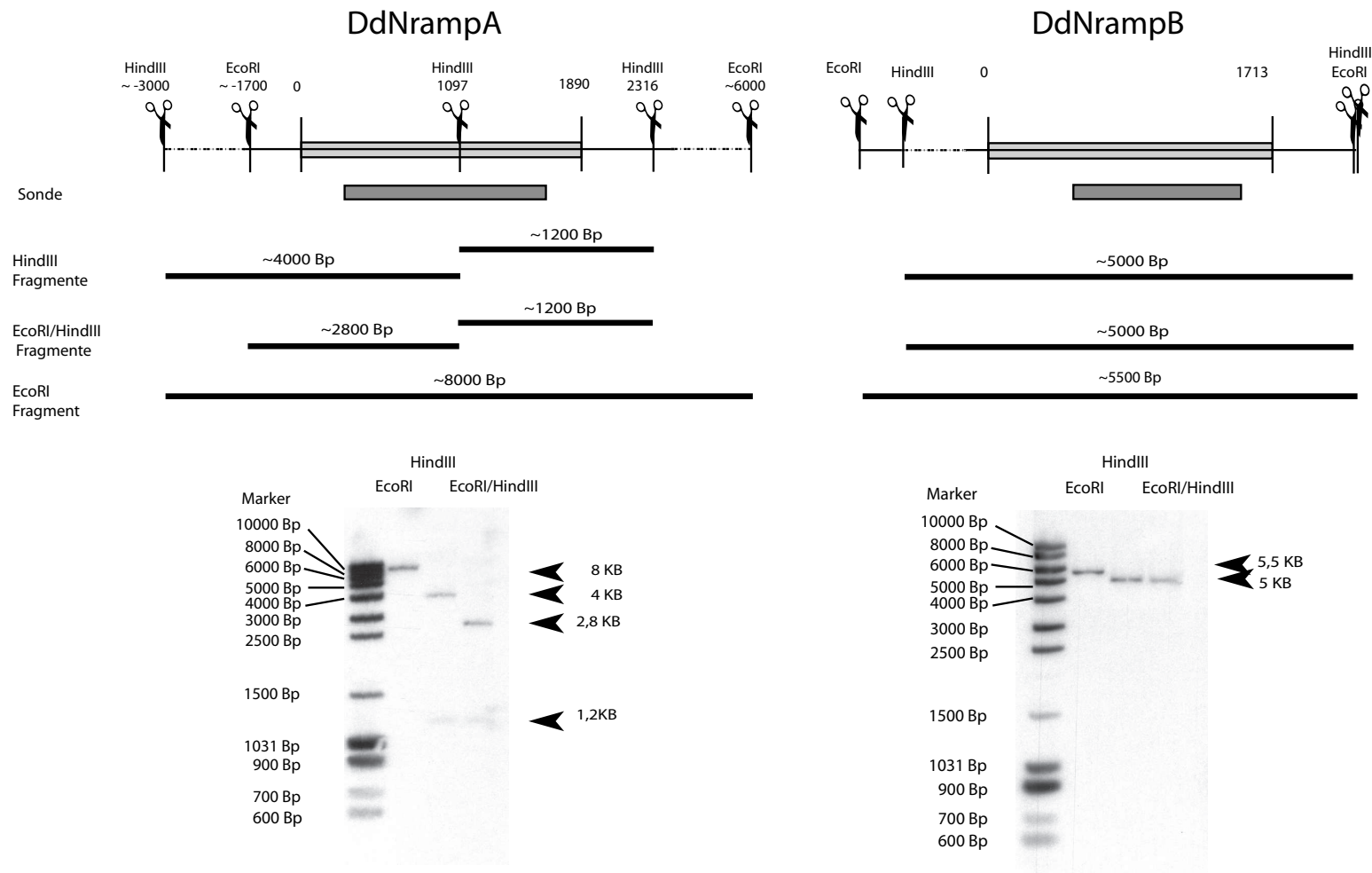


Abbildung 3.8: Southernblot mit genomischer DNA aus *D. discoideum*, die mit den Enzymen *EcoRI*, *HindIII* bzw. einer Kombination aus beiden geschnitten wurde. Zum Nachweis des *DdNrampA* Gens wurde durch Verdau mit *KpnI* eine Sonde aus dem Klon *JC2ca11a12* hergestellt. Zum Nachweis des *DdNrampB* Gens wurde als Sonde das Insert des Klons *JAX4a137g04* verwendet. Die Hybridisierung erfolgte unter „high stringency“-Bedingungen

Zum Nachweis der Expression und des Expressionsmusters von Nramp während der Entwicklung wurden Northern-Blots verwendet. Die Herstellung der Northern-Blots erfolgte im Rahmen der Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Angelika Nögel in Köln. Dabei kamen dieselben Sonden wie beim oben beschriebenen Southern-Blot zum Einsatz. Zur Darstellung der DdNramp mRNA wurde Gesamt-RNA von *D. discoideum* zu verschiedenen Zeitpunkten nach Nährstoffentzug und damit verschiedenen Entwicklungsstadien (siehe Einleitung) isoliert und für den Northern-Blot verwendet (Abbildung 3.9). Durch diese Methode können Gene auf ihre Entwicklungsregulation hin überprüft werden.

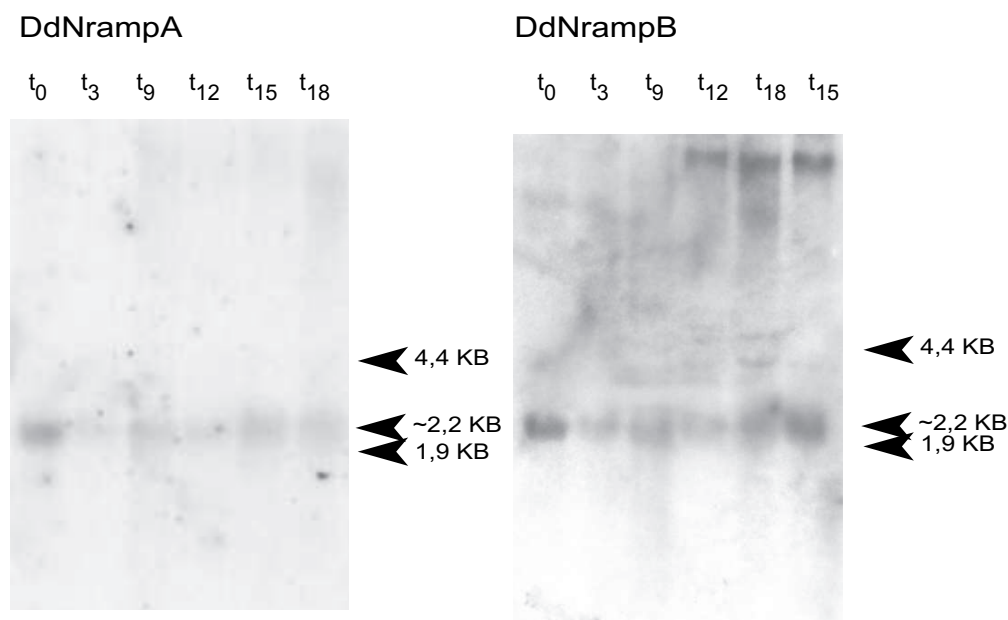


Abbildung 3.9: Northern-Blots von DdNrampA und DdNrampB. Zur Orientierung sind die Laufweiten der beiden rRNA Banden bei 4,4 KB und 1,9 KB angegeben. Von links nach rechts sind jeweils 30 μ g RNA der Entwicklungszeitpunkte $t_0 - t_{18}$ aufgetragen. Im Northernblot von DdNrampB ist durch eine Verunreinigung der RNA mit genomischer DNA auch diese angefärbt und als Bande > 20 KB zu sehen.

Die DdNrampA-mRNA stellt sich als ca. 2,2 KB große Bande dar, die der Größe des translatierten und posttranslational modifizierten DdNrampA ORFs mit 1890 Bp entspricht. Besonders stark stellt sich die Bande der mRNA aus sog.

„T₀“-Zellen, also aus der Wachstumsphase dar. Die besonders starke Expression von Nramp-mRNA in diesem Stadium entspricht der Vorstellung, dass sich DdNramp, wie Nramp-Homologe anderer Organismen, auf der Oberfläche von Endosomen nachweisen lässt und das Ionengleichgewicht in diesen Organellen reguliert. In allen anderen Stadien (t₂-t₁₈) wird die DdNrampA mRNA als etwa gleichstarke Bande markiert und scheint daher im Laufe der Entwicklung zum mehrzelligen Organismus ohne ausgeprägte Veränderungen auf niedrigem Niveau exprimiert zu werden.

Das Expressionsmuster von DdNrampB stimmt mit dem von DdNrampA überein. Die Größe des DdNrampB Introns von 138 Bp zusammen mit der Größe des DdNrampB ORFs von 1713 Bp lassen auf eine erwartete Größe der mRNA von ca. 1,6 KB schließen. Das Laufverhalten der mRNA in der Gelelektrophorese als ca. 2,2 KB große Nukleinsäure lässt sich auch hier am ehesten im Sinne einer posttranslationalen Modifikation deuten (z.B. starke Polyadenylierung). Die schwach erkennbare Bande bei 4,4 KB dürfte auf eine unspezifische Bindung der Sonde an die ribosomale RNA aus *D. discoideum* zurückzuführen sein. Wie bei DdNrampA ist die Expression im Stadium des phago-/pinozytierenden Einzelllers am deutlichsten ausgeprägt. Insgesamt ist die Konzentration der Nramp mRNA offensichtlich sehr gering. Die Banden waren nur mit großen Schwierigkeiten nachzuweisen und liegen weit unter den Signalen, die z.B. mit Sonden für CSA mRNA erzielt werden können [62].

3.2.2 Klonierung von DdNrampA und B zur Überexpression in *E. coli*

Um zu einem späteren Zeitpunkt Antikörper gegen DdNrampA und DdNrampB aus *D. discoideum* herstellen zu können, wurde versucht, Teile von beiden DdNramp-Homologen in *E. coli* zu exprimieren. Zunächst wurde dazu ein Fragment von DdNrampB (Bp 628 - Bp 1579) in den Expressionsvektor pT7-7 eingefügt und in den *E. coli* Stamm BL21 LysE transformiert. Soweit im SDS-Gel

beurteilbar, erfolgte jedoch keine Produktion des Fragments, auch wenn die Versuche bei einer niedrigeren Inkubationstemperatur wiederholt wurden (siehe auch „Material und Methoden“).

In einem weiteren Versuch wurden ca. 200 AS umfassende Stücke von DdNrampA bzw. B ausgewählt, die hydrophile Anteile der Proteine repräsentieren, die später als Epitope für mögliche Antikörper dienen können. Die Bereiche von Bp 919 bis 1575 von DdNrampA bzw. Bp 630 bis Bp 1266 von DdNrampB wurden in den Vektor pMal-p2x sowie pMal-c2x der Firma Clontech vor das malE Gen kloniert (Abbildung 3.10).

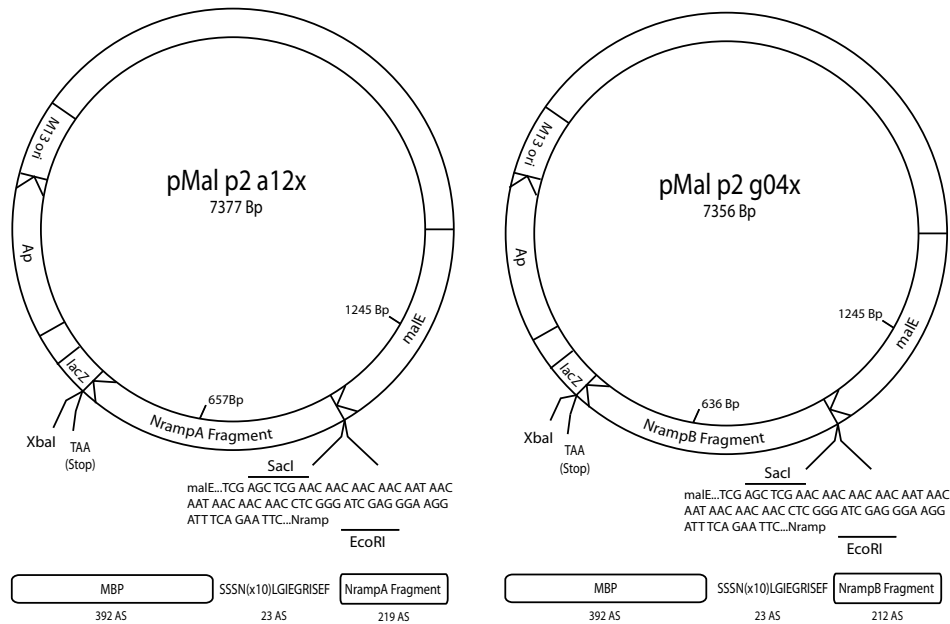


Abbildung 3.10: pMal-p2 Konstrukte zur Expression von DdNrampA- und DdNrampB-Fragmenten. Die entsprechenden Abschnitte wurden mittels PCR vervielfältigt und durch Öffnen des Vektors mit den Enzymen EcoRI und XbaI und anschließender Ligation in den Vektor eingefügt. MBP: „Maltose Binding Protein“, malE: für MBP codierender ORF, Ap: Ampicillin-Resistenz-Kassette

Die Fusion mit dem von malE kodierten Maltose-Bindeprotein (MBP) erlaubt eine leichtere Detektion und Aufreinigung des rekombinanten Proteins. pMal-p2x und pMal-c2x unterscheiden sich hinsichtlich der Lokalisation des produzierten Proteins, wobei sich Fusionsprodukte von pMal-p2x im periplasmatischen Raum, die von pMal-c2x im Cytoplasma der Bakterien befinden.

Durch Export des Produktes in den periplasmatischen Raum soll die Expression von stark hydrophoben Proteinen, wie dem hier untersuchten Nramp erleichtert werden. Zunächst wurde versucht, die optimale Induktionsdauer zu ermitteln. Dazu wurden Bakterien vor und 1h, 2h, 3h, 4h, 5h, 7h und 21h nach Induktion mit 1mM IPTG lysiert und mittels SDS-PAGE auf die Menge des exprimierten Proteins hin untersucht. Mit dieser Methode konnte jedoch keine sichtbare Expression zu irgendeinem Zeitpunkt nach Induktion festgestellt werden.

Wegen der großen Hydrophobizität von DdNramp wurde untersucht, ob sich die Extraktion aus den pMal-c2x / pMal-p2x-Bakterienzellen durch Herauslösen mit verschiedenen Konzentrationen von Harnstoff verbessern lässt (siehe auch „Material und Methoden“). Die stärkste Konzentration an Protein der erwarteten Größe konnte dabei in Zellen mit dem Vektor pMalc2 im ersten Zentrifugationsüberstand nach Lyse der Zellen festgestellt werden (siehe Abbildung 3.11).

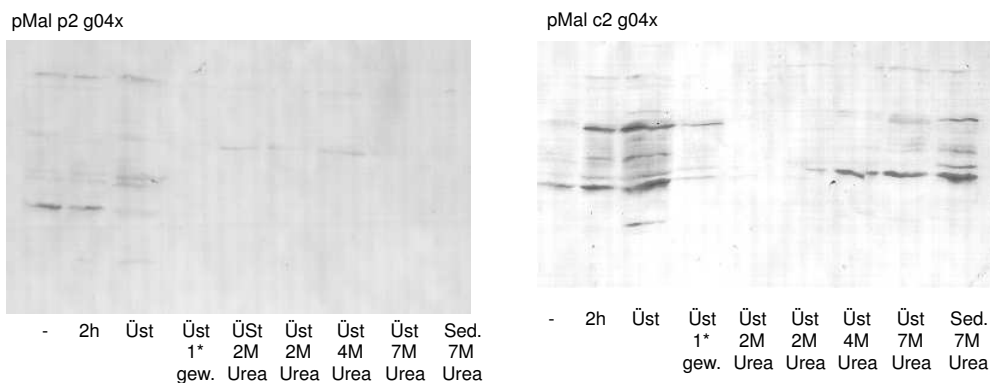


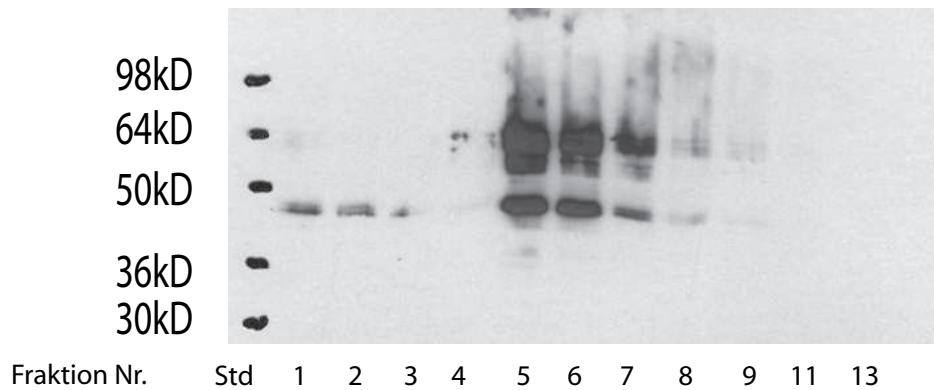
Abbildung 3.11: Westernblot eines Extraktionsversuches mit verschiedenen Konzentrationen von Harnstoff (siehe auch „Material und Methoden“). pMal-p2 mit periplasmatischer Lokalisation des Expressionsprodukts, pMal-c2 mit zytoplasmatischer Anreicherung. „-“ vor Induktion, „2h“ Bakterienhomogenat 2h nach Induktion, „Üst“ Überstand nach erstem Zentrifugationsschritt und weiteren Extraktionsschritten mit Puffer bzw. steigenden Harnstoff-Konzentrationen. Darstellung des Fusionsproteins NrampB-Fragment +MBP (ca. 67 KDa) mit Antikörper gegen MBP (Maltosebindprotein). Die beste Ausbeute konnte im Überstand direkt nach Lyse im System mit zytoplasmatischer Expression erzielt werden.

Daraufhin wurden die Zentrifugationsüberstände aus Lysat von pMal-c2-a12x (für DdNrampA) und pMal-c2-g04x (für DdNrampB) durch Bindung an eine Amylasesäule und anschließende Elution aufgereinigt (siehe auch „Material und Methoden“). Die erfolgreiche Expression wurde durch SDS-PAGE und Western-Blot mit Hilfe Antikörper gegen MBP kontrolliert (Abbildung 3.12). Das Fusionsprodukt zeigte sich dabei als ca. 67 KDa große Bande, wobei das Nramp-Fragment für ca 24 KDa und das MBP für ca. 43 KDa der Gesamtmolekülmasse verantwortlich sind. Die Ausbeute war jedoch trotz der verwendeten Affinitätsreinigung so gering, dass das Eluat nicht als Grundlage für die Immunisierung von Kaninchen zur Gewinnung von polyklonalen Antikörpern verwendet werden konnte.

3.2.3 Herstellung von Antikörpern

Sowohl die Verwendung verschiedener Expressionssysteme als auch das Ausprobieren unterschiedlicher Versuchsbedingungen (siehe oben) führten zu keiner im SDS-Gel sichtbaren Expression. Da die Aufreinigung eines Proteins und die spätere Injektion in Kaninchen bei solch kleinen Proteinmengen sehr problematisch ist, wurde dieser Versuchsansatz zunächst zurückgestellt. Stattdessen wurden bestimmte Bereiche von DdNrampA und DdNrampB, die zur Erzeugung einer Antikörperantwort geeignet schienen, als synthetische Polypeptide hergestellt. Verwendet wurden dabei Regionen der Nramp-Homologe, die sich außerhalb der transmembranalen Domänen von Nramp befinden. Diese Polypeptide wurden an Hämocyanin aus „Keyhole limpet“ (KLH) gekoppelt, da sie aufgrund ihrer Größe allein nicht zur Erzeugung einer suffizienten Immunantwort ausreichen. (Zur genauen Position der Polypeptide in den Nramp-Homologen siehe auch das Kapitel „Material und Methoden/ Kopplung synthetischer Peptide an Hämocyanin“.) Das so hergestellte Kopplungsprotein wurde an die Firma „Eurogentec S.A.“, Belgien, zur Immunisierung von Kaninchen versandt (siehe „Material und Methoden/ Herstellung und Überprüfung von Antikörpern“).

DdNramp A



DdNramp B

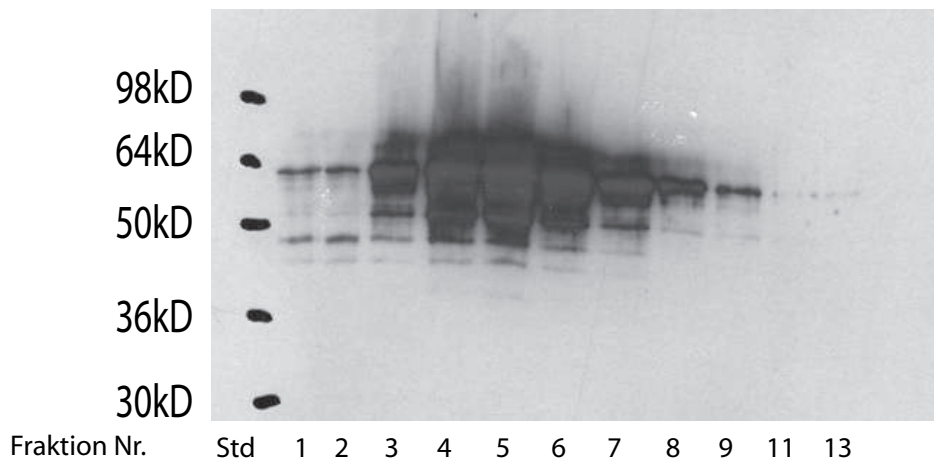


Abbildung 3.12: Western-Blot mit Anfärbung durch Antikörper gegen MBP (Maltose Binding Protein). Fraktionen des Eluats zweier Amylose-Säulen, die zuvor mit DdNramp-MBP Fusionsprodukten beladen wurden. DdNrampA wird durch das Konstrukt pMal-c2-a12x repräsentiert, DdNrampB durch pMal-c2-g04x. Die Fusionsprodukte haben eine berechnete Größe von 67 KDa (NrampA) bzw. 66 KDa (NrampB). In den hier gezeigten Blots entspricht dies am ehesten der starken Bande kurz unterhalb der 64 KDa Markierung. Bei den anderen dargestellten Banden handelt es sich um Abbauprodukte des Fusionsproduktes bzw. MBP (Molekülmasse ca. 43 KDa) alleine.

Überprüfung der Antiseren im Westernblot Die Seren wurden jeweils parallel mit den Präseren vor Injektion der Antigene (Verdünnung 1:2000 in NCP+1% BSA) getestet. Die ersten drei gelieferten Sera wurden im Westernblot mit Zellhomogenat aus pMal-c2x Expressionsversuchen (siehe oben) und den Peptidkonjugaten als Positivkontrolle getestet (Abbildung 3.13). Da die Größe der exprimierten Fusionsprodukte bei ca. 67 KDa lag, wurde in diesen Versuchen eine Bande dieser Größe als Nachweis für das Vorliegen eines Antikörpers gegen DdNramp A bzw. DdNrampB gewertet. Im Falle von Serum Nr. 73 (zur Benennung siehe „Material und Methoden/ Herstellung von Antikörpern“) erschien eine deutliche Bande von etwa 64 KDa, die bei Inkubation mit Präserum nicht zu sehen war. Gleichzeitig waren in der Spur mit dem zur Injektion verwendeten Konjugat starke Banden von 64 KDa und >100 KDa zu sehen. Da die Methode der Kopplung von Peptiden an Hämocyanin, wie sie hier verwendet wurde, Konjugate völlig unterschiedlicher Größe hervorbringt, ist bei der Auswertung dieser Banden nur das Vorhandensein im Vergleich zum Präserum, nicht jedoch die Größe von Bedeutung. Allerdings kann bei einer Markierung der Peptidkonjugate keine Unterscheidung zwischen einer Immunreaktion gegen die DdNramp-Anteile und einer solchen gegen das KLH getroffen werden. In den dargestellten Western-Blots zeigt Serum Nr. 74 eine zusätzliche Bande von etwa 98 KDa, sowie eine im Vergleich zum Präserum stärker hervortretende Bande bei ca. 50 KDa. Die Positivkontrolle mit dem Peptidkonjugat zeigt im Serum nach Immunisierung deutliche Banden, die im Versuch mit Präserum nicht zu sehen waren. Serum Nr. 75 zeigte ebenfalls eine starke Reaktion in der Positivkontrolle, die neu aufgetretenen Banden bei 36 KDa, 50 KDa und 60 KDa wurden als Abbauprodukte des Expressionsproduktes gedeutet. Bei Serum Nr. 76 konnten keine oder nur sehr undeutliche neu auftretende Banden gefunden werden, die Positivkontrolle zeigte jedoch auch eine Bande bei ca. 50 KDa.

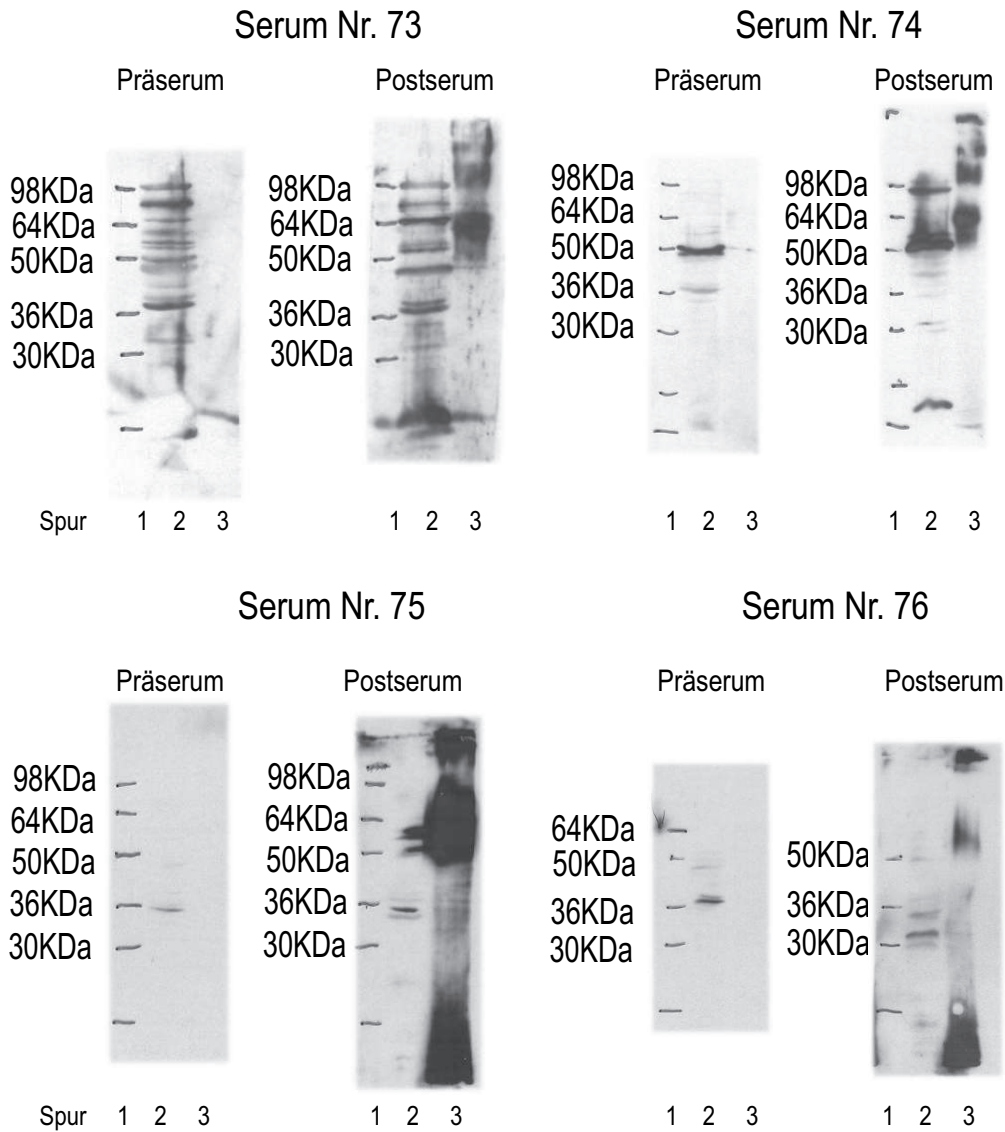


Abbildung 3.13:

Western-Blots zur Überprüfung verschiedener Seren der dritten Blutung post injectionem auf das Vorhandensein von Antikörpern gegen DdNrampA (Serum 73 und Serum 74) bzw. DdNrampB (Serum 75 und Serum 76). Aufgetragen sind von links nach rechts: SeeBlue Standard (Spur 1, zur Verdeutlichung nachgezeichnet), Homogenat eines Expressionsversuchs mit pMalc2-a12x (für Serum 73 und 74) bzw. pMalc2-g04 (für Serum 75 und 76) (Spur 2) sowie dem Peptidkonjugat NrampA1/A2 +KLH als Positivkontrolle für Serum 73 und 74 bzw. NrampB2 +KLH als Positivkontrolle für Serum 75 und 76 (Spur 3). Erwartet wurde eine Bande auf Höhe von 67 KDa entsprechend der Größe des exprimierten DdNramp-MBP Fusionsproduktes. Die im Test der Seren 73 und 75 auftretenden Banden dieser Größe wurden als positiver Antikörpernachweis gewertet. In Serum 74 ist ein Signal der richtigen Größe in der Positivkontrolle zu sehen, nicht jedoch in der Spalte mit dem Expressionsprodukt.

Aufgrund dieser nicht eindeutig positiven Ergebnisse wurden weitere Boosts der Tiere mit Antigenmaterial abgewartet, um über die endgültige Qualität der Seren zu entscheiden. Die daraufhin gelieferten Blutungen 4-9 wurden durch Verwendung in einem Westernblot zunächst mit Homogenat, 100.000 g Überstand und einem 100.000 g Zellsediment von *D. discoideum* Zellen geprüft, als Positivkontrolle diente Zellhomogenat aus pMal-c2 Expressionsversuchen. Ab Serum der Blutung Nr. 6 wurde als Positiv-Kontrolle die Fraktion Nr. 6 des Aufreinigungsversuchs mit pMal-c2 Nramp Konstrukten (siehe dort) verwendet. Nach Analyse der Seren aus Blutung Nr. 7 wurde entschieden, zwei der Kaninchen nicht mehr weiter mit Antigenmaterial zu boosten. Wie in Abbildung 3.15 und 3.14 erkennbar, zeigen nur die Seren 73 und 75 Banden einer Größe, die für eine Reaktion des Serums gegen die DdNramp-Homologe sprechen. Insgesamt verliefen die Analysen der polyklonalen Seren unbefriedigend, da in keinem Fall eine eindeutige Reaktion mit endogenem Dd-NrampA oder B nachgewiesen werden konnte.

Überprüfung mittels Immunfluoreszenz Parallel zur Analyse im Westernblot wurden Immunfluoreszenzen mit dem aus der vierten Blutung gelieferten Serum durchgeführt. AX2 *D. discoideum* Zellen wurden fixiert und mit den zu kontrollierenden Seren in einer Verdünnung von 1:2000 inkubiert. Die Anfärbung erfolgte mit Cy3-markierten Ziege-anti-Kaninchen-IgG Antikörpern (siehe auch „Material und Methoden“). Die Seren Nr. 73 und Nr. 74 (Immunisierung gg. DdNrampA) zeigten keine spezifische Bindung an Strukturen in *D. discoideum* Zellen. Die Färbung war wohl durch eine schwache unspezifische Bindung über die gesamte Zelle verteilt und konnte in dieser Form auch bei Verwendung der Präseren nachgewiesen werden. Wie in Abbildung 3.16 gezeigt, färbten die Seren Nr. 75 und Nr. 76 (Immunisierung gegen DdNrampB) die Zellkerne der *D. discoideum* Zellen sehr stark an (siehe Abbildung 3.16a). Dieses Färbeverhalten war mit Präserum nicht zu beobachten. In einem kon-

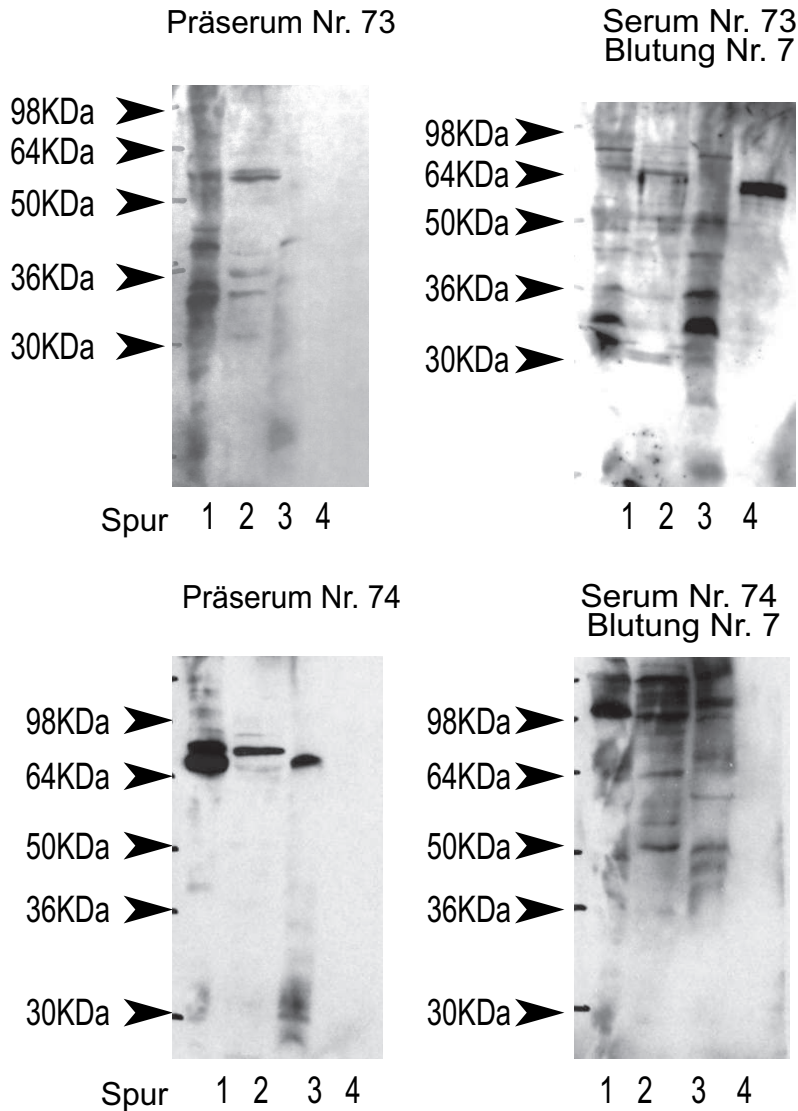


Abbildung 3.14: Überprüfung der Seren der siebten Blutung mittels Western-Blot. Aufgetragen sind (1) *D. discoideum* Zellhomogenat (2) 100.000 g Überstand (3) 100.000 g Sediment (4) Positivkontrolle (Aufreinigung eines rekombinanten DdNrampA-Fragments). Nur Serum Nr. 73 zeigt Banden, die der erwarteten Größe von nativem DdNrampA von ca. 68 KDa entsprechen, sowie eine deutlich positive Kontrollreaktion im Serum nach Immunisierung. Bei Serum Nr. 74 sind Banden von ca. 68 KDa Größe bereits bei Inkubation mit Präserum zu sehen, eine Reaktion mit der Positivkontrolle fehlt sowohl bei Präserum als auch bei Serum nach Immunisierung.

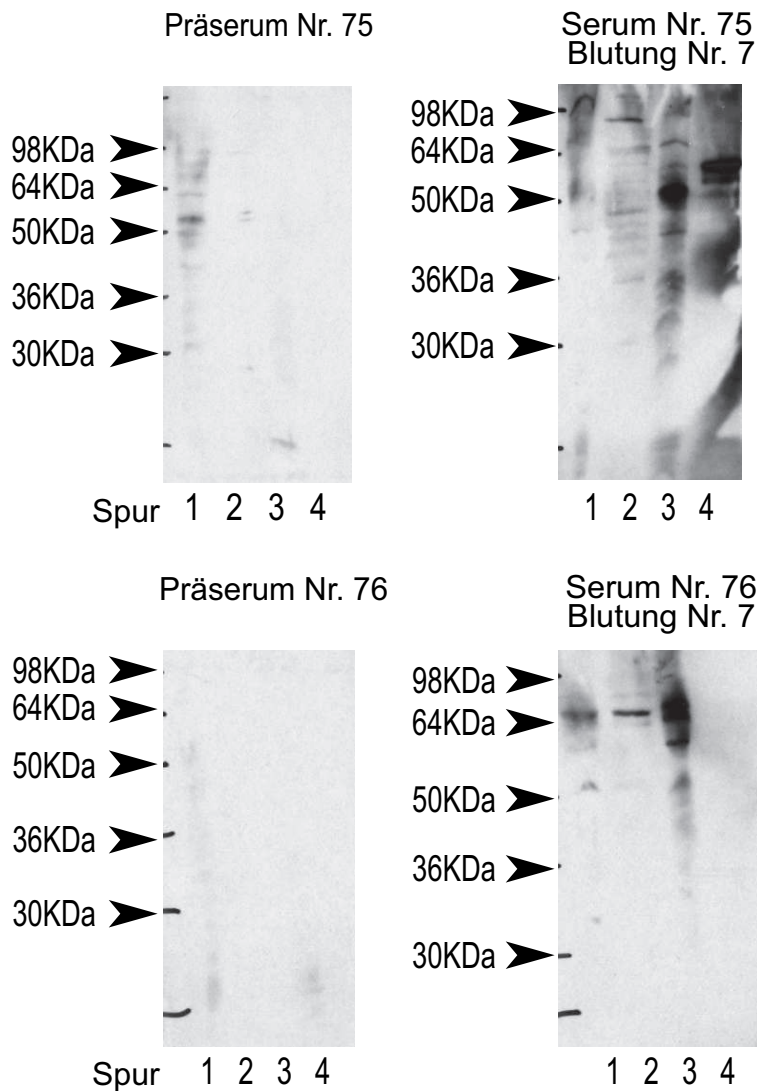


Abbildung 3.15: Überprüfung der Seren der siebten Blutung mittels Western-Blot. Aufgetragen sind (1) *D. discoideum* Zellhomogenat (2) 100.000 g Überstand (3) 100.000 g Sediment (4) Positivkontrolle (Aufreinigung eines rekombinanten DdNrampB-Fragments). Lediglich Serum Nr. 75 zeigt im Vergleich zum Präserum eine deutlich positive Reaktion mit der Kontrolle. Hier ist auch eine Bande im 100.000 g Sediment zu sehen, die in etwa der Größe von DdNrampB mit ca. 57 KDa entspricht. Die bei Serum Nr. 76 im Vergleich zum Präserum neu aufgetretenen Banden sind mit >64 KDa deutlich größer als für DdNrampB erwartet. Eine Reaktion mit der Positivkontrolle fehlt bei Serum Nr. 76.

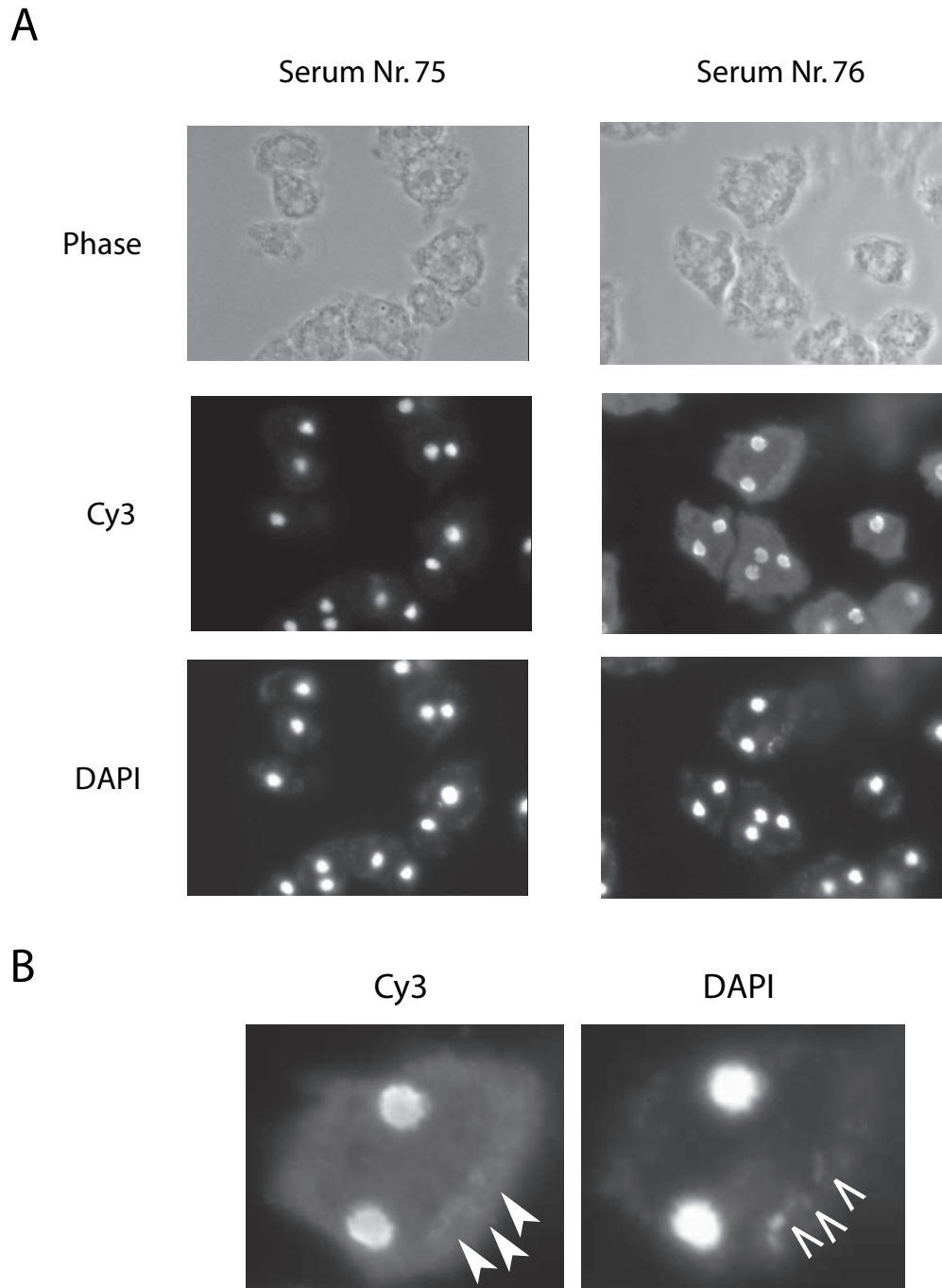


Abbildung 3.16: (a) Immunfluoreszenzen mit Serum Nr. 75 und Nr. 76. Anfärbung mit Cy3 markiertem zweiten Antikörper und Gegenfärbung der Kerne mit DAPI. Deutlich ist die Anfärbung der Kerne zu erkennen, die mit der Anfärbung durch DAPI übereinstimmt. (b) Vergrößerung einer Zelle aus der Anfärbung mit Serum Nr. 76. Die ausgefüllten Pfeile deuten auf die ringförmigen Strukturen, die sich zusätzlich zum Zellkern in einigen Zellen darstellten. Die nicht-ausgefüllten Pfeile zeigen ebenfalls diese Strukturen, was eine Anwesenheit von DNA vermuten lässt. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass es sich um Akkumulationen von Mitochondrien handelt.

fokalen Mikroskop angefertigte Schnittbilder von Präparaten, bei denen neben den erwähnten potentiellen DdNramp Seren Antikörper gegen Strukturen der Zellkernmembran verwendet wurden, zeigten deutlich, dass sich die angefärbten Proteine innerhalb der Kernmembran befinden mussten. Die Möglichkeit, dass es sich bei den Kern-färbenden Antikörpern um Anti-Histon Antikörper handelt, wurde durch Anfertigung eines Western-Blots überprüft (siehe Abbildung 3.17). Dabei wurde die Reaktion der Seren 75 und 76 mit einer gereinigten Zellkernfraktion untersucht und mit den Präseren verglichen. In diesem Versuch zeigte sich eine deutlich positive Reaktion in Laufhöhe der Histonproteine bei <30 KDa, so dass davon ausgegangen wurde, dass die Seren die Kerne durch Erkennung der Histone anfärben. Bei mehreren Zellen wurden außerdem in der Cy3-Färbung kleine ringförmige Strukturen knapp unterhalb der Zellmembran sichtbar. Einige dieser Strukturen zeigten in der DAPI-Kernanfärbung einen einzelnen, bläulich dargestellten, ovalen Inhalt, der die vesikelartigen Strukturen ganz auszufüllen schien. Pro *D. discoideum* Zelle konnten etwa drei bis fünf solche vesikelartigen Strukturen in unmittelbarer Nachbarschaft zueinander gefunden werden (siehe Abbildung 3.16b).

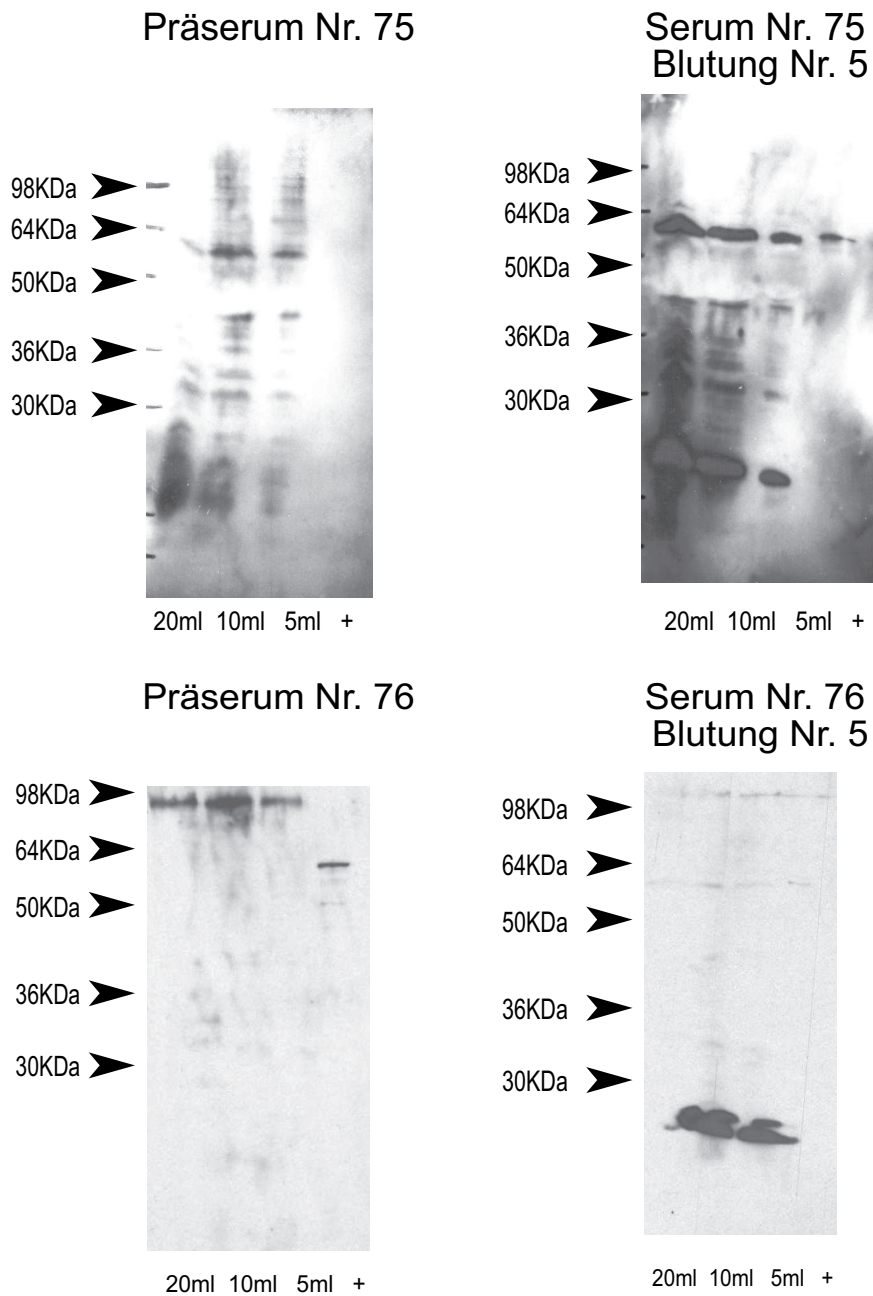


Abbildung 3.17: Nachweis der Anfärbung von Histonen durch Serum Nr. 75 und 76. Aufgetragen sind 5, 10, 20 ml eines Zellkernpellets aus *D. discoideum* sowie die Fraktion Nr. 6 der Aufreinigung eines rekombinanten DdNrampB-Fragmentes als Positivkontrolle (+). Deutlich zu erkennen ist die starke Anfärbung eines ca 25 KDa großen Fragments, das ausschließlich im Serum Nr. 75 und 76 nach Immunisierung zu sehen ist.

Kapitel 4

Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei Nramp Homologe in *D. discoideum* nachgewiesen und analysiert. Beide Proteinsequenzen zeigen große Ähnlichkeit zu Nramp aus anderen Organismen, was sich besonders an der Topologie der Transmembrandomänen zeigt. Da die Homologien über die Suche in Genom-Datenbanken erfolgte und nicht an cDNA-Bibliotheken, lag die Schwierigkeit besonders in der korrekten Bestimmung der 5' und 3' Enden, sowie des Nachweises von Introns in den DdNramp-Genen. Während die Längen der abgeleiteten DdNramp-Sequenzen gut mit denen anderer Nramp-Proteine übereinstimmen, ist vor allem das 5' Ende von DdNrampA vor Beginn der Transmembranregionen im Vergleich zu anderen Nramps auffällig lang und enthält zahlreiche AAT und CAA-Wiederholungen. Diese Asparagin- bzw. Glutaminreste lassen sich in anderen Organismen nicht finden. Jedoch ist die entsprechende Region, wie aus den angefertigten Hydrophobizitätsanalysen hervorging, auch hier relativ hydrophil. Generell ist die N-terminale Region der Nramps im Gegensatz zu den Membrandurchgängen in der Evolution nur wenig konserviert [11]. Genau dieser Proteinabschnitt scheint aber für die Funktion der Nramps entscheidend und für die Spezifität für bestimmte Ionen zuständig sein [87]. Das nächste in Frage kommende und der Poly-N und Poly-Q Region folgende Startcodon stimmt mit dem Startcodon von MntH1 aus *P. aeruginosa* überein, liegt aber innerhalb einer vorhergesagten Transmembranregion. Dieses ATG ist deshalb als Beginn

für DdNrampA (und auch *mntH1*) sehr unwahrscheinlich [52]. Gestützt wird die Lokalisation des in dieser Arbeit postulierten Startcodons auch durch das Fehlen eines alternativen Startcodons in 5' Richtung, und das stark gehäufte Vorkommen von Thymidin- und Adenosinresten aufwärts des Startcodons, dem Kennzeichen einer intergenischen Sequenz im *D. discoideum*-Genom. Das DdNrampB Startcodon folgt ebenfalls einer solchen A und T reichen Region und liegt kurz hinter einer Sequenz der Abfolge AATAAAA. Das Intron von DdNrampB ist durch die flankierende Konsensussequenz für Introns gekennzeichnet und mit seiner Länge (138 Bp) und Lage kurz hinter dem Startcodon typisch für *D. discoideum*.

Eine der hervorstechendsten Eigenschaften der Proteine aus der Nramp-Familie ist ihr Gehalt an hydrophoben Domänen, die für die Bildung von bis zu 12 Membrandurchgängen zuständig sind. Eine besonders starke Konzentrierung der zwischen den Spezies konservierten Aminosäuren findet sich in den transmembranalen Domänen, interessanterweise vor allem auf der der Lipidmembran abgewandten Seite. Diese Aminosäuren sind anscheinend für den Ionentransport im engeren Sinne zuständig, während sich die Aminosäuren auf der der Lipidmembran zugewandten Seite der Zusammensetzung der Membran im jeweiligen Organismus angepasst haben und so stärker variabel sind [11]. Auch in *D. discoideum* fällt die hohe Homologie zu anderen Arten auf, die vor allem auf die Membrandurchgänge beschränkt ist. Die hydrophileren Regionen zwischen diesen stark hydrophoben Bereichen sind von Spezies zu Spezies unterschiedlich lang. So befindet sich ein längerer Abschnitt (bis zu 30 AS) zwischen Transmembranregion (TM) 6 und 7, sowie ein kürzerer zwischen TM 4 und 5 (bis zu 6 AS), der sich nur bei den Nramp Homologen von *S. cerevisiae* SMF1 und SMF2 findet. Auch beim Menschen existiert ein nur bei Säugern nachzuweisender Abschnitt von ca. 30 AS zwischen TM 7 und 8, der eine mögliche Glykosylierungsstelle enthält. *D. discoideum* besitzt keine auffälligen Abweichungen von der sonst verbreiteten Länge der zytoplasmatischen/ vesikulären

Schleifen, unterscheidet sich aber wie bereits erwähnt durch das Vorkommen hydrophiler Asparagin- bzw. Glutaminreste in den N- und C-terminalen Enden der DdNramp-Proteinsequenz. In ihrer Analyse sagen Cellier *et al.* 10 bis 12 Transmembranregionen (TM) für die untersuchten Nramp-Homologe voraus [11]. Dabei fehlt der Hefe mit insgesamt 11 TMs z.B. der letzte der 12 Membrandurchgänge. Nach der hier verwendeten Vorhersage soll DdNrampB ebenfalls nur 11 TMs bilden. Die im Vergleich zu den anderen nicht gefundene TM liegt dabei im Bereich des dritten bzw. vierten Membrandurchgangs. Die Vorhersage nahe benachbarter Transmembran-Domänen ist allerdings schwierig, und es ist nicht auszuschließen, dass auch DdNrampB 12 Membrandurchgänge besitzt. Somit würde sich sowohl der N-Terminus als auch der C-Terminus, wie bei anderen Organismen vorhergesagt, in zytoplasmatischer Umgebung befinden. Da dem N- und C-Terminus der Nramp-Proteine eine Beteiligung an der Regulation der Nramp-Aktivität z.B. durch Phosphorylierung zugesprochen wird [87], wäre eine Lokalisation im Zytoplasma auch aus funktionellen Aspekten gesehen stimmiger als die Position im Vesikellumen.

Beim Versuch der phylogenetischen Einordnung der DdNramp-Proteine fand sich eine Assoziation von DdNrampA mit prokaryotischen Nramp Homologen. DdNrampB befindet sich dagegen näher an den Nramps aus Säugetieren und Pflanzen. Selbst bei Vernachlässigung der in der Evolution wenig konservierten N-Termini bleibt diese Zuordnung erhalten. Cellier *et al.* [10] schlagen in ihrer Arbeit ein Modell vor, in dem Nramp-Gene ursprünglich von Prokaryoten auf die Eukaryoten übergangen. Da eine Gruppe von prokaryotische Nramps aber den eukaryotischen Nramp-Homologen verwandt zu sein scheint, soll diese später in der Evolution durch horizontalen Gentransfer wieder auf die Prokaryoten übertragen worden sein. *D. discoideum* kann sich, wie Amöben allgemein, durch Phagozytose von Bakterien ernähren, aber gleichzeitig auch von pathogenen, intrazellulären Erregern infiziert werden [42]. Daher bestünde die Möglichkeit, dass ein solcher Transfer zwischen Nramp-Genen auf Ebene

der Amöben stattgefunden hat und so den niedrigen Grad der Verwandtschaft der beiden Nramp Homologe in *D. discoideum* erklärt. Während die beiden Nramp-Homologe in *Caenorhabditis elegans* z.B. zu 74,6% identisch sind, zeigen die *D. discoideum* Homologe nur 32% Identität. Zur weiteren Abklärung dieser Hypothese wäre aber eine genauere Untersuchung der Zuordnung der Dd-Nramps zu den von Cellier *et al.* vorgeschlagenen Gruppen von prokaryotischen Nramps (A-C) notwendig. Zusätzlich wäre dazu die Analyse der Verwandtschaft zu Nramp-Homologen aus anderen Amöbenspezies, über deren Vorhandensein noch keine Daten vorliegen, sinnvoll.

Bei Anfertigung der Northern-Blots zum Nachweis der DdNramp mRNA fiel auf, dass *D. discoideum* Zellen aus axenischer Anzucht in Nährmedium einen relativ geringen Gehalt an DdNramp mRNA besitzen. Lediglich in diesen „t₀“ Zellen, die noch als einzelne Zellen vorliegen und Nahrung durch Phagozytose bzw. durch Pinozytose aufnehmen, ließ sich eine im Vergleich zu anderen Entwicklungszeitpunkten stärkere Expression nachweisen. Wie aus zahlreichen Arbeiten bekannt, ist bei Säugern Nramp auf der Oberfläche von Phagosomen zu finden. Nramp1 wird vor allem auf Phagosomen, Nramp2 auf Endosomen und zusammen mit Transferrin auf der Zelloberfläche gefunden [36]. Eine vermehrte Expression in einem Stadium, in dem die *D. discoideum*-Zellen Nahrung aufnehmen, würde für eine ähnliche Lokalisation und damit eventuell auch vergleichbare Funktion der Nramp-Homologe in *D. discoideum* sprechen. Wie Zhong *et al.* zeigen konnten, nimmt die Menge an nachweisbarer mRNA von Nramp1 und Nramp2 in Makrophagen zu, wenn diese mit intrazellulären Erregern der Spezies *M. avium* infiziert werden [99]. Um zu untersuchen, ob DdNramp wie bei Säugern an der Abwehr intrazellulärer Erreger beteiligt ist, wäre es deshalb von Interesse, den mRNA Gehalt in infizierten Zellen mit dem nicht infizierter Zellen zu vergleichen.

Mehrere Arbeitsgruppen waren bereits in der Lage, Antikörper gegen verschiedene Bereiche von Nramp-Homologen aus unterschiedlichen Organismen

herzustellen [6, 36, 87]. Dabei wurden zumeist Regionen aus dem Bereich des N-Terminus der Nramp-Proteine verwendet, da diese Proteinabschnitte große Spezifität der Antisera erwarten lassen und einen großen Bereich außerhalb der unzugänglichen Membrandurchgänge darstellen. In einem ersten Versuchsansatz versuchten wir, große Teile der DdNramp-Homologe in *E. coli* zu exprimieren. Möglicherweise führte aber die Expression eines Protein mit so zahlreichen hydrophoben Abschnitten selbst bei noch nicht erfolgter Induktion zu einer Lyse der Bakterien. Es können aber auch Probleme bei der Aufreinigung bzw. Verarbeitung dazu geführt haben, dass keine erfolgreiche Produktion nachgewiesen werden konnte. Im zweiten Versuchsansatz wurden kurze, hydrophile Teile der DdNramps in Form von künstlich hergestellten Peptiden für die Immunisierung verwendet, die allerdings ebenfalls enttäuschend verliefen. Da Nramp-Homologe zum Teil erheblich posttranslational modifiziert werden und damit ihr Molekulargewicht verändern, war es schwer zu ermitteln, in welchem Größenbereich die Reaktion gegen die DdNramp-Homologe zu erwarten ist. So erkannte das von Gruenheid *et al.* [36] hergestellte anti-Nramp2 Serum eine 90-100 KDa große Bande, obwohl das Molekulargewicht von Nramp2 theoretisch bei 62300 Da liegt. Damit blieb oft unklar, ob es sich bei den im Western-Blot beobachtbaren Banden um DdNramp, seine Abbauprodukte oder unspezifische Reaktionen handelte. Da Nramp1 aus Säugetieren aus der Umgebung des Kerns zu den entstehenden Phagosomen rekrutiert wird [38], bestand zunächst die Möglichkeit, dass es sich bei in der Immunfluoreszenz den angefärbten Kernen um DdNrampB handelt, das sich in nicht aktivierten Zellen in Kernnähe aufhält. Die Analyse der Präparate unter einem konfokalen Mikroskop zeigte jedoch eindeutig eine Anfärbung innerhalb der Kernmembran, was die vorgenannte Hypothese widerlegte. Die folgenden Experimente legten nahe, dass es sich um eine Antikörperreaktion gegen Histone handelte, die sich ungewöhnlicherweise in beiden Kaninchen parallel ausbildete.

Zusätzlich zur Reaktion mit den Kernen aus *D. discoideum* Zellen wurde auch eine Anfärbung von ringförmigen Strukturen mit DAPI gefärbtem Inhalt unterhalb der Zellmembran beobachtet. Die Anzahl der angefärbten Organellen deutete nicht auf die Anfärbung von Mitochondrienmembranen im Sinne einer unspezifischen Bindung des Antikörpers hin. Vielmehr wurde die Anfärbung von Vesikeln angenommen, die einzelne DAPI positive Bakterien enthielten. Da sich HsNramp1 auf der Oberfläche von Phagosomen befindet [38], die z.B. inkorporierte Erreger enthalten, wurde spekuliert, ob es sich hier um eine Nramp-spezifische Reaktion mit Bakterienphagosomen handelte. Sicherlich sind hier in Zukunft noch weitere Experimente mit *D. discoideum* Zellen notwendig, die zu verschiedenen Zeitpunkten nach Inkubation mit Bakterienzellen fixiert wurden. Vor allem die Isolation von *D. discoideum* mit GFP-markiertem DdNramp würde hier eine detaillierte Untersuchung der Phagosomen-Prozessierung und der Nramp-Lokalisation im Laufe der Infektion ermöglichen.

Trotz der vermeintlich eindeutigen Strukturmerkmale eines Ionenkanals ist die genaue Funktion von Nramp Homologen in vielen Organismen noch nicht geklärt. So ist über das malvolio (*mlv*) Protein in *Drosophila melanogaster* zwar bekannt, dass es das Geschmacksverhalten der Fruchtfliege beeinflusst, über den Zusammenhang zwischen den von *mlv* transportierten Metallionen und dem Geschmackssinn konnte dagegen nur spekuliert werden [17]. In Säugtieren ist zwar eine Rolle von Nramp1 bei der Abwehr intrazellulärer Erreger gezeigt worden, die genaue Wirkung der Metallionen bei diesen Infektionen ist aber noch nicht endgültig bekannt [27]. Es wurde sowohl ein inhibitorischer Effekt von Eisen-Ionen auf Erreger beschrieben, als auch umgekehrt eine Hemmung des Wachstums der Erreger durch Entzug von Metallionen durch Nramp-Transport [35, 49].

Über die Funktion der Nramp Homologe aus *D. discoideum* kann ebenso nur spekuliert werden. *D. discoideum* Zellen können wie auch andere Amöbenspezies durch eine Vielzahl von Erregern infiziert werden, darunter auch patho-

gene Bakterien wie *Legionella pneumophila* [42]. Da sich die Virulenz von intrazellulären Erregern wie *M. avium* erhöht, nachdem sie erfolgreich Amöben der Spezies *A. castellanii* infiziert haben [12], ist die Vermutung naheliegend, dass sowohl Amöben als auch menschliche Makrophagen mit prinzipiell denselben Mechanismen versuchen, eine Infektion durch intrazelluläre Erreger zu kontrollieren. Eine mögliche Rolle von DdNramp wäre die Hemmung der Vermehrung intrazellulärer Erreger in den Zellen. Dabei könnte es sich desselben Mechanismus bedienen wie Nramp1 aus Säugetieren, das den Erregern überlebenswichtige Metallionen aus dem Phagosom entzieht. An der Beseitigung reaktiver Sauerstoffspezies, wie sie in aerober Umgebung entstehen, sind auch in *D. discoideum*-Zellen Enzyme wie Katalasen oder die Superoxid-Dismutase beteiligt, auch wenn es daneben noch andere Mechanismen der Elimination zu geben scheint [31]. Katalase und Superoxid-Dismutase besitzen als Kofaktor in der Regel divalente Kationen wie Eisen, Kupfer und Zink, die unter Beteiligung von DdNramp in die Zelle transportiert werden könnten. Um den genauen Zusammenhang zwischen Infektion mit intrazellulären Erregern und der Funktion von DdNramp-Homologen zu untersuchen, wären Experimente notwendig, in denen infizierte *D. discoideum* Zellen verwendet werden. Von besonderem Interesse wären sicherlich der Gehalt an DdNramp mRNA sowie die Lokalisation der DdNramp-Homologe in infizierten Zellen. Die Konstruktion von *D. discoideum* Zellen mit einem „knock-out“ entweder des DdNrampA-Gens, des DdNrampB oder beider Homologe zusammen wäre ebenfalls für die weitere Charakterisierung von Interesse. Vor allem die Auswirkung auf die Infektionsrate durch intrazelluläre Erreger in DdNramp-minus Zellen könnte weitere Einblicke in die Funktionsweise der DdNramp-Homologe bieten.

Kapitel 5

Material und Methoden

5.1 Material

5.1.1 Enzyme, Antikörper, Inhibitoren und Antibiotika

Enzyme für die Molekularbiologie

Alkalische Phosphatase aus Kälberdarm	Roche
DNA-Polymerase I (Klenow-Fragment)	Roche
Lysozym	Sigma
Proteinase K	Roche
„Prime-it“-Kit	Stratagene
Restriktionsendonukleasen	Roche Diagnostics, New England Biolabs, Promega
RNase A	Sigma
T4 DNA-Ligase	Promega, Roche Diagnostics
Pfu-Polymerase	Stratagene
Taq-Polymerase	Amersham, Eurogentec

Antikörper

AK zum Nachweis von MBP (Maltose-Binding-Protein)	Eigener monoklonaler Antikörper (Ralph Gräf)
Ziege-anti-Kaninchen IgG Antikörper, gekoppelt an Cy3	Dianova
Ziege-anti-Kaninchen IgG Antikörper, gekoppelt an Peroxidase	Dianova

Inhibitoren

Benzamidin	Sigma
Diethylpyrocarbonat (DEP)	Sigma
Proteaseinhibitorcocktail (#P2714)	Sigma
RNasin (RNase-Inhibitor; #N251A)	Promega

Antibiotika

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

5.1.2 Reagenzien

Soweit nicht anders erwähnt, stammen die verwendeten Laborchemikalien von Merck, Roth, Sigma und Amersham hatten den Reinheitsgrad „p.a.“.

Agarose (SeaKem ME)	FMC Bioproducts
Bacto-Agar, -Pepton und -Trypton	Difco
DE52 (Diethylaminoethyl-Cellulose)	Whatman
Hefeextrakt, Pepton, Proteose-Pepton	Oxoid
IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalacto-pyranosid)	Gerbu
Phenol	Appligene
Triton X-100 („surfact amps“ oder „membrane-grade“)	Pierce oder Roche
„Yeast Nitrogen Base w/o Aminoacids“ (YNB)	Difco
X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galactopyranosid)	Gerbu
Key Hole Limpet Hämocyanin (KLH)	Sigma

5.1.3 Medien

Alle verwendeten Medien und Puffer wurden mit deionisiertem Wasser angesetzt, das über eine Ionenaustauschanlage (Millipore) gereinigt worden war. Die Medien wurden bei 120°C autoklaviert, Antibiotika wurden nach Abkühlen des Mediums bei etwa 50°C zugegeben.

Medien für die *D. discoideum*-Kultur**AX-Medium (pH 6,7) [13]**

14,3 g	Pepton
7,15 g	Hefeextrakt
50,0 mM	Glucose
3,5 mM	Na ₂ HPO ₄
3,5 mM	KH ₂ PO ₄

mit H₂O (bidest.) auf 1 l auffüllen

SM Agarplatten (pH 6,5)

9,0 g	Agar
10,0 g	Pepton
50,0 mM	Glucose
1,0 g	Hefeextrakt
4,0 mM	MgSO ₄
16,0 mM	KH ₂ PO ₄
5,7 mM	K ₂ HPO ₄

mit H₂O (bidest.) auf 1 l auffüllen

Soerensen Phosphatpuffer (pH 6,0) [59]

14,6 mM KH_2PO_4
2,0 mM Na_2HPO_4
gegebenenfalls autoklavieren

Phosphatagarplatten (pH 6,0)

15,0 g Bacto-Agar

mit Soerensen-Puffer auf 1 l auffüllen

HL-5 Medium (pH 7,5)

10,0 g Hefeextrakt
20,0 g Proteose Pepton
50,0 mM Glucose
8,5 mM KH_2PO_4
1,25 mM Na_2HPO_4
mit H_2O (bidest.) auf 2 l auffüllen

Salzlösung („salt solution“)

10,0 mM NaCl
10,0 mM KCl
2,7 mM CaCl_2

Medien für die *E. coli* Kultur**LB-Medium (pH 7,4) [72]**

10,0 g Bacto-Trypton
5,0 g Hefeextrakt
86,0 mM NaCl
mit H_2O (bidest.) auf 1 l auffüllen

Der pH wurde mit NaOH eingestellt. Für Agarplatten wurden dem Medium 1,5% (w/v) Agar zugesetzt. Bei Bedarf wurden 50 mg/l Ampicillin und/oder 25 mg/l Kanamycin zugesetzt. Für Farbindikatorplatten wurden pro Platte 70 μl einer 0,1 M IPTG-Lösung und 30 μl einer X-Gal-Lösung (2% in Dimethylformamid) ausplattiert.

5.1.4 Puffer und Lösungen

Puffer und Lösungen, die hier nicht aufgeführt sind, finden sich im Kapitel 5.2 unter den jeweiligen Methoden.

10 x Tris/Boratpuffer (TBE) (pH 8,3) TE-Puffer (pH 8,0)

890 mM	Tris	10,0 mM	Tris/HCl
890 mM	Borsäure	1,0 mM	EDTA
20 mM	EDTA		

TEDABP (pH 8,0)

10,0 mM	Tris/HCl
1,0 mM	EGTA
1,0 mM	DTT
0,02%	NaN ₃

vor Gebrauch zugeben:

1,0 mM	Benzamidin
0,5 mM	PMSF

PBS (pH 7,0)

70 mM	Na ₂ HPO ₄
30 mM	KH ₂ PO ₄
150 mM	NaCl
0,1%	NaN ₃

10 x NCP-Puffer (pH 8,0)

100,0 mM	Tris/HCl
1,5 M	NaCl
5,0 ml	Tween 20
0,02%	NaN ₃

mit H₂O (bidest.) auf 1 l auffüllen

5.1.5 Bakterienstämme

E. coli JM83	Vieira und Messing [93]
E. coli MC1061	[95]
E. coli M15	(Qiagen)
E. coli BL21	Studier und Moffat [80]
E. coli BL21 Lys E	Studier [81]
E. coli TOP10F'	Invitrogen Ltd., UK
Klebsiella aerogenes	Williams und Newell [97]

5.1.6 *Dictyostelium discoideum* Stämme

AX2-214 (axenisch und auf Bakterien wachsender Abkömmling des Freilandisolates NC4) Raper [68]

5.1.7 Vektoren

pDexRH	Faix <i>et al.</i> [24]
pDexRH C-GFP	[96]
pMal	Maina <i>et al.</i> [58]
pUC18/19	Yanisch-Perron <i>et al.</i> [98]
pUCBsr δ Bam	Adachi <i>et al.</i> [2]
pT7-7	Tabor [86]
PCR 2.1-TOPO	Invitrogen Ltd., UK

5.1.8 Radiochemikalien

$[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-dATP}$ (10 mCi/ml)	ICN
---	-----

5.1.9 Geräte

Analysenwaage AC 210P	Sartorius
Axiophot Mikroskop	Zeiss
Brutschrank (Bakterien)	Memmert
CCD-Kamera C5985-10	Hamamatsu
Diavert Mikroskop (inverse Anordnung)	Leitz
Dounce Homogenisator	Braun
EagleEye II	Stratagene
Econosystem	Biorad
Elektroporationsgerät	Biorad
Entwicklermaschine Curix 60	Agfa
Fraktionenkollektor RediFrac	Pharmacia
Hybridisierungssofen	Biometra
Konfokale Mikroskopie DM IRBE (invers)	Leica
Kühlaggregat Multistar	Fryka
Laborwaage LC 4800P	Sartorius
Lumineszenz Spektrometer Aminco Bowman	Sopra GmbH
Nuclepore-Filter	Corning Costar
PCR-Thermocycler UNO	Biometra
Peristaltische Pumpe P1	Pharmacia
PosiBlot-Apparatur	Stratagene
pH-Meter 643	Knick
Photometer Ultrospec III	Pharmacia
Proteintransfer Trans-BlotSD	Biorad
Quarzküvetten Infrasil	Hellma
Rührer Combimag RET	Ika
Flachbettscanner ScanJet 4c	Hewlett Packard
Smart-System	Pharmacia
Speed-vac-Konzentrator	Bachhofer

Ultrafiltration Centricon	Amicon
Vortex	Merck
Wasserbäder, Schüttler	GFL

5.1.10 Sonstige Materialien

3MM Filterpapier	Whatman
Nitrozellulose BA85	Schleicher & Schüll
Nylonmembran	Pall
Polyallomer-Röhrchen 1,5 ml	Beckman
Röntgenfilm X-omat	Kodak
15 ml / 50 ml Röhrchen	Falkon
1,5 ml Reaktionsgefäße	Eppendorf

5.1.11 Zentrifugen und Rotoren

Zentrifugen

Optima TL100 Ultrazentrifuge, L8-70M Ultra- zentrifuge, G6-SKR, J2-21M/E, J6-HC	Beckman
Tischzentrifuge 5415	Eppendorf

Rotoren

Ti 70, JA 14.1, Ti 20.1, Ti 45, JA 20, SW40, TLA 100.3	Beckman
---	---------

5.1.12 Computerprogramme zur Sequenzanalyse und Daten- darstellung

BioEdit v.4.8.8	Hall [43]
BLAST	Altschul [5]
L ^A T _E X- Textverarbeitung	Leslie Lamport
Photoshop 5.5, Illustrator 8.01	Adobe Systems Inc.
Phylip Phylogeny Package 3.2	Felsenstein [25]
UWGCG-Programmpaket (University of Wis- consin Genetics Computer Group)	Devereux <i>et al.</i> [19]

5.2 Methoden

5.2.1 *D. discoideum* Kulturen

Anzucht in Flüssigmedium Der Wildtyp-Stamm AX2 wurde mit Sporen oder von SM-Platten in AX-Medium oder HL-5 Medium angeimpft [13]. Die Generationszeit betrug bei 21°C und 150 UpM etwa 10 h. Zur Anzucht größerer Zellmengen für die Proteinreinigung wurden Zellen in 4 x 2,5 l Kulturen bis zu einer Dichte von 5×10^6 bis maximal $1,2 \times 10^7$ Zellen/ml herangezogen und durch Zentrifugation geerntet. Die Ausbeute an Zellen aus 10 l Kulturen lag bei etwa 100 g Nassgewicht. Für zellbiologische Untersuchungen wurden die Zellen bis maximal 5×10^6 Zellen/ml angezogen, um ein Übergehen in die stationäre Phase zu vermeiden.

Anzucht auf Agarplatten Zum Herstellen von Massenplatten wurden SM-Agarplatten verwendet. Hierzu wurden je 0,1 ml einer dichten *K. aerogenes* Suspension (in Salzlösung) auf SM-Platten ausgestrichen, die *Dictyostelium*-Zellen ausgebracht und die Platten bei 21°C ca. 2 Tage inkubiert. Die Generationszeit betrug hierbei 3-4 h. *D. discoideum* Kolonien zeigen sich als klare Fresshöfe („plaques“) auf dem Bakterienrasen.

5.2.2 Entwicklung von *D. discoideum*

AX2-Zellen wurden axenisch bis zu einer Dichte von $3-5 \times 10^6$ Zellen/ml („log-phase“) kultiviert, geerntet (200 g, 5 min, 4°C), dreimal mit kaltem Soerensen-Phosphatpuffer (pH 6,0) gewaschen und auf eine Dichte von 8×10^7 Zellen/ml mit Phosphatpuffer eingestellt. Auf frisch gegossenen Phosphatagarplatten (\varnothing 90 mm, 17 mm) wurden dann 8×10^8 Zellen/Platte ausgebracht. Die Zellen durften 15 min absitzen, dann wurde der klare Überstand vorsichtig abgossen und der Rest mit einem Tuch abgesaugt. Die Platten wurden nun bei 21°C inkubiert. Die Zellen wurden dann zu den jeweiligen Entwicklungszeitpunkten mit kaltem Soerensen-Phosphatpuffer ab gespült.

5.2.3 Sporenkonservierung

Axenisch gewachsene Zellen wurden durch 10 min Abzentrifugieren bei 200 g geerntet, einmal mit kaltem Soerensen-Puffer gewaschen und auf eine Dichte von 2×10^8 Zellen/ml resuspendiert. Je 500 μ l der Suspension wurden auf Phosphatagarplatten ausgebracht. Die Zellen entwickelten sich innerhalb von 2-3 Tagen und bildeten Fruchtkörper. Die Sporen jeder Agarplatte wurden durch kräftiges Abklopfen in den Deckel der Petrischale geerntet, in 10 ml kaltem Soerensen-Puffer aufgenommen, auf 1 ml Aliquots verteilt (2,2 ml Nunc-Einfrierröhrchen) in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C gelagert. Zum Animpfen wurde ein Aliquot aufgetaut (bei RT) und in AX-Medium gegeben. Nach drei Tagen bei 21°C und 150 UpM hatte diese Vorkultur eine Dichte von ca. 5×10^6 Zellen/ml.

5.2.4 Einfrieren von *Dictyostelium*-Zellen

Zur Konservierung von *Dictyostelium*-Zellen wurden axenisch gewachsene Zellen geerntet und mit einer Dichte von 1×10^8 Zellen/ml in eiskaltem Einfriermedium (AX-Medium oder HL-5 Medium + 5% (v/v) DMSO) aufgenommen. Die Zellsuspension wurde in 1 ml Aliquots auf vorgekühlte Einfrierröhrchen verteilt (Nunc: 2,2 ml). Ein Messingblock (3,25 kg) wurden auf 4°C vorgekühlt, mit den Ampullen beschickt und bei -70°C aufbewahrt. Die Ampullen wurden nach ca. 15 h in flüssigem Stickstoff oder bei -70°C gelagert. Zur Revitalisierung der Zellen wurde eine Ampulle unter fließendem, kaltem Wasser schnell aufgetaut, die Zellen wurden sofort einmal mit 20 ml kaltem AX-Medium gewaschen und der Inhalt in eine Petrischale mit 10 ml AX-Medium überführt. Bei Transformanten wurde nach 24 h das Medium gewechselt und das geeignete Selektionsmittel zugegeben.

5.3 Molekularbiologische Methoden

5.3.1 Präparation von Plasmid-DNA

Präparation von Plasmid-DNA nach Holmes und Quigley [45] Bakterienkulturen von LB-Platten oder aus Dauerkulturen wurden dazu verwendet, ca. 2ml einer Flüssigkultur in LB-Medium mit dem gewünschten Selektionsmarker anzupflanzen. 1,5 ml der Übernachtskultur wurde in einer Eppendorf-Tischzentrifuge abgeerntet (10000 UpM, 15 sec, RT), der Überstand verworfen und das Bakteriensediment in 200 μ l STET/Lysozym-Puffer suspendiert. Die Suspension wurde 1 min im Wasserbad gekocht („boiling-prep“), danach wurden durch Zentrifugation in einer Eppendorf-Tischzentrifuge die unlöslichen Bestandteile sedimentiert (13.000 UpM, 10 min, RT) und das Sediment anschließend mit einem sterilen Zahnstocher entfernt. Die Nukleinsäuren im Überstand wurden mit 200 μ l Isopropanol für 5 min bei RT gefällt und in einer Eppendorf-Tischzentrifuge sedimentiert (13.000 UpM, 15 min, RT). Die DNA wurde mit Ethanol (80%) gewaschen, bei RT getrocknet und in 50 μ l TE-Puffer aufgenommen.

STET-Puffer (pH 8,0)

50 mM	Tris/HCl
50 mM	EDTA
0,5%	Triton X-100
8%	Saccharose
1 mg/ml	Lysozym (vor Gebrauch zugeben)

Präparation von Plasmid-DNA nach der Qiagen-Methode Zur Präparation von Plasmid-DNA wurde je nach benötigter Plasmid-DNA Menge entweder das kommerziell erhältliche Qiagen Mini-, Midi- oder Maxi-Kit verwendet.

Qiagen Mini Spin Kit Für die Herstellung von Plasmid-DNA in kleineren Mengen wurden 5ml Bakterienkultur für „high-copy“ Plasmide bzw. 10ml für „low-copy“ Plasmide als Ausgangsmaterial verwendet. Die Kultur wurde bei 18.000g für 10 min geerntet und der Überstand verworfen. Die Zellen wurden

in 250 μ l Puffer P1 resuspendiert und in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt. Durch Hinzufügen von 250 μ l Puffer P2 wurden die Zellen in einem alkalischen Milieu lysiert. Die Proben wurden durch mehrfaches Umschütteln gemischt und 3 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 350 μ l eisgekühltem Puffer P3 wurden die Zellen für 5 min auf Eis gestellt und anschließend bei 14.000g in einer Eppendorf Tischzentrifuge für 10 min zentrifugiert. Der so erhaltene Überstand wurde durch kurze Zentrifugation auf ein vom Hersteller bereitgestelltes „Quia-gen spin Mini“ Säulchen geladen. Die Säulen wurde daraufhin einmal mit 500 μ l Puffer QBT und einmal mit 750 μ l Puffer QC gewaschen. Zum Erreichen eines schnelleren Flusses durch die Säule wurden die Versuchsansätze dabei jedes Mal kurz anzentrifugiert. Zuletzt wurde die auf der Säule gebundene Plasmid-DNA mit Hilfe von 40 μ l Puffer EB eluiert.

Quiagen Midi- und Maxi-Kit Die Angaben im Text beziehen sich auf das Quiagen Midi Kit, die verwendeten Volumina für das Quiagen Maxi-Kit befinden sich in Klammern. Gemäß den Anweisungen des Herstellers wurde eine Bakterienkultur in 25 ml (400 ml) LB-Medium mit 50 μ g/ml Ampicillin über Nacht bei 37°C geschüttelt. Die Zellen wurden durch Zentrifugation geerntet und in 4 ml (10 ml) gekühltem Puffer P1 resuspendiert. Durch Zugabe von 4 ml (10 ml) P2 wurden die Zellen einer alkalischen Lyse unterzogen. Die Ansätze wurden durch Umschütteln gemischt und für 3 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden 4 ml (10 ml) eisgekühlter Puffer P3 zugegeben, die Proben gemischt und für 15 min (20 min) auf Eis gestellt. Danach wurden die Proben abzentrifugiert (JA20 Rotor, 17.000 UpM, 30 min, 4°C), um Proteine und Zellbruchstücke zu sedimentieren. Das Sediment wurde verworfen und der Überstand, der die Plasmid-DNA enthielt, wurde mit Hilfe von mehreren Lagen Verbandmull von verbliebenen Proteinpräzipitaten gereinigt. Der nun klare Überstand wurde auf eine zuvor mit 5 ml Puffer QBT äquilibrierte „tip 100“ (tip 500)-Säule (Quiagen) aufgetragen. Anschließend wurde zweimal mit 10 ml

(30 ml) Puffer QC gewaschen und die Plasmid-DNA mit 5 ml (15 ml) Puffer QF eluiert. Die DNA wurde mit 0,7 Vol. Isopropanol gefällt und abzentrifugiert (JA20 Rotor, 12.000 UpM, 30 min, 4°C). Der Überstand wurde verworfen, das Sediment nach Waschen mit eiskaltem Ethanol (80% oder absolut) bei Raumtemperatur getrocknet und in 200 μ l (500 μ l) Puffer EB aufgenommen.

Puffer P1

50 mM Tris/HCl (pH 8,5)
10mM EDTA
100 μ g/ml RNase A

Puffer P2

200mM NaOH
1% SDS

Puffer P3

3mM K-Acetat (pH 5,5)

Puffer QBT

750 mM NaCl
50 mM MOPS (pH 7,0)
15% Isopropanol
0,15% TritonX-100

Puffer QC

1M NaCl
50 mM MOPS (pH 7,0)
15% Isopropanol

Puffer QF

1,25M NaCl
50 mM Tris/HCl (pH 8,5)
15% Isopropanol

Puffer EB

10mM TrisCl (pH 8,5)

5.3.2 Präparation chromosomaler DNA aus *D. discoideum*

Da *D. discoideum* einen hohen Gehalt an Kohlenhydraten und RNA besitzt, die bei der Reinigung die chromosomale DNA begleiten, wird die DNA aus angereicherten Zellkernen isoliert [64]. Um Scherkräfte zu vermindern, die eine physikalische Schädigung der DNA hervorrufen können, wurde im Verlauf der Präparation durch vorsichtiges Invertieren (nicht vortexen) gemischt. Ferner wurden die Spitzen der Pipetten vorne abgeschnitten, um die Öffnung zu vergrößern. 1-2x 10⁸ Zellen einer axenisch gewachsenen Kultur wurden zweimal mit eiskaltem Wasser gewaschen und das Zell-Sediment in 50 ml Kernlyse-Puffer resuspendiert. Durch diese Behandlung lysieren die Zellen, die Zellkerne bleiben jedoch intakt und werden bei 6000 g abzentrifugiert (JA20, 7500 UpM, 10 min, 4°C). Das weißliche Zellkern-Sediment wurde in 500 μ l SDS-Lysispuffer aufge-

nommen, mit 100 μl Proteinase K Lösung versetzt und 2-3 h bei 60°C inkubiert. Das Lysat wurde anschließend 2-3 x mit je einem Volumen Phenol/Chloroform durch vorsichtiges Mischen extrahiert. Durch Zugabe von 1/10 Vol. 2 M Na-Acetat (pH 5,2) und 2 Volumen Ethanol zur wässrigen Phase wurde die DNA präzipitiert und konnte mit einem Glashaken ausgedreht werden. Die DNA wurde in Ethanol gewaschen, kurz an der Luft getrocknet und in etwa 500 μl 1/10 TE-Puffer gelöst. Anschließend erfolgte eine Abschätzung der gewonnenen Menge an DNA durch eine photometrische Konzentrationbestimmung (OD_{260} von 1,0 entspricht 50 μg DNA; $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280} = 1,8$ bis 2,0).

Kernlyse-Puffer

10 mM	Mg-Acetat
10 mM	NaCl
30 mM	HEPES (pH 7,5)
10%	Saccharose
2%	Nonidet P40

auf 2 l mit H_2O (bidest.) auffüllen

SDS-Lysispuffer

0,7% SDS in TE-Puffer

Proteinase K

14,7 mg/ml

vor Gebrauch 30 min bei 37°C inkubieren

5.3.3 Verdau mit Restriktionsenzymen

Der Verdau von DNA mit Restriktionsenzymen erfolgte jeweils in dem vom Hersteller empfohlenen Puffersystem und unter den angegebenen Temperaturbedingungen. In der Regel wurden pro μg DNA 2-10 Enzymeinheiten (U) eingesetzt. In einem 50 μl Ansatz wurden 1-5 μg Plasmid-DNA für 1-5 h verdaut. Chromosomale DNA wurde in einem 100-200 μl Ansatz für 3-12 h verdaut. Die Vollständigkeit der Reaktion wurde auf einem Agarosegel kontrolliert.

5.3.4 Elektrophorese von DNA in Agarosegelen

Die elektrophoretische Auftrennung von DNA erfolgte nach Sambrook *et al.* [72] in Agarosegelen mit einem Agarosegehalt von 0,7% bis 1,2% (w/v), die in 1 x Tris-Borat-Puffer (TBE) angesetzt wurden. Laufpuffer und Gelpuffer waren

identisch. Die Gele wurden in Flachbett-Gelapparaturen verschiedener Größen (4 x 7 cm bis 20 x 20 cm, Eigenbau) gegossen. Die zu trennende DNA wurde mit 0,2 Vol. DNA-Probenpuffer versetzt und geladen. Die Trennung erfolgte bei 1-5 V/cm. Nach dem Lauf wurden die Gele in einer wässrigen Ethidiumbromid-Lösung (5 $\mu\text{g/ml}$) für 10-30 min gefärbt und 30 min in Wasser entfärbt. Die Gele wurden mit Hilfe des EagleEye-Systems fotografiert (UV-Licht = 312 nm).

DNA-Probenpuffer

40% Saccharose
0,5% SDS
0,25% Bromphenolblau
in TE-Puffer aufnehmen

DNA-Größenstandards:

„Gene Ruler Mix“: 10.000 Bp, 8000 Bp, 6000 Bp, 5000 Bp, 4000 Bp, 3000 Bp, 2500 Bp, 1500 Bp, 1500 Bp, 1031 Bp, 900 Bp

„Mass Ruler Mix“: 10.000 Bp, 8000 Bp, 6000 Bp, 5000 Bp, 4000 Bp, 3000 Bp, 2500 Bp, 1500 Bp, 1500 Bp, 1031 Bp, 900 Bp

5.3.5 Fragment-Isolierung aus DNA-Gelen

Fragment-Isolierung mit DE-81 Ionenaustauschpapier Zur Isolierung von DNA-Fragmenten wurde die DNA in Agarosegelen in Tris-Borat-Puffer aufgetrennt und nach der von Dretzen *et al.* [21] beschriebenen Methode isoliert. Das mit Ethidiumbromid angefärbte Gel wurde bei 312 nm betrachtet. Über und unter der zu isolierenden DNA-Bande wurde mit einer sterilen Skalpellklinge ein Schnitt gesetzt, in den dann je ein passendes Stück Anionenaustauschpapier DE-81 (Whatman) eingesetzt wurde. Da sich während der weiteren Elektrophorese kein Laufpuffer über dem Gel befinden durfte, wurde der Kontakt zwischen Gel und Puffer mit einem feuchten Whatman-Filterpapier hergestellt. Die Elektrophorese wurde so lange fortgesetzt, bis das DNA-Fragment vollständig an das DE-Papier gebunden hatte (30-45 min). Das Anionenaustauschpapier wurde in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß gelegt, dessen Boden durchbohrt und mit Glaswolle gestopft worden war. Darunter wurde ein zweites Eppendorfgefäß ge-

geben, um das Eluat aufzufangen. Das DE-Papier wurde viermal mit je 100 μ l Waschlösung gewaschen und die Waschlösung durch kurzes Zentrifugieren abgetrennt. Die Elution der DNA erfolgte durch Inkubation des DE-Papiers für jeweils etwa 5 min mit viermal 100 μ l Elutionslösung und nachfolgender Zentrifugation. Die DNA in den vereinigten Eluaten wurde dann durch Zugabe von 2 Volumina Ethanol gefällt.

Waschlösung (pH 7,5)		Elutionslösung (pH 7,5)	
10,0 mM	Tris/HCl	10,0 mM	Tris/HCl
1,0 mM	EDTA	1,0 mM	EDTA
0,1 M	LiCl	1,0 M	LiCl
		20%	Ethanol

Fragment-Isolierung aus DNA-Gelen nach der Qiagen-Methode Zur Isolierung und Reinigung von DNA-Fragmenten in der Größenordnung von 70 Bp bis 10 KB aus Agarosegelen wurde ferner der QIAquick Gel Extraktionskit (Qiagen) verwendet. Das DNA-Fragment wurde mit einem sauberen, scharfen Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und das Agarosestück in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt und abgewogen. Zu einem Volumen Gel (100 mg $\hat{=}$ 100 μ l) wurden 3 Volumina Puffer QG (QIAquick Gel Extraktionskit, Qiagen) zugegeben. Dann wurde die Agarose bei 50°C unter kontinuierlichem Schütteln des Reaktionsgefäßes inkubiert, bis sie vollständig geschmolzen war. Die Bindung der DNA an die QIAquick Membran ist nur im Bereich pH = 7,5 effizient. Der korrekte pH Bereich konnte dabei leicht durch die erhaltene gelbe Farbe des Puffer QG kontrolliert werden. Der Reaktionsansatz wurde nach dem Auflösen des Gelstücks mit 1 Volumen Isopropanol versetzt. Das Gemisch wurde auf die QIAquick Spin Säule aufgetragen, unter welche ein 1,5 ml Auffanggefäß gegeben wurde. Durch Zentrifugation mit einer Eppendorf-Tischzentrifuge (13.000 UpM, 1 min, RT) wurde die DNA an die Säulenmembran gebunden. Um Agarosereste zu entfernen, wurde die Säule mit 0,5 ml Puffer QG gewaschen. Anschließend wurde die Membran mit 0,75 ml Puffer PE (QIAquick Gel Extraktionskit, Qia-

gen) für ca. 3 min inkubiert und dann zentrifugiert (Eppendorf-Tischzentrifuge, 13.000 UpM, 1 min, RT). Durch nochmalige Zentrifugation wurde sichergestellt, dass Ethanolreste aus Puffer PE von der Säulenmembran entfernt wurden. Die DNA wurde mit 10 bis 50 μ l H₂O eluiert.

5.3.6 „Southernblotting“

Die als „Southernblotting“ bezeichnete Technik [79] dient dazu, die in Agarosegelen nach Größe getrennte DNA auf einer Nylonmembran zu immobilisieren. Durch Hybridisierung mit einer markierten DNA-Probe können dann spezifische Fragmente identifiziert werden. Das gefärbte und gemeinsam mit einem angelegten Lineal bei 312 nm fotografierte Gel wurde zunächst 20-30 min in 0,5 M NaOH denaturiert, kurz mit Wasser gespült und 30 min in 1 M Tris/HCl (pH 8,0) neutralisiert. Anschließend wurde das Gel für 20 min in 20x SSC äquilibriert.

Kapillarblot Der Transfer der DNA auf Nitrozellulose erfolgte in 20 x SSC für 18 h aufgrund von Kapillarkräften. Das Agarosegel lag auf Whatman 3MM-Papier mit Kontakt zu einem 20 x SSC Reservoir und wurde mit Nitrozellulose-Filter, Whatman 3MM-Papier und einem ca. 5 cm dicken Stapel von Saugpapier belegt und beschwert (ca. 0,5 kg). Nach dem Transfer wurden die Filter 10 min in 6 x SSC gewaschen, zwischen Saugpapier kurz getrocknet und zur Fixierung der Nukleinsäuren auf der Membran 90 sec auf einem UV-Schirm (312nm Wellenlänge) gelegt.

PosiBlot Eine alternative und zeitsparende Methode bestand in der Verwendung einer PosiBlot-Apparatur (Stratagene). Die Gele wurden denaturiert, neutralisiert und äquilibriert wie oben beschrieben. Zunächst wurde die Nylonmembran zurechtgeschnitten (auf jeder Seite 1 cm größer als das Gel), dann die Abdichtmaske (auf jeder Seite 0,3 cm kleiner als das Gel) und der Schwamm

(auf jeder Seite 1,5 cm größer als das Gel). Die Maske und der Schwamm können wiederverwendet werden. Der Schwamm wurde unmittelbar vor Beginn des Transfers mit 1 l 20x SSC gesättigt. Die Membran lag auf einem befeuchteten Whatman 3MM-Papier, darauf wurde die Abdichtmaske gelegt und vorhandene Luftblasen vorsichtig entfernt. Auf die Öffnung in der Maske wurde das Agarosegel gelegt, darauf zwei Lagen Whatman 3MM-Papier und der vollgesogene Schwamm. Hierauf wurde die Apparatur luftdicht verschlossen. Durch Anschluss einer Saugpumpe (Pressure Control Station, Stratagene) mit einer Saugspannung von 75 mm Hg wurde ein Unterdruck erzeugt, der einen Transfer innerhalb von 1 h ermöglichte. Nach Beendigung des Transfers wurden die Rest-Gele noch einmal bei 312 nm fotografiert, um die Vollständigkeit des Nukleinsäure-Transfers zu überprüfen. Trocknen und Fixation der DNA auf der Membran erfolgte wie oben beschrieben.

5.3.7 Radioaktive Markierung von DNA-Proben

DNA-Proben zur Hybridisierung von „Southern-“ oder „Northern-Blots“ wurden nach der „prime-it“ Methode hergestellt. Hierbei werden Zufalls-Oligonukleotidprimer an die zu markierende Einzelstrang-DNA-Sonde hybridisiert. Mit Hilfe des Klenow-Enzyms erfolgt die Neusynthese des komplementären Stranges unter Einbau des radioaktiven Isotops. 25 ng DNA wurden in ein steriles Eppendorfgefäß gegeben und mit autoklaviertem Wasser auf 24 μ l aufgefüllt. Nach Zugabe von 10 μ l „random oligonucleotide primer“ wurde die Probe 5 min im Heizblock bei 95°C denaturiert, danach sofort für 1 min auf Eis gestellt und dann kurz abzentrifugiert. Nach Zugabe von 10 μ l 5 x „dATP primer buffer“, 5 μ l [α -32P]-dATP, 1 μ l Klenow-Enzym und sorgfältigem Mischen wurde der Ansatz 2-10 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion durch Zupipettieren von 2 μ l „stop-mix“ beendet, und die nicht eingebauten Nukleotide wurden durch Zentrifugation (2000 UpM, 2 min) über eine 1 ml Sephadex-G50 Säule in TE-Puffer abgetrennt. Die markierte Probe wurde

5 min bei 100°C denaturiert und in etwa 7 ml Hybridisierungspuffer aufgenommen.

5.3.8 Hybridisierung mit radioaktiv markierten Proben

Die Hybridisierungsbedingungen entsprachen denen von Mehdy *et al.* [60]. Der Nitrozellulosefilter bzw. die Nylonmembran mit immobilisierter DNA oder RNA wurde in einer Hybridisierungsröhre für 1 h bei 37°C mit Hybridisierungspuffer vorhybridisiert. Die Vor-Hybridisierungslösung wurde entfernt, die DNA-Sonde in Hybridisierungspuffer zugegeben und bei 37°C für 18 h unter Drehen inkubiert. Die radioaktive Lösung wurde abgenommen und der Filter zunächst bei RT zweimal 10 min in 2 x SSC + 0,1% SDS und dann 1 h bei 37°C in Hybridisierungswaschpuffer gewaschen. Überschüssige Flüssigkeit wurde mit Whatman-Filterpapier abgesaugt, der Filter in eine Klarsichtfolie eingepackt und auf einem Röntgenfilm (X-omat AR-5) mit Verstärkerfolie bei -70°C exponiert.

Hybridisierungspuffer

50%	Formamid
1%	Na-Laurylsarcosinat
0,1%	SDS
4,0mM	EDTA (pH 7,2)
0,12 M	Na-Phosphatpuffer (pH 6,8)
2x	SSC
4x	Denhardts Reagenz

20 x SSC

3,0M	NaCl
10,3 M	NaCitrat

Hybridisierungswaschpuffer

50%	Formamid
1%	Na-Laurylsarcosinat
0,1%	SDS
4,0mM	EDTA (pH 7,2)
0,12 M	Na-Phosphatpuffer (pH 6,8)
2x	SSC

100x Denhardts Reagenz

3%	Ficoll400
2%	Polyvinylpyrrolidon
2%	Rinderserumalbumin

Für die Hybridisierung unter geringer Stringenz wurde Puffer mit 30% anstelle von 50% Formamid verwendet. Die Waschschrirte erfolgten wie oben beschrieben.

5.3.9 Isolierung von Gesamt-RNA aus *D. discoideum*

Zum Schutz vor RNasen wurden generell während des Arbeitens Handschuhe getragen und alle Lösungen mit DEP-behandeltem Wasser angesetzt (0,1% DEP, für mehrere Stunden rühren, autoklavieren). Es wurden ausschließlich sterile Plastikgefäße und Pipetten verwendet. Um eine Aussage über die Entwicklungsregulation der mRNA-Expression eines Gens machen zu können, wurde Gesamt-RNA aus vegetativen Zellen und verschiedenen Entwicklungsstadien isoliert.

Qiagen RNeasy Mini Kit 1-1,5 x 10⁷ Zellen wurden geerntet, 1 x mit kaltem, sterilem und 1 x mit DEP-behandeltem Wasser gewaschen und anschließend nach dem Qiagen RNeasy Kit Protokoll behandelt. Alle Zentrifugationsschritte erfolgten in einer Eppendorf-Tischzentrifuge. Die Zellen wurden mit 600 µl RLT-Puffer (aus Qiagen RNeasy Mini Kit) lysiert, zentrifugiert (14.000 UpM, 1 min, RT) und der Überstand danach in ein frisches Eppendorf-Reaktionsgefäß pipettiert. Es folgte eine weitere Zentrifugation für 3 min, der resultierende Überstand wurde wiederum in ein frisches Reaktionsgefäß transferiert und mit einem Volumen 70% Ethanol (in DEP-Wasser) versetzt. Diese Lösung wurde auf eine „RNA mini spin“-Säule gegeben und bei RT mit 10.000 UpM für 15 sec abzentrifugiert. Die Säulenmatrix wurde mit 700 µl RW1-Puffer (aus Qiagen RNeasy Mini Kit) und anschließend mit 500 µl RPE-Puffer (aus Qiagen RNeasy Mini Kit) gewaschen (10.000 UpM, 15 sec, RT), gefolgt von einem zusätzlichen Waschschrift mit RPE für 2 min. Um jegliche Ethanolreste zu entfernen, welche die folgende Elution behindern könnten, wurde die Säule nochmals bei maximaler Geschwindigkeit der Eppendorf-Tischzentrifuge für eine Minute zentrifugiert. Danach wurde unter die Säule ein neues Reaktionsgefäß gegeben und die RNA von der Membran mit 30-50 µl RNase-freiem Wasser (aus Kit) eluiert (10.000 UpM, 1 min, 4°C, 1-2 Elutionsschritte). Die Konzentration wurde photometrisch bestimmt. Eine OD₂₆₀ von 1,0 entspricht 40 µg RNA. Das

Verhältnis OD_{260}/OD_{280} sollte zwischen 1,9 und 2,0 liegen. Die RNA wurde bei -20°C gelagert.

5.3.10 Elektrophorese von RNA in Agarosegelen

Agarose in einer Endkonzentration von 1,2% wurde mit 148 ml DEP-Wasser und 20 ml 10 x RNA-Gelpuffer aufgekocht und auf 60°C abgekühlt. Dann wurden 32 ml einer 36%igen Formaldehyd-Lösung zugegeben, die Mischung in eine mit DEP-Wasser gespülten Flachbett-Gelapparatur (20 x 20 cm) gegossen und das Gel nach Erhärten mit RNA-Laufpuffer überschichtet. Die RNA wurde mit einem Volumen RNA-Probenpuffer versetzt, 10 min bei 65°C denaturiert und nach der Zugabe von 4 μl RNA-Farbmarker sofort auf das Gel aufgetragen. Die RNA wurde mit ca. 2 V/cm aufgetrennt.

10 x RNA-Gelpuffer (pH 8,0)		10 x RNA-Laufpuffer (pH 7,0)	
200 mM	MOPS/NaOH	200 mM	MOPS/NaOH
50 mM	Na-Acetat	50 mM	Na-Acetat
10 mM	EDTA	10 mM	EDTA

Die Puffer wurden vor Benutzung autoklaviert.

RNA-Probenpuffer		RNA-Farbmarker	
50%	Formamid	50%	Saccharose (RNase frei)
6%	Formaldehyd	0,25%	Bromphenolblau
10 $\mu\text{g}/\text{ml}$	Ethidiumbromid	in DEP-Wasser	
in 1 x RNA-Gelpuffer (pH 8,0)			

5.3.11 „Northernblotting“

Nach der Elektrophorese wurden die Gele im UV-Licht (312 nm) fotografiert, 5 min in DEP-Wasser und anschließend 25 min in 10 x SSC äquilibriert. Der Transfer auf Nylonmembran erfolgte in einem Zeitraum von 18 h in 20 x SSC aufgrund von Kapillarkräften (Kapillarblot). Das Agarosegel lag auf Whatman 3 MM-Papier mit Kontakt zu einem 20 x SSC Reservoir und wurde mit einer Nylonmembran, 3 Lagen Whatman 3MM-Papier und einem ca. 6 cm dicken Sta-

pel von Saugpapier belegt und leicht beschwert (ca. 0,5 kg). Nach dem Transfer wurden die Filter 10 min in 5 x SSC gewaschen, auf Whatmanpapier kurz getrocknet und die „geblottete“ RNA auf der Membran mittels „cross-linking“ unter UV-Licht für 90 sec fixiert.

5.3.12 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Zur Vermehrung eines bestimmten Abschnitts von genomischer DNA oder Plasmid DNA wurde die Polymerase-Kettenreaktion verwendet. Bei dieser Methode werden unter Zuhilfenahme von geeigneten Oligonukleotidprimern, Desoxynukleotiden und DNA-Polymerase die gewünschten DNA-Abschnitte vervielfältigt. Durch entsprechende Wahl der Oligonukleotidprimer ist es darüber hinaus möglich Schnittstellen für Restriktionsenzyme in die entstehende DNA einzufügen. Die Hybridisierungstemperatur (T_{Hyb}) eines bestimmten Oligonukleotidprimers wurde anhand seiner Basenzusammensetzung folgendermaßen abgeschätzt [83]:

$$4 \cdot (G + C) + 2 \cdot (A + T) - 10 = T_{Hyb} (^{\circ}C)$$

oder konnte den Unterlagen des Herstellers entnommen werden. Um eine vollständige Polymerisierung zu gewährleisten wurde die erste Denaturierung für einen längeren Zeitraum durchgeführt als die übrigen. Der letzte Syntheseschritt wurde ebenfalls länger gewählt, um die Fertigstellung unvollständiger DNA-Syntheseschritte sicherzustellen.

10 x PCR-Puffer für Taq-Polymerase		10 x PCR-Puffer für Pfu-Turbo-Polymerase	
100 mM	Tris/HCl (pH 8,3)	200 mM	Tris/HCl (pH 8,7)
500 mM	KCl	100 mM	KCl
15 mM	MgCl ₂	100 mM	(NH ₄) ₂ SO ₄
0,1% (w/v)	Gelatine	20 mM	MgSO ₄
		1%	Triton x-100
		1mg/ml	BSA

PCR-Bedingungen zur Amplifizierung von Nramp Überexpressionskonstrukten sowie Nramp „Knock-in“ Konstrukten an Klonen der Jenaer *D. discoideum*-Genombank

Reaktionsbedingungen (Bsp.)		Reaktionsansatz	
1. Denaturierung:	94°C, 180 sec	0,5 µg	Plasmid-DNA
Denaturierung:	94°C, 30 sec	50 pmol	5'-Oligonukleotid
Hybridisierung:	52°C, 60 sec	50 pmol	3'-Oligonukleotid dNTP-Mix (jeweils 5 mM)
Verlängerung:	72°C, 60 sec	1 U	Taq- oder Pfu-Polymerase
Letzte Verlängerung:	72°C, 10 min	5 µl	10 x PCR-Puffer
Zyklenzahl:	25		

5.3.13 Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide wurden mit H₂O zu einer Endkonzentration von 100 pmol aufgenommen und anschliessend in Aliquots als Arbeitslösung auf 5 pmol verdünnt.

Oligonukleotide für die Polymerase-Kettenreaktion:

A5 Eco	GGG AAT TCA TGA ATA ATA ATA ATA ATA AAA AAT TAA ATA AAG GFP
A3n	GGG AAT TCT TGT ATA GTT TGA TTA TTA ATT GTA TTA CCA G
B5 Eco	GGG AAT TCA TGA CAC CCA GAA TTG AAA GTG AG
GFPBmidr	GAT GAT CAA TGC GAA TGC AG
GFPBmidl	GGG GGC AGT TGT AAT GCC AC
GFP B3	GAA TTC ATA ATT AAT ATT ATT ATA AGT TTG ATT TGA
NrampAmid	GTC GAC GCG GGC CAA ATA GTT ATG G
NrampA3'	GAG CTC TTG TAT AGT TTG ATT ATT AAT TGT ATT
NrampBmid	GTC GAC GGG TTA TCA TCG GCT GC
NrampB3'	GAG CTC ATA ATT AAT ATT ATT ATA AGT TTG ATT TG
a12x1	GGG AAT TCA GCA AAC CAA TTG CGT CCG
a12x2	GGT CTA GAT TAC CTA TTT TTA AAT TCA CCC AT
g04x4	GGT CTA GAT TAC CAA GGG GCG ATT TTT AA
g04x5	GGG AAT TCA TTG CCT TGCC AAA TCT TAT CGA AT

Oligonukleotide für die Sequenzierung:
 Nrampa12F1 GCC ATT CAA AGA TGG GGT

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

5.3.14 Klonierung von DNA-Fragmenten in Vektor-DNA

Phosphatase Behandlung Um die Religation eines linearisierten Vektors zu verhindern, wurden die Phosphatgruppen am 5'-Ende mit alkalischer Phosphatase entfernt. Die Behandlung mit Phosphatase wurde nach Sambrook *et al.* [72] durchgeführt. In einem 50 μl Ansatz wurden 1-5 μg linearisierter Vektor mit 1-2 U alkalischer Phosphatase in Phosphatase-Puffer bei 37°C 30 min lang umgesetzt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 10 μl 10 mM EDTA-Lösung und Hitzeinaktivierung des Enzyms bei 65°C für 10 min gestoppt. Anschließend wurde der Ansatz mit Phenol/Chloroform extrahiert und die DNA mit zwei Volumina Ethanol gefällt.

10 x Phosphatase-Puffer (pH 9,0)

500 mM Tris/HCl
 10 mM MgCl₂
 1 mM ZnCl₂
 10 mM Spermidin

DNA-Ligase Reaktion DNA-Fragmente wurden mit T4-DNA-Ligase verknüpft. Nach Abschätzen der Konzentration des dephosphorylierten Vektors und des Fragments auf einem analytischen Agarosegel und Berechnung der einzusetzenden Mengen nach unten aufgeführter Formel, wurde die Ligation in einem Volumen von 15 μl angesetzt. Nachdem der Vektor und das Insert für die Ligation vorbereitet waren, wurden die Konzentrationen in einem Agarose-testgel abgeschätzt. Die in der Ligation einzusetzenden DNA-Mengen wurden mit folgender Formel berechnet:

$$\frac{\text{Vektor}(ng) \cdot \text{Insert}(KB)}{\text{Vektor}(KB)} \cdot \text{molaresVerhältnis} \frac{\text{Insert}}{\text{Vektor}} = \text{Insert}(ng)$$

Für die Ligation von kleinen Fragmenten (< 1000 Bp) wurde ein vier- bis zehnfacher molarer Überschuss an Fragment eingesetzt, große Fragmente wurden meist mit der gleichen Menge Vektor ligiert. Zur Verbindung glatter Enden wurde 24 h, zur Verbindung überhängender Enden 12-16 h bei 16 oder 21°C inkubiert.

Reaktionsansatz		10 x Ligationspuffer (pH 7,6)	
50-200 ng	linearisierte Vektor-DNA	200 mM	Tris/HCl
	+ DNA-Fragment	50 mM	MgCl ₂
1,5 μ l	10 x Ligationspuffer	50 mM	DTT
2 U	T4-Ligase	5 mM	ATP
mit Wasser auf 15 μ l auffüllen		500 μ g/ml	BSA

Klonierung mit der TOPO-Methode [77] Für einige Anwendungen wurden Klonierungen mit dem TOPO-TA Cloning Kit der Firma Invitrogen Ltd., UK durchgeführt. Dazu wurden 0,5-4 μ l eines frisch hergestellten PCR-Fragment mit 1 μ l der, mit dem Kit bereitgestellten Salzlösung und der pCR 2.1-TOPO Vektor Lösung vermischt und mit dd H₂O auf 6 μ l aufgefüllt. Dieser Reaktionsansatz wurde je nach Größe des verwendeten DNA-Inserts bei Raumtemperatur für ca. 5-20 Minuten inkubiert. 2 μ l dieses Ansatzes wurden mit 50 μ l der mitgelieferten *E. coli* TOP10F' vorsichtig gemischt und zusammen für 30 Minuten auf Eis stehen gelassen. Daraufhin wurden die Zellen für 30 sec auf 42°C erhitzt und anschließend sofort auf Eis gestellt. Es wurden nun 250 μ l SOC-Medium hinzugegeben und die Zellen bei ca. 200 UpM bei 37°C eine Stunde lang geschüttelt. Etwa 50 μ l der Zellen wurden auf eine mit 40 μ l IPTG (100mM) und X-Gal präparierte und auf 37°C vorgewärmte LB-Ampicillinplatte ausgestrichen.

pCR 2.1-TOPO Vektor Lösung		Salzlösung TOPO	
10ng/ μ l	linearisierte Vektor-DNA	1,2 M	NaCl
50 %	Glycerin	0,06 M	MgCl ₂
50 mM	Tris-HCl (pH 7,4)		
1 mM	EDTA		
1 mM	DTT		
0,1 %	TritonX-100		
100 μ g/ml	BSA		
	Phenolrot		

5.3.15 Herstellung kompetenter *E. coli* Zellen für die Elektroporation

1 l LB-Medium wurde mit 5 ml Übernachtskultur des gewünschten *E. coli*-Stammes angeimpft und bei 37°C mit 240 UpM geschüttelt, bis eine OD₆₀₀ von 0,5 erreicht war. Die Zellen wurden auf Eis abgekühlt, in sterile Falkonröhrchen überführt, abzentrifugiert (CS-6KR Beckman, 3000 UpM, 10 min, 4°C) und in sterilem, eiskaltem Wasser resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit kaltem Wasser gewaschen und abzentrifugiert, wobei bei jedem Waschschrift das Volumen um die Hälfte reduziert wurde. Schließlich wurden die Zellen nach dem Abdekantieren in der Restflüssigkeit (1-2 ml) resuspendiert, in Aliquots zu je 50 μ l abgefüllt, in flüssigen Stickstoff schockgefroren und bei -70°C gelagert.

5.3.16 Transformation von *E. coli* Zellen durch Elektroporation

Zur Transformation wurden die Zellen (50 μ l) auf Eis aufgetaut und entweder mit einem gefällten und in Wasser aufgenommenen Ligationsansatz oder eine Verdünnung zirkulärer Plasmid-DNA gemischt. Nach 10 min auf Eis wurde das *E. coli*-Plasmid-Gemisch in eine Elektroporationsküvette (2 mm Elektrodenabstand) gefüllt und die Zellen wurden bei 25 μ F, 200 Ohm und 2,5 kV transformiert. Anschließend wurden der Transformationsansatz in 1 ml SOC-Medium [72] aufgenommen, die Zellen 45 min bei 37°C regeneriert und 1, 10

und 100 μl auf LB-Platten mit 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Ampicillin ausplattiert.

SOC-Medium

2 %	Bacto-Trypton
0,5%	Hefeextrakt
10,0 mM	NaCl
2,5 mM	KCl
10,0 mM	MgCl ₂
10,0 mM	MgSO ₄
20,0 mM	Glucose

5.3.17 *E. coli* Dauerkulturen

Wichtige Transformanten wurden als Dauerkultur konserviert. Dabei wurden 800 μl der Bakterien-Kultur mit 200 μl Glycerin vermischt, auf Eis gestellt und anschließend in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die weitere Aufbewahrung erfolgte in einer Kühltruhe bei -70°C .

5.4 Proteinchemische Methoden

5.4.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Für die diskontinuierliche SDS-PAGE [55] wurden in der Regel 7,5%, 10%, 15% (siehe unten) oder 18% Trenngele mit 3%-igen Sammelgelen verwendet (7,5 x 10 x 0,05 cm).

Sammelgel

125 mM	Tris/Glycin (pH 6,8)
0,1%	SDS
3,3%	Acrylamid (38:1 Bisacrylamid)
pro 16 ml:	
240 μl	20%iges APS (Ammoniumperoxodisulfat)
8 μl	TEMED

10 x SDS-PAGE-Laufpuffer

250 mM	Tris
1,9 M	Glycin
1%	SDS

Trenngel

380 mM	Tris/Glycin (pH 8,8)
0,1%	SDS
15%	Acrylamid (38:1 Bisacrylamid)
pro 42 ml:	
480 μl	20%iges APS
12 μl	TEMED

3 x SDS-Probenpuffer

65 mM	Tris/HCl (pH 6,8)
10%	Glycerin
2,3%	SDS
5%	β -Mercaptoethanol
<i>ad.lib.</i>	Bromphenolblau

Zu der aufzutrennenden Proteinlösung wurden 1/3 Volumen 3x SDS-Probenpuffer gegeben und die Lösung für 3 min gekocht. Die Auftrennung der Proteine erfolgte bei 150 V konstanter Spannung. Als Standard wurde ein Gemisch von Proteinen definierter Molekülmassen verwendet:

LMW („low molecular weight“, Biorad): 92,5 KDa, 68 KDa, 45 KDa, 33 KDa, 20 KDa, 14 KDa

„See blue“ (Novex): 250 KDa, 98 KDa, 64 KDa, 50 KDa, 36 KDa, 30 KDa, 16 KDa, 6 KDa, 4 KDa

5.4.2 Coomassie-Blau-Färbung von Proteinen

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

SDS-PAGE Gelfärbelösung		Entfärber	
0,1%	Coomassie Brilliant Blau R 250	10%	Ethanol
50%	Methanol	7%	Essigsäure
12%	Essigsäure, filtrieren		

5.4.3 „Westernblot“

Nach der Auftrennung der Proteinproben mittels SDS-PAGE wurden die Proteine nach der modifizierten Methode von Towbin *et al.* [91] auf Nitrozellulose (Schleicher und Schuell BA 85) transferiert. Dies erfolgte in der Regel mit einer „semi-dry“ Elektrophorese-Apparatur (Biorad Trans-Blot SD) zwischen in Transferpuffer getränktem Whatman-Filterpapier (12 V, 60 min). Nach dem Transfer der Proteine auf Nitrozellulose wurde diese über Nacht mit 5% Milchpulver in NCP-Puffer (mit Azid) abgesättigt. Anschließend wurde die Nitrozellulose 3 x mit NCP-Puffer gewaschen und mit dem ersten Antikörper (1:2 bis 1:10.000 mit NCP-Puffer verdünntes Kaninchenserum oder Hybridomaüberstände) für 1-4 h inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen mit NCP-Puffer wurde die Nitrozellulose mit dem sekundären Antikörper (1:2000 mit

NCP-Puffer verdünnt) für 1 h inkubiert, und anschließend wieder mehrmals gewaschen.

Nachweis der Antigene durch Chemolumineszenz Bei Verwendung eines sekundären Antikörpers für die Detektion mittels Chemolumineszenz wurde der Nitrozellulosefilter mit 3 ml Nachweisreagenz für Chemolumineszenz (ECL: enhanced chemoluminescence) 1 min lang überschichtet. Die Lumineszenzreaktion wurde mit einem Röntgenfilm (X-omat AR 5, Kodak) nachgewiesen.

Nachweis der Antigene mittels einer Farbreaktion Im Falle des Einsatzes dieser Methode wurde als sekundärer Antikörper ein Antikörper verwendet, der an alkalische Phosphatase gekoppelt und somit in der Lage ist, eine Farbreaktion bei Zugabe von BCIP auszulösen. Die Blots wurden nach den Waschschritten in NCP in 0,1 M Na_2CO_3 gewaschen und durch Zugabe von frischer 0,1 M Na_2CO_3 Lösung, in der <1mg BCIP gelöst war, entwickelt. War eine weitere Verstärkung des Signals erwünscht oder erforderlich, wurde in die Lösung zusätzlich <1mg NBT, gelöst in 200 μl DMSO gegeben.

Transferpuffer		Chemilumineszenz-Reagenz (ECL)	
25 mM	Tris/HCl (pH 8,5)	200 μl	Luminol (250 mM in DMSO)
190 mM	Glycin		(Luminol: 3-Amino-phthalhydrazid)
20%	Methanol	89 μl	p-Cumarsäure (90 mM in DMSO)
0,02%	SDS	2 ml	Tris/HCl (1 M, pH 8,5)
			mit H_2O auf 20 ml auffüllen
			(im Dunkeln aufbewahren)
			vor Gebrauch 6,1 μl H_2O_2 (30%) zugeben

5.4.4 Proteinbestimmung

Proteinbestimmung nach Bradford Die Bestimmung der Proteinkonzentration wurde nach der Methode von Bradford [8] durchgeführt. Diese beruht auf der Bindung von Coomassie-Blau G-250 durch Proteine, wobei das Absorptionsmaximum des Farbstoffes von 465 nm auf 595 nm verschoben wird. Zur Erstellung der Eichkurve wurde Rinderserumalbumin als Standard verwendet.

SDS stört die Reaktion stark, weshalb für SDS-haltige Proben die folgende Methode verwendet wurde (bei der Kalibrierung wurde SDS in der gleichen Konzentration zugesetzt).

Proteinbestimmung nach Lowry *et al.* [57] Die Methode von Lowry *et al.* basiert auf der Reaktion des Folin-Ciocalteus-Phenol-Reagenz (Phosphor-Wolfram/ Molybdänsäurekomplex) mit Proteinen, wobei sich durch die Reaktion mit Tyrosin-Resten eine blaue Verfärbung ergibt. Die Extinktion verhält sich direkt proportional zu der Proteinmenge und kann photometrisch bei 750 nm bestimmt werden. Die Reaktion wird durch DTT beeinträchtigt.

5.4.5 Herstellung von *D. discoideum* Proteinproben

Zur Überprüfung der Sera nach Immunisierung mittels Western-Blot wurden verschiedene Proteinfractionen von *D. discoideum* hergestellt. Dazu wurden $1 \cdot 10^7$ AX2 Zellen mit einer Dichte von ca $1 - 3 \cdot 10^6$ Zellen/ml in einer Beckman Zentrifuge bei 1200 UpM geerntet. Die Zellen wurden zweimal gewaschen, indem sie in 10 ml Soerensen Puffer resuspendiert und erneut bei 1200 UpM 5 Minuten lang zentrifugiert wurden. Danach wurden die Zellen in insgesamt 10 ml TEDABP-Puffer aufgenommen und anschließend ca. zwölfmal durch zwei Lagen eines Nuclepore Filters mit $5 \mu\text{m}$ Porengröße gepresst. Der Erfolg der so durchgeführten Zellyse wurde unter einem Lichtmikroskop überprüft. 1,5 ml des gewonnenen Zellhomogenats wurden in ein Eppendorfgefäß überführt und 30 Minuten bei 10.000 g in einer Eppendorf Tischzentrifuge zentrifugiert. Das so entstandene Sediment wurde mit 1x SDS 4 Minuten bei 100°C aufgeköcht und als „10.000 g“ Pellet für weitere Versuche verwendet. Der Überstand wurde in ein Spezial Eppendorf-Gefäß überführt und 30 Minuten bei 100.000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde als „100.000 g Überstand“, das Sediment als „100.000 g Sediment“ für die weitere Verwendung mit SDS aufgeköcht und frisch verwendet.

5.4.6 Induktion und Reinigung von rekombinanten Proteinen

Expression mit dem pT7-7 Vektorsystem Die gesamte Insert-DNA des Klons JAX4a137g04 der *D. discoideum* Genomdatenbank wurde mit Hilfe der Restriktionsstellen von EcoRI und NdeI in den Vektor pT7-7 eingefügt. Das pT7-7 JAX4a137g04 Konstrukt wurde daraufhin in den *E. coli* Stamm BL21 LysE transformiert. Dieser Stamm enthält ein zusätzliches Plasmid, das das Lysozym-Gen aus dem Bakteriophagen T7 zusammen mit der Resistenzkassette für Chloramphenicol enthält. T7-Lysozym vermag intrazellulär die basale Aktivität von T7-RNA Polymerase zu verringern und damit die basale Expression des transformierten Gens vor Induktion zu verhindern. Die Bakterien wurden über Nacht in LB-Amp+Cm bei 37°C bis zu einer OD₆₀₀ von ca. 0,8 angezogen und nach Entnahme eines Aliquots mit 0,5M IPTG (Endkonzentration) versetzt. Nach 3h bei 37° wurden die Bakterien durch dreiminütige Zentrifugation bei 14.000 g geerntet und sofort in 1x SDS vier Minuten lang aufgeköcht. Der Vergleich zwischen dem Expressionsmuster vor und 3h nach Induktion erfolgte mittels SDS-PAGE. Analog wurde der Versuch bei einer Anzucht- und Induktionstemperatur von 21° wiederholt und die Induktion nach 1, 2, 4 und 6 Stunden untersucht.

Expression mit dem pMal-c2x/pMal-p2x Vektorsystem Der Abschnitt Bp 919 bis Bp 1575 des NrampA Gens wurde durch PCR mit Hilfe der Primer a12x1 und a12x2 amplifiziert. Das entstandene Fragment wurde mit den Enzymen EcoRI und XbaI verdaut und in den mit EcoRI/XbaI geöffneten und dephosphorylierten Vektor pMal-c2x bzw. pMal-p2x ligiert. Analog wurde der die Bp 630 bis Bp 1266 umfassende Abschnitt durch Verwendung der Primer g04x5 und g04x4 in einer PCR vervielfältigt. Nach Verdau des PCR-Produkts mit EcoRI/XbaI wurde es ebenfalls in den mit EcoRI/XbaI geöffneten und dephosphorylierten Vektor pMal-c2x bzw. pMal-p2x eingefügt. *E. coli* Bakterien, die das Plasmid mit dem gewünschten Expressionskonstrukt enthielten, wurden

über Nacht in einer 400 ml Kultur LB Medium (+2g/l Glucose) herangezogen. Am nächsten Morgen wurden die Zellen mit LB Medium (+2g/l Glucose) und dem gewählten Selektionsmarker auf 4 l aufgefüllt und bei 37°C bis zu einer optischen Dichte bei 600nm von 0,6 herangezüchtet. Die Expression des rekombinanten Proteins wurde mittels Zugabe von 0,5 mM IPTG induziert. Nach 2h Inkubation bei 37° wurde die Kultur bei 3000 g für 10 min abzentrifugiert und das Sediment in 5 ml TEDABP aufgenommen. Anschließend wurde die Bakterien suspension in flüssigem N₂ schockgefroren und in einer Wasser/Eis Mischung über die Dauer einer halben Stunde langsam aufgetaut. Danach wurden die Bakterien unter fortdauernder Eiskühlung in 5 Zyklen à 10 Sekunden mittels Beschallung mit Ultraschall aufgebrochen. Die Proben wurden daraufhin bei 18.000 g für 20 Minuten zentrifugiert. Das gewünschte Protein wurde je nach seiner Wasserlöslichkeit aus dem Überstand weiter aufgereinigt oder mittels Extraktion mit aufsteigenden Konzentrationen von Harnstoff aus dem Sediment gelöst. Dazu wurden Lösungen von 2M, 4M und 7M Urea in TEDABP-Puffer hergestellt. Nach Auflösen des Sediments in der Harnstofflösung wurden die Proben jeweils bei 18.000 g für 20 Minuten zentrifugiert und der entstandene Überstand zur späteren Analyse abgenommen. Das verbleibende Sediment wurde in der Lösung mit der nächsthöheren Harnstoffkonzentration resuspendiert und das Vorgehen wiederholt. Der verschiedenen Überstände, sowie das Sediment nach Behandlung mit 7M Harnstoff wurden in SDS aufgekocht und mittels SDS-Page auf ihren Proteingehalt geprüft.

5.4.7 Reinigung von MBP-Fusionsproteinen mit Hilfe einer Amylosesäule

Eine mit ca. 2 ml Amylose-Matrix bestückte Säule wurde mit dem zehnfachen Volumen an TEDABP langsam equilibriert. Die das Fusionsprotein enthaltende Lösung wurde im Verhältnis 1:4 mit TEDABP verdünnt und auf die Amylosesäule geladen. Anschließend wurde die Säule mit dem zehnfachen Säulenvolumen an TEDABP gewaschen. Die Elution erfolgte mit einer 10mM Maltose-

TEDABP-Lösung, das Eluat wurde mittels eines Fraktionskollektors in 15 Fraktionen à 600 μ l gesammelt.

5.4.8 Kopplung synthetischer Peptide an Haemocyanin

Es kamen folgende synthetische Polypeptide zur Anwendung:

Name	Aminosäurenabfolge	Molekülmasse
Nramp A1 346	HGSVVKSRKIPNDRRKS	362 1963 Da
Nramp A2 434	AGQSSTITGT MAGQIVMEG	452 1813 Da
Nramp B 309	HSALVQSREIDRKSETQVK	327 2192 Da

6,6 mg lyophilisiertes Keyhole Limpet Hemocyanin (KLH) wurden in 2 ml Borat Puffer (pH10 bei 4° C) aufgenommen und 6,6 μ mol des künstlichen Peptids hinzugefügt. Die Lösung wurde anschließend bei Raumtemperatur gerührt und 1ml einer 0,3% Glutaraldehyd Lösung (1,2 ml 25% Glutaraldehyd in 98,8 ml Borat-Puffer pH10) langsam unter Rühren hinzuge tropft. Nach weiteren 2h Rühren erschien die Lösung gelblich. Zum Stoppen der Reaktion wurden 0,25 ml 1M Glycin dazugegeben und die Lösung 30 min weitergerührt. Daraufhin wurde das Konjugat in einen Dialyseschlauch abgefüllt und dreimal gegen 3 l Borat-Puffer mit pH 8,5 dialysiert.

5.4.9 Herstellung und Überprüfung von Antikörpern

Die Peptidkonjugate NrampA1 und NrampA2 wurden vereinigt und zusammen mit dem Konjugat von NrampB2 an die Firma Eurogentec S.A., Belgien zur Immunisierung von Kaninchen gesendet. Dort wurden zwei Kaninchen (SA8573 und SA8574) mit dem NrampA1/A2 Konjugat geimpft, zwei weitere Kaninchen (SA8575 und SA8576) mit dem NrampB2 Konjugat. Pro Impfung/„boost“ wurden 100 μ g Antigenmaterial injiziert, die Blutentnahme fand ca. 10 Tage nach Injektion statt. Die Nomenklatur der erhaltenen Seren bezog sich im weiteren auf die beiden letzten Ziffern der Codes für die betreffenden Kaninchen (z.B. Serum Nr. 73 aus dem Kaninchen SA8573, das mit NrampA immunisiert wurde).

Die Antigen-Injektionen und Blutabnahmen fanden nach folgendem Immunisierungsschema statt:

Datum der Injektion		Datum der Blutabnahme	
Erste Immunisierung:	06.11.00	Präimmunserum:	06.11.00
Erster „boost“:	20.11.00		
Zweiter „boost“:	04.12.01	Erstes Testblut:	14.12.01
Dritter „boost“:	01.01.01	Erste Blutung:	11.01.01
Vierter „boost“:	26.02.01	Zweite Blutung:	08.03.01
Fünfter „boost“:	02.04.01	Dritte Blutung:	12.04.01
Sechster „boost“:	14.05.01	Vierte Blutung:	24.05.01
Siebter „boost“:	11.06.01	Fünfte Blutung:	21.06.01
		Letzte Blutung der Kaninchen SA8574 und SA8576:	19.07.01
Achter „boost“ (nur SA8573 und SA8575):	09.07.01	Sechste Blutung:	19.07.01
Neunter „boost“ (nur SA8573 und SA8575):	13.08.01	Siebte Blutung:	23.08.01
		Letzte Blutung der Kaninchen SA8575 und SA8575:	06.09.01

Die Seren wurden in standardisierten Westernblots getestet. Dazu wurde jeweils parallel ein Blot mit dem Präserum vor Injektion des Antigens (Verdünnung 1:2000 in NCP+1%BSA) inkubiert und mit den Seren nach Immunisierung (Verdünnung 1:2000 in NCP+1%BSA) verglichen. Die ersten drei gelieferten Sera wurden im Westernblot mit Zellhomogenat aus p2Mal-c2 Expressionsversuchen und dem Peptidkonjugat als Positivkontrolle getestet. Die danach gelieferten Sera 4-9 wurden durch Verwendung in einem Westernblot zunächst mit Homogenat, 100.000g Überstand und einem 100.000g Zellsediment von *D. discoideum* Zellen geprüft, als Positivkontrolle diente Zellhomogenat aus p2Mal-c2 Expressionsversuchen. Später wurde als Positiv-Kontrolle die Fraktion Nr. 6 des Aufreinigungsversuchs mit pMal-c2 Nrap Konstrukten (siehe dort) verwendet und ein 10.000 g Überstand zur weiteren Differenzierung zwischen endo-/lysosomalem Kompartiment und sonstigen Zellorganellen in die Westernblots miteinbezogen.

Abkürzungen

A	Adenosin
ADP	Adenosindiphosphat
AK	Antikörper
Amp	Ampicillin
AP	Alkalische Phosphatase
AS	Aminosäurerest(e)
ATP	Adenosintrisphosphat
Bp	Basenpaar(e)
BCIP	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-Phosphat-p-Toluidin
Bp	Basenpaar(e)
BSA	Rinderserumalbumin („bovine serum albumin“)
C	Cytosin
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cDNA	komplementäre DNA („complementary/copy DNA“)
CFU	Koloniebildende Einheiten („colony forming units“)
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
Cm	Chloramphenicol
Cy3	Carboxymethylindocyanin
DAG	Diacylglycerol
DAPI	4,6 Diamino-2-phenylindol
DEP	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure („deoxyribonucleic acid“)
DNase	Desoxyribonuklease
DTT	1,4-Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
F-Aktin	Filamentäres Aktin
G	Guanosin
G-Aktin	Globuläres Aktin (Monomer)
GFP	Grün fluoreszierendes Protein („green fluorescent protein“)
h	Stunde(n)
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazid-N'-ethansulfonsäure
IFN	Interferon
IgG	Immunglobulin G

IP ₃	1,4,5 Inositoltrisphosphat
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
IRE	Eisenabhängiger Translationsfaktor („iron response element“)
KLH	Hämocyanin („keyhole limpet hemocyanin“)
LPS	Lipopolysaccharid
m	milli-
M	Molar
min	Minuten
MBP	Maltosebindeprotein
MOPS	(Morpholino) Ethansulfonsäure
mRNA	„messenger-RNA“
NCP	
OD	Optische Dichte („optical density“)
ORF	Offener Leserahmen („open reading frame“)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion („polymerase chain reaction“)
PI	Phosphoinositol
PIP ₂	Phosphatidyldiphosphat
RNA	Ribonukleinsäure („ribonucleic acid“)
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
T	Thymin
TEMED	N,N,N',N'- Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TM	Transmembrandomäne
U	Internationale Einheit („unit“)
UpM	Umdrehungen pro Minute
v/v	Volumen/Volumen
w/v	Gewicht/Volumen
x	mal; -fach konzentriert

Literaturverzeichnis

- [1] Abu Kwaik, Y.; (1998); Fatal attraction of mammalian cells to *Legionella pneumophila*. *Mol. Microbio.* 30:689-695 5
- [2] Adachi, H., Hasebe, T., Yoshinaga, K., Ohta, T., Sutoh, K.; (1994); Isolation of *Dictyostelium discoideum* mutants by restriction-mediated integration of the blasticidin S resistance marker. *Biochem. Biophys. Research Commun.* 205:1808-1814 62
- [3] Agranoff, D., Monahan, I.M., Mangan, J.A., Butcher, P.D., Krishna, S.; (1999); *Mycobacterium tuberculosis* expresses a novel pH-dependent divalent cation transporter belonging to the Nramp family. *J. Exp. Med.* 190:717-724 19
- [4] Alli, T., Gao, L-Y., Pedersen, L., Zink, S., Radulic, M., Doric, M., Abu Kwaik, Y.; (2000); Temporal pore formation-mediated egress from macrophages and alveolar epithelial cells by *Legionella pneumophila*. *Infect. and Immun.* 68:6431-6440 6
- [5] Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J.; (1990); Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215:403-410 63
- [6] Atkinson, P.G.P., Blackwell, J. M., Barton, C.H.; (1997); Nramp1 locus encodes a 65 KDa interferon- γ -inducible protein in murine macrophages. *Biochem. J.* 325:779-786 13, 55

- [7] Bermudez, L., Sangari, F.; (2001); Cellular and molecular mechanisms of internalization of mycobacteria by host cells. *Microbes and Inf.* 3:37-42
11
- [8] Bradford, M.M.; (1976); A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye-binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254 84
- [9] Cannone-Hergaux, F., Gruenheid, S., Ponka, P., Gros, P.; (1999); Cellular and subcellular localization of the NRAMP2 iron transporter in the intestinal brush border and regulation by dietary iron. *Blood* 93:4406-4417
16
- [10] Cellier, M.F.M., Bergevin, I., Boyer, E., Richer, E.; (2001); Polyphyletic origins of bacterial Nramp transporters. *Trends Gen.* 17:365-370 18, 31, 53
- [11] Cellier, M., Privé, G., Belouchi, A., Kwan, T., Rodrigues, V., Chia, W., Gros, P. ; (1995) ; Nramp defines a family of membrane proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:10089-10093 13, 17, 34, 51, 52, 53
- [12] Cirillo, J., Falkow, S., Tompkins, L., Bermudez, L.; (1997); Interaction of *Mycobacterium avium* with environmental amoebae enhances virulence. *Infect. and Immun.* 65(9):3759-3767 12, 57
- [13] Claviez, M., Pagh, K., Maruta, H, Baltés, W., Fisher, P., Gerisch, G.; (1982); Electron microscopic mapping of monoclonal antibodies on the tail region of *Dictyostelium* myosin. *EMBO J.* 1:1017-1022 59, 64
- [14] Cossart, P., Bierne, H.; (2001); The use of host cell machinery in the pathogenesis of *Listeria monocytogenes*. *Curr. Op. Immunology* 13:96-103 9, 10

- [15] Cossart, P., Lecuit, M.; (1998); Interactions of *Listeria monocytogenes* with mammalian cells during entry and actin-based movement: bacterial factors, cellular ligands and signaling. *EMBO J.* 17:3797-3806 8, 9, 10
- [16] Curie, C., Alonso, J.M., Le Jean, M., Ecker, J.R., Briat, J.F.; (2000); Involvement of NRAMP1 from *Arabidopsis thaliana* in iron transport. *Biochem. J.* 347:749-755 18
- [17] D'Souza, J., Cheah, P.Y., Gros, P., Chia, W., Rodrigues, V.; (1999); Functional complementation of the malvolio mutation in the taste pathway of *Drosophila melanogaster* by the human natural resistance-associated macrophage protein (Nramp-1). *J. Exp. Biol.* 202:1909-1915 18, 56
- [18] Daunderer, C., Schliwa, M., Gräf, R.; (1999); *Dictyostelium discoideum*: A promising centrosome model system. *Biol. Cell* 91:313-320
- [19] Devereux, J., Haeberli, P., Smithies, O.; (1984); A comprehensive set of sequence analysis programs for the VAX. *Nucl. Acids Res* 12:387-395 63
- [20] Devreotes, P.N., Zigmond, S.H.; (1998); Chemotaxis in eukaryotic cells: a focus on leukocytes and *Dictyostelium*. *Annu Rev Cell Biol* 4:649-86 20
- [21] Dretzen, G.M., Bellard, M., Sassone-Corsi, P., Chambon, P.; (1981); A reliable method for the recovery of DNA fragments from agarose and acrylamide gels. *Anal. Biochem.* 112:295-298 (1981) 70
- [22] Eichinger, L., Noegel, A.A.; (2001); Das *Dictyostelium* Genomprojekt. *Biospektrum* 7:229-231 20
- [23] Ernst, J.; (1998); Macrophage receptors for *Mycobacterium tuberculosis*. *Inf. and Immunity* 66:1277-1281 11
- [24] Faix, J., Gerisch, G., Noegel, A.A.; (1992); Overexpression of the *csA* cell adhesion molecule under its own cAMP-regulated promoter impairs morphogenesis in *Dictyostelium*. *J. Cell Sci.* 102:203-214 62

- [25] Felsenstein, J., (1993); PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.5c. Distributed by the author. Department of Genetics, University of Washington, Seattle 31, 63
- [26] Fleming, M.D., Romano, M.A., Su, M.A., Garrick, L.M., Garrick, M. D., Andrews, N.C.; (1998); Nramp2 is mutated in the anemic Belgrade (b) rat: evidence for a role for Nramp2 in endosomal iron transport. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:1148-1153 16
- [27] Forbes, J.R., Gros, P.; (2001); Divalent-metal transport by NRAMP proteins at the interface of host-pathogen interactions. Trends Microbiol. 9:397-403 13, 14, 56
- [28] Gao, L.-Y., Abu Kwaik, Y.; (1999); Apoptosis in macrophages and alveolar epithelial cells during early stages of infection by Legionella pneumophila and its role in cytopathogenicity. Infect. Immun. 67:862-870 6
- [29] Gao, L-Y., Harb, O., Abu Kwaik, Y.; (1997); Utilization of similar mechanisms by Legionella pneumophila to parasitize two evolutionary distant host cells, mammalian macrophages and protozoa. Inf. And Immun. 65:4738-4746 7
- [30] Gao, L-Y., Stone, B., Brieland, J., Abu Kwaik, Y.; (1998); Different fates of Legionella pneumophila pmi and mil mutants within macrophages and alveolar epithelial cells. Microb. Pathog. 25:291-309 7
- [31] Garcia, M.X., Foote, C., van Es, S., Devreotes, P.N., Alexander, S., Alexander, H. ; (2000) ; Differential developmental expression and cell type specificity of Dictyostelium catalases and their response to oxidative stress and UV-light. Biochim Biophys Acta 1492:295-310 57
- [32] Garduno, R., Garduno, E., Hoffman, P.; (1998); Surface-associated Hsp60 chaperonin of Legionella pneumophila mediates invasion in a HeLa cell model. Infect. Immun. 66:4602-4610 5

- [33] Gatfield, J., Pieters, J.; (2000); Essential role for cholesterol in entry of mycobacteria in macrophages. *Science* 288:1647-1650 [11](#), [12](#)
- [34] Gedde, M., Higgins, D., Tilney, L., Protnoy, D.; (2000); Role of Lysteriolysin O in Cell to Cell spread of *Listeria monocytogenes*. *Inf. And Immun.* 68:999-1003 [10](#)
- [35] Gomes, M.S., Appelberg, R.; (1998); Evidence for a link between iron metabolism and Nramp1 gene function in innate resistance against *Mycobacterium avium*. *Immunology* 95:165-168 [14](#), [15](#), [56](#)
- [36] Gruenheid, S., Cannone-Hergaux, F., Gauthier, S., Hackam, D., Grinstein, S., Gros, P.; (1999); The iron transport protein NRAMP2 is an integral membrane glycoprotein that colocalizes with transferrin in recycling endosomes. *J. Exp. Med.* 189:831-841 [16](#), [54](#), [55](#)
- [37] Gruenheid, S., Gros, P.; (2000); Genetic susceptibility to intracellular infections: Nramp1 macrophage function and divalent cations transport. *Curr. Op. in Microbiol.* 3:43-48 [13](#)
- [38] Gruenheid, S., Pinner, E., Desjardins, M. and Gros, P.; (1997); Natural resistance to infection with intracellular pathogens: The Nramp1 protein is recruited to the membrane of the phagosome. *J. Exp. Med.* 185: 717-730 [14](#), [55](#), [56](#)
- [39] Gunshin, H., Mackenzie, B. Berger, U.V., Gunshin, Y., Romero, M.F., Boron, W. F., Nussberger, S., Gollan, J.L., Hediger, M.A.; (1997); Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter. *Nature* 388:482-488 [15](#), [16](#)
- [40] Hackam, D.J., Rotstein, O.D., Zhang, W., Gruenheid, S., Gros, P., Grinstein, S.; (1998); Host resistance to intracellular infection: mutation of Natural Resistance-associated Macrophage Protein 1(Nramp1) impairs phagosomal acidification. *J. Exp. Med.* 188:351-364 [14](#)

- [41] Hägele, S., Hacker, J., Brand, B.; (1998); Legionella pneumophila kills human phagocytes but not protozoan host cells by inducing apoptotic cell death. FEMS Microbiol. Lett 169:51-58 [6](#), [7](#)
- [42] Hägele, S., Köhler, R., Merkert, H., Schleicher, M., Hacker, J., Steinert, M.; (2000); Dictyostelium discoideum: a new host model system for intracellular pathogens of the genus Legionella. Cell. Microbiol. 2:165-171 [7](#), [21](#), [23](#), [53](#), [57](#)
- [43] Hall, T.A.; (1999); BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucl. Acids. Symp. Ser. 41:95-98 [63](#)
- [44] Hasan, Z., Schlax, C., Kuhn, L., Leftkovits, I., Young, D., Thole, J., Pieters, J.; (1997); Isolation and characterization of the mycobacterial phagosome: segregation from the endosomal/lysosomal pathway. Mol. Microbiol. 24(3):545-553 [12](#)
- [45] Holmes, D.S., Quigley, M.; (1981); A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. Anal. Biochem. 114:193-197 [66](#)
- [46] Horwitz, M., Silverstein, S.; (1981); Interaction of the legionnaires' disease bacterium (Legionella pneumophila) with human phagocytes. II. Antibody promotes binding of L. pneumophila to monocytes but does not inhibit intracellular multiplication. J. Exp. Med. 153(2):398-406 [4](#)
- [47] Horwitz, M.; (1983); Formation of a novel phagosome by the Legionnaires' disease bacterium (Legionella pneumophila) in human monocytes. J. Exp. Med. 158:1319-1331 [5](#)
- [48] Ireton, K., Payraastre, B., Chap, H., Ogawa, W., Sakaue, H., Kasuga, M., Cossart, P.; (1996) ; A role for Phosphoinositide-3-Kinase in bacterial invasion. Science 274:780-782 [9](#)

- [49] Jabado, N., Jankowski, A., Dougaparsad, S., Picard, V., Grinstein, S., Gros, P.; (2000); Natural resistance to intracellular infections: Natural resistance-associated macrophage protein 1 (NRAMP1) functions as a pH-dependent Manganese transporter at the phagosomal membrane. *J. Exp. Med.* 192:1237-1247 **15, 56**
- [50] Joshi, A., Sturgill-Koszycki, S., Swanson, M.; (2001); Evidence that Dot-dependent and -independent factors isolate the Legionella pneumophila phagosome from the endocytic network in mouse macrophages. *Cell. Microbiol.* 3:99-114 **5, 6**
- [51] Kayser, F., Bienz, K., Eckert, J., Zinkernagel, R.; (1998); Thieme, Medizinische Mikrobiologie S. 311ff **4, 8, 10**
- [52] Kehres, D.G., Zaharik, M.L., Finlay, B.B., Maguire, M.E.; (2000); The NRAMP proteins of Salmonella typhimurium and Escherichia coli are selective manganese transporters involved in the response to reactive oxygen. *Mol. Microb.* 36:1085-1100 **18, 19, 52**
- [53] Kirby, J., Isberg, R.; (1998); Legionnaires' disease: the pore macrophage and the legion of terror within. *Trends Microbiol.* Vol. 6:256-258 **6**
- [54] Kyte, J. , Doolittle, R.F.:(1982); A Simple Method for Displaying the Hydrophobic Character of a Protein. *J. Mol. Biol.* 157: 105-142 **34**
- [55] Laemmli, U.K.; (1970); Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685 **82**
- [56] Loisel, T., Boujemaa, R., Pantaloni, D., Carlier, M.; (1999); Reconstitution of actin-based motility of Listeria and Shigella using pure proteins. *Nature* 401:613-616 **10**
- [57] Lowry, O.H., Rosebrough, A.L., Farr, A.L., Randall, R.J.; (1951); Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265-275 **85**

- [58] Maina, C.V., Riggs, P.D., Grandea, A.G. 3rd, Slatko, B.E., Moran L.S., Tagliamonte, J.A., McReynolds, L.A., Guan, C.D.; (1988); An *Escherichia coli* vector to express and purify foreign proteins by fusion to and separation from maltose-binding protein. *Gene* 74:365-373 62
- [59] Malchow, D., Naegele, B., Shwarz, H., Gerisch, G.; (1972); Membrane-bound cyclic AMP phosphodiesterase in chemotactically responding cells of *Dictyostelium discoideum*. *Eur. J. Biochem.* 28:136-142 60
- [60] Mehdy, M.C., Ratner, D., Firtel, R.A.; (1983); Induction and modulation of cell-type-specific gene expression in *Dictyostelium*. *Cell* 32:763-771 74
- [61] Mengaud, J., Ohayon, H., Gounon, P., Mége, R-M., Cossart, P.; (1996); E-Cadherin Is the Receptor for Internalin, a surface protein required for entry of *L. monocytogenes* into epithelial cells. *Cell* 84:923-932 8, 9
- [62] Noegel, A.A., Gerisch, G., Stadler, J. and Westphal, M.; (1986); Complete sequence and transcript regulation of a cell adhesion protein from aggregating *Dictyostelium* cells. *EMBO J.* 5:1473-1476. 38
- [63] Noegel, A.A., Schleicher, M.; (2000); The actin cytoskeleton of *Dictyostelium*: a story told by mutants. *J. Cell Sci.* 113:759-766 19, 21
- [64] Noegel, A.A., Welker, D.L., Metz, B.A., Williams, K.L.; (1985); Presence of nuclear associated plasmids in the lower eukaryote *Dictyostelium discoideum*. *J. Mol. Biol.* 185:447-450 68
- [65] Pieters, J.; (2001); Entry and survival of pathogenic mycobacteria in macrophages. *Microbes and Inf.* 3:249-255 11, 12
- [66] Pinner, E., Gruenheid, S.; Raymond, M., Gros, P.; (1997); Functional complementation of the yeast divalent cation transporter family SMF by NRAMP2, a member of the mammalian natural resistance associated macrophage protein family. *J. Biol. Chem.* 272:28933-28938 17

- [67] Portnoy, M.E., Liu, X-F., Culotta, V.C.; (2000); *Saccharomyces cerevisiae* expresses three functionally distinct homologues of the Nramp family of metal transporters. *Mol. Cell. Biol.* 20:7893-7902 17
- [68] Raper, K.B.; (1935); *Dictyostelium discoideum*, a new species of slime mold from decaying forest leaves. *J. Agric. Res.* 50:133-147 61
- [69] Rook, G.; (1996); The pathogenesis of tuberculosis. *Annu. Rev. Microbiol.* 50:259-284 10, 11
- [70] Rupper, A., Cardelli, J.; (2001); Regulation of phagocytosis and endophagosomal trafficking pathways in *Dictyostelium discoideum*. *Biochim and Biophys Acta* 1525:205-216 20, 21
- [71] Rupper, A., Grove, B., Cardelli, J.; (2001); Rab7 regulates phagosome maturation in *Dictyostelium*. *J. Cell Sci.* 114:2449-2460 21
- [72] Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T.; (1989); "Molecular Cloning". Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York. 60, 69, 79, 81
- [73] Schorey, J., Carroll, M., Brown, E.; (1997); A macrophage invasion mechanism of pathogenic mycobacteria. *Science* 277:1091-1093 11
- [74] Searle, S., Bright, N.A., Roach, T.I.A., Atkinson, P.G.P., Barton, C.H., Meloan, R.H., Blackwell, J.M.; (1998); Localisation of Nramp1 in macrophages: modulation with activation an infection. *J. Cell. Sci.* 111:2855-2866 14
- [75] Seastone, D.J., Harris, E., Temesvari, L.A., Bear, J.E., Saxe, C.L., Cardelli, J.; (2001); The WASp-like protein Scar regulates macropinocytosis, phagocytosis and endosomal membrane flow in *Dictyostelium*. *J. Cell Sci.* 114:2673-2683 20

- [76] Shen, Y., Naujokas, M., Park, M., Ireton, K.; (2000); InlB-Dependent internalization of *Listeria* is mediated by the Met receptor tyrosine kinase. *Cell* 103:501-510 8, 9
- [77] Shuman, S.; (1994); Novel Approach to Molecular Cloning and Polynucleotide Synthesis using vaccinia DNA Topoisomerase. *J. Biol. Chem.* 269:32678-32684 80
- [78] Smith, T.F., Waterman, M.S.; (1981); Identification of common molecular subsequences. *J. Mol. Biol.* 147:195-197 27
- [79] Southern, E.M.; (1975); Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98: 503-517 72
- [80] Studier, F.W., Moffatt, B.A.; (1986); Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol.* 189:113-130 61
- [81] Studier, F.; (1991); Use of bacteriophage T7 Lysozyme to improve an inducible T7 expression system. *J. Mol. Biol.* 219:37-44 61
- [82] Sturgill-Koszycki, S., Schlesinger, P., Chakraborty, P., Haddix, P., Collins, H., Fok, A., Allen, R., Gluck, S., Heuser, J., Russel, D.; (1994); Lack of acidification in *Mycobacterium* phagosomes produced by exclusion of the vesicular proton-ATPase. *Science* 263(5147):678-681 12
- [83] Suggs, S.V., Hirose, T., Miyake, T., Kawashima, E.H., Johnson, M.J., Itakura, K., Wallace, R.B.; (1981); Use of synthetic oligodeoxyribonucleotides for the isolation of specific cloned DNA sequences using purified genes. In: „Developmental Biology” ; (Brown, D.D., Fox, C.F., eds) Academic Press, New York 683-693 77
- [84] Swanson, M., Hammer, B.; (2000); *Legionella pneumophila* pathogenesis: A fateful journey from amoebae to macrophages. *Annu. Rev. Microbiol.* 54:567-613 4, 6

- [85] Swanson, M., Isberg, R.; (1995); Association of *Legionella pneumophila* with the macrophage endoplasmatic reticulum. *Infect. Immun.* 63:3609-3620 6
- [86] Tabor, S., Richardson, C.C.; (1985); A bacteriophage T7 RNA polymerase promotor system for controlled exclusive expression of specific genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:1074-1078 62
- [87] Tabuchi, M, Yoshida, T., Takegawa, Kishi, F.; (1999); Functional analysis of the human NRAMP family expressed in fission yeast. *Biochem. J.* 344: 211-219 51, 53, 55
- [88] Temesvari, L.A., Zhang, L., Fodera, B., Janssen, K-P., Schleicher, M., Cardelli, J.A.; (2000); Inactivation of *ImpA*, encoding a LIMPII-related endosomal protein, suppresses the internalization and endosomal trafficking defects in Profilin-null mutants. *Mol. Biol. Cell* 11:2019-2031 20
- [89] Thomine, S., Wang, R., Ward, J.M., Crawford, N.M., Schroeder, J.I.; (2000); Cadmium and iron transport by members of a plant metal transporter family in *Arabidopsis* with homology to *Nramp* genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:4991-4996 18
- [90] Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J.; (1994); CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucl. Acids Res.* 22:4673-4680 31, 34
- [91] Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J.; (1979); Electropheric transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets; procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76:4350-4354 83
- [92] Via, L., Deretic, D., Ulmer, R., Hibler, N., Huber, L., Deretic, V.; (1997); Arrest of mycobacterial phagosome maturation is caused by a block in

- vesicle fusion between stages controlled by rab5 and rab7. *J. of Biol. Chem.* 272(20):13326-13331 12
- [93] Vieira, J., Messing, J.; (1982); The pUC plasmid, a M13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. *Gene (Amst.)* 19:259-268 61
- [94] Vogel, J., Andrews, H., Wong, S., Isberg, R.; (1998); Conjugative transfer by the virulence system of *Legionella pneumophila*; *Science* 279:873-875 5
- [95] Wertman, K.F., Wyman, A.R., Botstein, D.; (1986); Host/vector interactions which affect the viability of recombinant phage lambda clones. *Gene* 49:253-262 61
- [96] Westphal, M., Jungbluth, A., Heidecker, M., Muhlbauer, B., Heizer, C., Schwartz, J.M., Marriott, G., Gerisch, G.; (1997); Microfilament dynamics during cell movement and chemotaxis monitored using a GFP-actin fusion protein. *Curr. Biol.* 7:176-83 62
- [97] Williams, C., Newell, G.; (1976); A genetic study of aggregation in the cellular slime mold *Dictyostelium discoideum* using complementation analysis. *Genetics* 82:287-307 61
- [98] Yannisch-Perron, C., Vieira, J., Messing, J.; (1985); Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* 33:103-119 62
- [99] Zhong, W., Lafuse, W.P., Zwilling, B.S.; (2001); Infection with *Mycobacterium avium* differentially regulates the expression of iron transport protein mRNA in murine peritoneal macrophages. *Infect. Immun.* 69:6618-6624 16, 54

- [100] Zwillig, B.S., Kuhn, D.E., Wikoff L., Brown D., Lafuse, W.; (1999); Role of iron in NRAMP1-mediated inhibition of mycobacterial growth. *Infect. Immun.* 67:1386-1392 14

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Stephan Georg Friedrich Schwager
Geburtstag: 26.05.1977
Geburtsort: München
Familienstand: Ledig

Schulbildung:

09/83 bis 09/87 Grundschule an der Ährenfeldstrasse in Gröbenzell
09/87 bis 07/96 Gymnasium Gröbenzell mit Besuch des neusprachlichen
Zweigs
(Englisch, Latein, Französisch)

Universität und Forschung:

11/97 - 04/04 Studium der Medizin an der Ludwig-Maximilians-
Universität in München:
1999 Ärztliche Vorprüfung
2000 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
2003 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
2004 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

3/2000 Beginn der Promotion im Fach Humanmedizin am Insti-
tut für Zellbiologie der Ludwig-Maximilians-Universität bei
Herrn Prof. Dr. Michael Schleicher

Danksagung

Vielen Dank an Prof. Michael Schleicher für die umfassende und freundliche Betreuung und Unterstützung.

Herzlichen Dank auch an Frau Prof. Angelika Noegel und ihre Arbeitsgruppe am Institut für Biochemie I der Medizinischen Fakultät der Universität Köln, mit deren freundlicher Unterstützung Northern- und Southernblots sowie Bilder am konfokalen Mikroskop entstanden.

Besonders bedanken möchte ich mich für die Hilfe und den Rat der Technischen Assistenten in unserem Labor, vor allem Daniela Rieger, Stefan Thiel und Marc Borath. Ohne sie würde ich noch heute auf der Suche nach dem richtigen Protokoll/dem Reagenz X durch die Gänge des Labors irren.

Dank gilt natürlich auch allen Kollegen aus dem Institut für Zellbiologie, René Rost, Lars Israel, Annika Gloss, Jibi Jacob, Thomas Giebing, Hans Faix, Hyunju Son und Soo-Sim Lee, die mich bei meinen Experimenten fachlich und nicht zuletzt auch psychologisch betreut und beraten haben.

Auch bei allen Kollegen aus meinen Nachbar-Arbeitsgruppen möchte ich mich für viele hilfreiche Tips und Anregungen bedanken.

Letztlich wäre diese Arbeit aber ohne die Unterstützung meiner Eltern, meiner Großmutter, meines Bruders Michael und natürlich meiner Freundin Bettina niemals geschrieben worden. Ihnen ein ganz besonderes „Dankeschön“