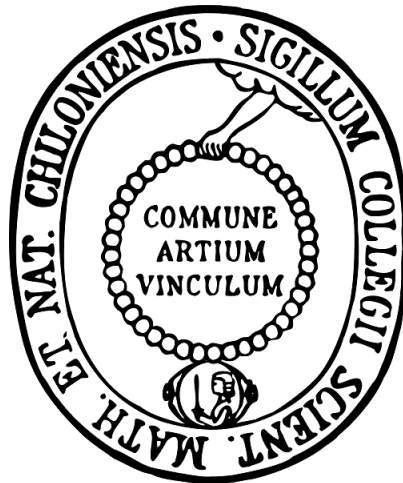


Molekulare Basis des antimikrobiellen Systems von
Dictyostelium discoideum

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel



vorgelegt von
Moritz Bitzhenner
aus Münster

Kiel, April 2013

Erster Gutachter:

Prof. Dr. Matthias Leippe

Zweiter Gutachter:

Prof. Dr. Eric Beitz

Tag der mündlichen Prüfung:

07.06.2013

Zum Druck genehmigt:

07.06.2013

gez. Prof. Dr. Wolfgang J. Duschl, Dekan

Zusammenfassung

Die soziale Amöbe *Dictyostelium discoideum* lebt als ursprünglicher Phagozyt im Waldboden, wo sie sich von Bakterien ernährt. Bei Nahrungsknappheit aggregieren die Amöben und durchlaufen einen Entwicklungszyklus, an dessen Ende ein Fruchtkörper mit Dauerstadien steht. Das einzige bisher charakterisierte antimikrobielle Effektmolekül ist das Amöbenlysozym AlyA (Müller *et al.*, 2005). Im Genom der Amöbe sind jedoch 33 *Amoebapore-like peptides* (Apls) mit jeweils einer SAPLIP-Domäne und 14 Lysozyme kodiert, die beim Abtöten der internalisierten Bakterien beteiligt sein können.

In dieser Arbeit wurden weitere antimikrobielle Proteine untersucht. Die Lysozyme DdLysEh1 – 3 und Apl B2 wurden als Protein in axenisch kultivierten Amöben nachgewiesen. Offenbar ist dazu Apl B2 proteolytisch aus einem Vorläuferprotein mit mehreren SAPLIP-Domänen herausgeschnitten worden. Des Weiteren wurden das Lysozym AlyC und die Apls E1, E2 und D in *Dictyostelium-slugs*, einem mobilen Stadium im Entwicklungszyklus, identifiziert. Für eine funktionale Analyse der Apls wurden die anionischen Proteine Apl B2 und Apl D rekombinant in einem prokaryotischen System hergestellt und gereinigt. Für rApl D wurde die Sekundärstruktur untersucht und die Tertiärstruktur modelliert. Das Protein wies mit 78,7 % hohe Anteile an α -helikalen Strukturelementen auf. Die modellierte Tertiärstruktur ähnelte der Struktur von Saposin A und zeigte die für SAPLIP-Proteine charakteristische Faltung eines globulären Proteins mit vier α -Helices und drei intramolekularen Disulfidbrücken.

Die Proteine rApl B2 und rApl D zeigten im Mikrosuszeptibilitätstest keine antimikrobielle Aktivität gegen *Escherichia coli* oder *Bacillus megaterium*, wobei die maximal eingesetzte Proteinkonzentration für rApl B2 bei 5 μ M und rApl D bei 50 μ M lag. Allerdings permeabilisierten beide Proteine die Membran der gram-positiven *B. megaterium*-Bakterien bei leicht azidischen pH-Werten. Die Membranen der gram-negativen Bakterien *E. coli* und verschiedener *Klebsiella pneumoniae*-Stämme sowie der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* und *D. discoideum* selbst wurden nicht permeabilisiert. Beide Proteine zeigten bei niedrigen pH-Werten eindeutige porenbildende Aktivität gegen Liposomen, wobei die Aktivität von rApl D an eine korrekte Faltung geknüpft war. Damit sind die beiden Proteine rApl B2 und rApl D neben dem Lysozym AlyA die einzigen in *Dictyostelium discoideum* charakterisierten antimikrobiellen Effektmoleküle und führen zu einem besseren Verständnis der intrazellulären Vorgänge beim Abtöten internalisierter Mikroorganismen.

Summary

As a soil-dwelling phagocyte the social amoeba *Dictyostelium discoideum* thrives on internalised bacteria. Upon depletion of microbial food resources the amoebae aggregate and undergo various stages of a developmental cycle resulting in a fruiting body with amoeba cysts. The only antimicrobial protein characterised so far is the amoeba lysozyme AlyA (Müller *et al.*, 2005). Genome analysis revealed a multifarious family of 33 potential amoebapore-like peptides (Apls) with a SAPLIP-domain each. Additionally, the genome harbours genes potentially coding for 14 lysozymes, which all may be involved in the killing of internalised microorganisms.

Within this thesis further antimicrobial proteins were characterised. The lysozymes DdLysEh1 – 3 and Apl B2 were identified in protein extracts from axenically cultivated amoebae. Apparently, Apl B2 has been released from a multi-domain precursor molecule. Additionally, the lysozyme AlyC and the Apls E1, E2 and D were identified in *Dictyostelium* slugs, a mobile stage of the developmental cycle.

To access the protein function the anionic proteins Apl B2 and Apl D were recombinantly expressed in a prokaryotic system and purified. The secondary structure of Apl D was analysed and its tertiary structure modelled. Apl D showed a high percentage of α -helical elements (78,7 %). The tertiary structure of rApl D was similar to Saposin A and showed the characteristic SALIP fold of a globular protein with four α -helices and three intramolecular disulphide bridges.

The proteins rApl B2 and rApl D displayed no antimicrobial activity against *Escherichia coli* or *Bacillus megaterium* at a maximum concentration of 5 μ M for rApl B2 and 50 μ M for rApl D. The proteins permeabilised the membrane of the gram-positive bacterium *B. megaterium*. The membrane integrity of the gram-negative bacteria *E. coli*, various *Klebsiella pneumoniae*-strains and the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as well as *D. discoideum* itself was unaltered.

Both proteins revealed potent pore-forming activity against liposomes at slightly acidic pH values. The activity of rApl D relies on a correct folding of the protein.

Together with AlyA the proteins rApl B2 and rApl D are the only antimicrobial molecules in *Dictyostelium discoideum* known so far and the findings will lead to a better understanding of the intracellular killing of microorganisms.

INHALTSVERZEICHNIS

ZUSAMMENFASSUNG	I
SUMMARY	II
INHALTSVERZEICHNIS.....	III
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	VII
1 EINLEITUNG	1
1.1 ANTIMIKROBIELLE PEPTIDE	1
1.2 PROTEINFAMILIE DER SAPOSIN-ÄHNLICHEN PROTEINE	5
1.3 <i>DICTYOSTELIUM DISCOIDEUM</i> ALS MODELLORGANISMUS.....	9
1.3.1 Die soziale Amöbe	9
1.3.2 Lebenszyklus	11
1.3.3 Autophagie	13
1.3.4 <i>Dictyostelium discoideum</i> als Infektionsmodell	15
1.3.5 <i>Dictyostelium discoideum</i> als Modell für menschliche Krankheiten.....	15
1.3.6 Immunsystem	16
1.3.7 Phagozytose	17
1.3.8 Antimikrobielle Proteine in der Amöbe	23
1.4 ZIELSETZUNG DER ARBEIT	29
2 MATERIAL	30
2.1 ALLGEMEINE GERÄTE	30
2.2 ZENTRIFUGEN	30
2.3 CHEMIKALIEN.....	31
2.4 VERBRAUCHSMATERIALIEN	32
2.5 PEPTIDE	32
2.6 WASSER	32
2.7 PUFFER UND MEDIEN	33
2.8 VERWENDETE ZELLINIEN UND BAKTERIEN.....	34
3 METHODEN	35
3.1 KULTUR VON <i>DICTYOSTELIUM DISCOIDEUM</i> IM LABOR.....	35

3.1.1	Zellkultur	35
3.1.2	Zellzahlbestimmung	35
3.1.3	Produktion von Sporen	36
3.1.4	Proteinextraktion aus <i>Dictyostelium</i> -Zellen	36
3.1.5	Proteinextraktion mit Essigsäure.....	36
3.2	METHODEN FÜR DIE REKOMBINANTE EXPRESSION	37
3.2.1	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	37
3.2.2	Agarose-Gelelektrophorese	38
3.2.3	DNA-Reinigung aus Agarosegelen	38
3.2.4	Konzentrationsbestimmung der Nukleinsäuren.....	38
3.2.5	Herstellung der DNA-Konstrukte für die rekombinante Expression	39
3.2.6	Restriktionsenzymatische Spaltung von DNA	39
3.2.7	Ligation	39
3.2.8	Transformation in chemisch kompetente <i>Escherichia coli</i> -Zellen	39
3.2.9	Überprüfung der Transformation.....	40
3.2.10	Plasmid-Amplifikation und Reinigung.....	40
3.2.11	Sequenzierung von Nukleotiden	41
3.2.12	Rekombinante Synthese von Apls in <i>Escherichia coli</i> -Bakterien.....	41
3.2.13	Rekombinante Expression von rApl D	42
3.2.14	Proteinextraktion aus Bakterien	43
3.2.15	Immobilisierte Metallionenaffinitätschromatographie (IMAC)	43
3.2.16	Pufferaustausch.....	44
3.2.17	Proteinreinigung über <i>fast protein liquid chromatography</i> (FPLC).....	44
3.2.17.1	Anionenaustausch-Chromatographie	44
3.2.17.2	Umkehrphasen-Chromatographie	45
3.2.18	Proteolytische Spaltung	45
3.3	ALLGEMEINE MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN.....	45
3.3.1	Phagolysosomenpräparation	45
3.3.2	Licht-induzierte Herstellung von <i>slugs</i>	47
3.3.3	Gefriertrocknung	48
3.3.4	BCA-Test.....	48
3.3.5	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	48
3.3.6	Probenvorbereitung für SDS-PAGE	50
3.3.7	2D-Gelelektrophorese.....	51
3.3.7.1	Isoelektrische Fokussierung.....	52
3.3.7.2	Vorbereitung des IEF-Streifens für die zweite Dimension	53

3.3.7.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	53
3.3.8	Proteinfärbung	54
3.3.8.1	Coomassiefärbung nach Kang <i>et al.</i> (2002)	54
3.3.8.2	Coomassiefärbung nach Gelhaus	54
3.3.8.3	Silberfärbung nach Heukeshoven und Dernick (1985)	55
3.3.8.4	Proteinfärbung mit Flamingo	55
3.3.9	Bioinformatik	55
3.3.10	Massenspektrometrie	56
3.3.10.1	Probenvorbereitung für Massenspektrometrie Zoophysiologie	57
3.3.10.2	Probenvorbereitung für Massenspektrometrie IEM (LC-MS)	58
3.3.11	Circulardichroismus-Spektropolarimetrie	59
3.3.12	Modellierung der Tertiärstruktur	60
3.4	AKTIVITÄTSTESTS	60
3.4.1	Mikrosuszeptibilitätstest	60
3.4.2	Hämolysetest	62
3.4.3	Membranpermeabilisierungstest mit SYTOX®Green	62
3.4.4	Liposomendepolarisationstest	64
3.4.4.1	Liposomenpräparation	64
3.4.4.2	Porenbildende Aktivität	65
4	ERGEBNISSE	66
4.1	QUALITATIVE ANALYSE ANTIMIKROBIELLER PROTEINE IN <i>D. DISCOIDEUM</i>	66
4.1.1	Proteomische Analyse von <i>Dictyostelium</i> -Phagolysosomen	66
4.1.2	Proteomische Analyse von axenischen <i>Dictyostelium</i> -Zellen	73
4.1.3	Proteomische Analyse von <i>Dictyostelium-slugs</i>	75
4.1.4	Zusammenfassung der Ergebnisse der proteomischen Analysen	79
4.2	REINIGUNG UND REKOMBINANTE EXPRESSION AUSGEWÄHLTER APLS	80
4.2.1	Reinigung antimikrobieller Effektormoleküle aus <i>D. discoideum</i>	80
4.2.2	Rekombinante Expression von Apls	80
4.2.2.1	Herstellung der Genkonstrukte	80
4.2.2.2	Rekombinante Expression	82
4.2.2.3	Aminosäurezusammensetzung von rApl D und rApl B2	86
4.2.2.4	Faltung von rApl D	87
4.2.2.5	Tertiärstruktur von rApl D	88
4.3	FUNKTIONSANALYSEN DER REKOMBINANT HERGESTELLTEN PROTEINE	89
4.3.1	Aktivitäten von rApl B2 und rApl D im Mikrosuszeptibilitätstest	89

4.3.2	Hämolytische Aktivität von rApl D	90
4.3.3	Membranpermeabilisierende Aktivität gegen Bakterien	91
4.3.3.1	Membranpermeabilisierende Aktivität von rApl B2	91
4.3.3.2	Membranpermeabilisierende Aktivität von rApl D	92
4.3.4	Membranpermeabilisierende Aktivität von rApl D gegen Eukaryoten	96
4.3.5	Porenbildende Aktivität von rApl B2 und rApl D	97
4.3.6	Aktivität von rApl D in Abhängigkeit der Faltung	99
5	DISKUSSION.....	101
6	LITERATURVERZEICHNIS.....	121
7	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	142
8	APPENDIX.....	146
	ERKLÄRUNG	153
	DANKSAGUNG	154

Abkürzungsverzeichnis

AAMP	anionisches antimikrobielles Peptid
Abb.	Abbildung
ABC	Ammoniumbicarbonat
ACHC	α -Cyano-4-Hydroxy-Zimtsäure
ACN	Acetonitril
Aly	<i>amoeba lysozyme</i> (Amöbenlysozym)
AMP	antimikrobielles Peptid
AOAH	Acyloxyacylhydrolase
Apl	<i>Amoebapore like peptide</i>
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäurereste
Atg	<i>Autophagy</i>
ATP	Adenosintriphosphat
BLAST	<i>Basic local alignment search tool</i>
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
BPB	Bromphenolblau
cAMP	cyclisches 3',5'-Adenosinmonophosphat
CF	<i>Counting factor</i>
CFU	<i>Colony forming units</i> (Kolonie-bildende Einheiten)
CHAPS	3-[(3-cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propansulfonat
CMF	<i>Conditioned medium factor</i>
Cys	Cysteinrest
Da	Dalton
DdLysEh	<i>Dictyostelium discoideum lysozyme Entamoeba histolytica type</i>
DIF1	<i>Differentiation inducing factor 1</i>
DLPC	Dilauroylphosphatidylcholin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ECSRT	<i>Endosomal sorting complexes required for transport</i>
EtOH	Ethanol
<i>et al.</i>	und andere (<i>et alii</i>)

FACS	<i>Fluorescence activated cell sorting</i>
FPLC	<i>Fast protein liquid chromatography</i>
°C	Grad Celsius
g	Gramm
<i>g</i>	<i>g-force = relative centrifugal force (RCF) (relative Zentrifugalkraft)</i>
GAG	Glykosaminoglykane
GFP	<i>Green fluorescent protein</i> (Grün fluoreszierendes Protein)
GO-term	<i>Gene ontology-term</i>
h	Stunde
H ₂ O	Milliporewasser
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i> (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie)
HCl	Salzsäure
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
IAA	Iodacetamid
ICN	<i>International Code of Nomenclature for algae, fungi, and plants</i>
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IEM	Institut für experimentelle Medizin
IMAC	Immobilisierte Metallionenaffinitätschromatographie
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
L	Liter
LB	Luria-Bertani
LC-MS	Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung
LCV	<i>Legionella-containing vacuole</i>
LPS	Lipopolysaccharide
LRRs	<i>leucine rich repeats</i>
M	molar
MALDI	<i>Matrix assisted laser desorption/ionisation</i>
MB	Megabasenpaare
MBC	<i>Minimal bactericidal concentration</i> (minimale bakterizide Konzentration)
MeOH	Methanol
MIC	<i>Minimal inhibitory concentration</i> (minimale inhibitorische Konzentration)
MOPS	3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure
MS	Massenspektrometrie
MSC	<i>Multiple cloning site</i> (Multiple Klonierungsstelle)

MWCO	<i>Molecular weight cut off</i> (Molekulargewichtsausschlussgrenze)
mA	Milliampere
mg	Milligramm
µg	Mikrogramm
min	Minute
ml	Milliliter
mM	millimolar
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	mikromolar
N	Normal
nM	nanomolar
nm	Nanometer
NRAMP	<i>Natural resistance associated macrophage protein</i>
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei 600 nm
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAP	Phosphoadenosinphosphat
PC	Phosphatidylcholin
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PE	Phosphatidylethanolamin
pI	isoelektrischer Punkt
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinasen
PMF	<i>Peptide mass fingerprint</i> (Peptidmassen-Fingerabdruck)
PS	Phosphatidylserin
PSF	<i>Pre-starvation factor</i>
rApl B2	rekombinant hergestelltes Apl B2
rApl D	rekombinant hergestelltes Apl D
rpm	<i>Rounds per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
Sad	<i>Substrate adhesion-deficient</i>
SAPLIP	Saposin-like Protein (Saposin-ähnliches Protein)
s-cells	<i>sentinel cells</i>
SDS	<i>Sodiumdodecylsulfate</i> (Natriumdodecylsulfat)
Sib	<i>Similar to Integrin Beta</i>
Slr	<i>s-cell enriched leucine rich repeat</i>

Tab.	Tabelle
TBS	<i>Tris buffered saline</i> (isoosmotischer Tris-Puffer)
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TFA	Trifluoressigsäure
Tir	<i>Toll/interleukin-1 receptor</i>
TOR	<i>Target of rapamycin</i>
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-methylamin
U	Units (Einheiten)
V	Volt
Vmp	<i>Vacuolar membrane protein</i>
Vps	<i>Vacuolar protein sorting</i>
v/v	<i>Volume per volume</i> (Volumen pro Volumen)
w/v	<i>Weight per volume</i> (Gewicht pro Volumen)

1 Einleitung

Infektionskrankheiten sind weltweit die zweithäufigste Todesursache und werden von Viren, Bakterien, Pilzen und Parasiten hervorgerufen (WHO, 2011). Damit Organismen potenziellen Pathogenen nicht völlig schutzlos ausgeliefert sind, haben Eukaryoten verschiedene Abwehrmechanismen entwickelt. Neben der physikalischen Barriere einer Membran oder Zellwand schützen das angeborene und das adaptive Immunsystem vor gesundheitsschädlichen Angriffen. Während das adaptive Immunsystem eine Errungenschaft der Wirbeltiere darstellt und eine langfristige, spezifische und wandlungsfähige Immunabwehr ermöglicht, ist das angeborene Immunsystem das Verteidigungssystem der Lebewesen von den Amöben bis zum Menschen. Es attackiert unspezifisch eine Vielzahl verschiedener potenzieller Pathogene und wirkt dadurch schon wenige Minuten nach der Invasion des Mikroorganismus. In höheren Organismen gehören die phagozytisch aktiven Immunzellen wie Makrophagen, dendritische und natürliche Killer-Zellen (NK-Zellen) zum angeborenen Immunsystem, während in phylogenetisch basaleren Invertebraten die eingedrungenen Pathogene z.B. durch das Prophenoloxidase-System und durch antimikrobielle Peptide bekämpft werden.

1.1 Antimikrobielle Peptide

Um den Bedrohungen durch die mikrobielle Welt adäquat zu begegnen, produzieren Lebewesen antimikrobielle Peptide (AMPs). Diese Effektormoleküle des angeborenen Immunsystems sind evolutionär konserviert und stellen für viele Organismen, von den Einzellern bis zum Menschen, die erste Abwehrreihe dar (Jenssen *et al.*, 2006). AMPs sind zwischen 12 und 100 Aminosäurereste lang und wirken gegen gram-negative und gram-positive Bakterien (Jenssen *et al.*, 2006), Parasiten (Löfgren *et al.*, 2008), Pilze (Aerts *et al.*, 2008), Viren (Slocinska *et al.*, 2008) und Krebszellen (Lu *et al.*, 2008). Der Wirkmechanismus ist nicht vollständig geklärt, allerdings ist es allgemein akzeptiert, dass die meist positiv geladenen Peptide mit den anionischen Bestandteilen der Bakterienmembran interagieren. Dadurch wird die Integrität der Lipiddoppelschicht zerstört und es kommt durch Permeabilisation, Lyse oder Depolarisation der Membran zum Tod der Zelle.

Für viele AMPs ist die Bildung einer Pore in der Zielzellmembran nachgewiesen (Brogden, 2005), dabei werden drei verschiedene Modelle postuliert (**Abb. 1**):

Barrel-stave-Modell: Die angelagerten Peptide aggregieren und bilden eine Transmembranpore aus parallel angeordneten Peptiden ähnlich den Dauben eines Holzfasses. Die hydrophoben Regionen der Peptide sind den Lipiden zugewandt, während die hydrophilen Seiten der Peptide das Innere der Pore bilden. Das porenbildende Protein Alamethicin aus *Trichoderma viride* bildet in Dilauroylphosphatidylcholin (DLPC) eine Pore aus 8 – 9 Monomeren. Die Pore hat einen äußeren Durchmesser von ~4 nm und einen Innendurchmesser von ~1,8 nm und lässt Wasser und Ionen ungehindert passieren (He *et al.*, 1996). Abhängig von der Membranzusammensetzung bildet Alamethicin unterschiedlich große Poren.

Toroidal-pore-Modell: Die Anlagerung der Peptide führt zu einer Einstülpung der Membran. Es entsteht eine Pore, in der sich die polaren Bereiche der inserierten Peptide mit den polaren Kopfgruppen der Membran abwechseln. Im Gegensatz zum *Barrel-stave-Modell* sind die Peptide stets mit den polaren Kopfgruppen der Membran assoziiert und haben keinen Kontakt zum unpolaren Kern der Membran. Das im afrikanischen Krallenfrosch entdeckte Magainin induziert toroidale Poren. Zusammen mit ~90 Lipidmolekülen reichen 4 – 7 Monomere des Peptids zum Einbau einer Pore mit einem äußeren Durchmesser von 7 – 8,5 nm und einem Innendurchmesser von 3 – 5 nm (Matsuzaki *et al.*, 1997). Die Poren sind dementsprechend größer und in ihrer Größe variabler als Alamethicin-Poren.

Carpet-Modell: Die Anlagerung der Peptide erfolgt parallel zur Membranoberfläche. Die Peptide werden elektrostatisch von den anionischen Kopfgruppen angezogen bis die Membran mit einem Teppich an Peptiden bedeckt ist (Shai, 1999). Anschließend wird die Membran ähnlich dem Mechanismus von Detergenzien aufgelöst, sodass sich Mizellen bilden (Ladokhin und White, 2001). Für das *Carpet-Modell* werden vergleichsweise hohe Peptidkonzentrationen benötigt.

Häufig sind die einzelnen Modelle nicht klar voneinander zu trennen bzw. wirken nacheinander oder zusammen bei der Zerstörung der Zielzellmembran. So sind in dem Shai-Matsuzaki-Huang-Modell (Matsuzaki, 1999; Shai, 1999; Yang *et al.*, 2000) die verschiedenen Modelle vereint. Einer Peptidanlagerung nach dem *Carpet-Modell* folgt der Einbau einer transienten toroidalen Pore, was final zum Zusammenbruch der Membranintegrität führt (Zaslhoff, 2002).

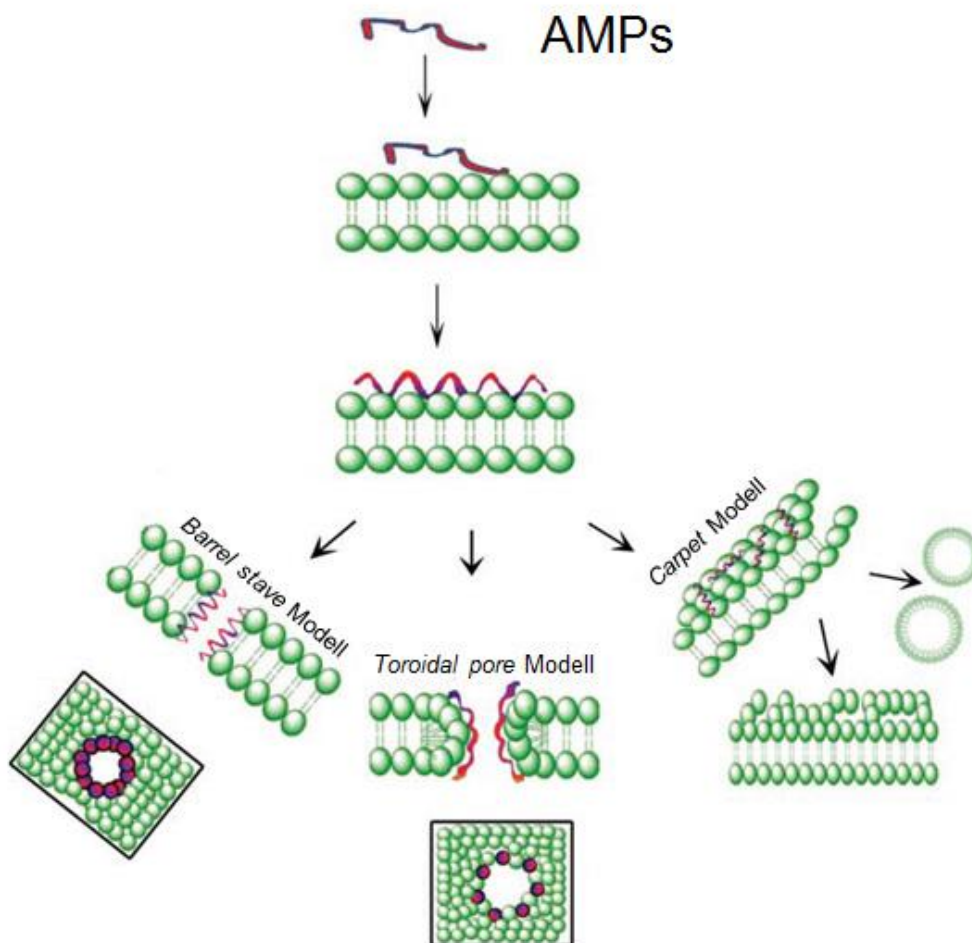


Abb. 1: Modelle des Wirkmechanismus antimikrobieller Peptide. Die ungefalteten Proteine ändern ihre Konformität durch die Anlagerung an die negativ geladene Membran. Im Barrel-stave- und im Toroidal-pore-Modell entsteht ein physisches Loch in der Zellmembran, was den Zusammenbruch des Ionengradienten nach sich zieht. Im Carpet-Modell wird die Zellmembran durch die Anlagerung der AMPs aufgelöst (Abbildung aus Pasupuleti *et al.*, 2011).

Die Möglichkeiten der Bakterien zur Ausbildung von Resistenzen gegenüber AMPs sind sehr beschränkt, da für einen effektiven Schutz die Zusammensetzung der Bakterienmembran verändert werden muss. Die nötigen Umstrukturierungen sind aufwendig und für andere physiologische Prozesse nachteilig. Zusätzlich müsste der Resistenzmechanismus bei einer Vielzahl verschiedener AMPs greifen. Dennoch ist es möglich, *in vitro* niedrige Empfindlichkeiten der Bakterien gegen einzelne AMPs hervorzurufen. Glykosaminoglykane (GAG), Polysaccharide und andere anionische Moleküle können AMPs binden und inaktivieren (Schmidtchen *et al.*, 2002). Die Sekretion von Proteasen und die Modulation der Membran gehören ebenfalls zu beschriebenen Mechanismen (Nizet, 2006). Unter Laborbedingungen entwickelten *Escherichia coli* und *Pseudomonas fluorescens* unter ständigem Selektionsdruck durch

das Magainin-Analogon Pexiganan nach 600 - 700 Generationen eine vererbare Anpassung an das AMP (Perron *et al.*, 2006). Trotzdem bleibt die Entwicklung von Resistenzen unter *In-vivo*-Bedingungen äußerst unwahrscheinlich. Diese Hypothese wird nicht zuletzt durch die seit Millionen von Jahren unveränderte Struktur und Effektivität von AMPs unterstützt.

Neben der Bildung transienter Poren sind auch andere Wirkmechanismen für AMPs beschrieben. Einige Peptide wirken im Inneren der Zelle, wo sie die DNA- oder Proteinbiosynthese blockieren (Cudic und Otvos, 2002). Ebenso ist eine immunmodulierende Funktion von AMPs bekannt (Yang *et al.*, 2002). Humanes β -Defensin interagiert beispielsweise mit Chemokin-Rezeptoren (Hoover *et al.*, 2002).

Die große Mehrzahl antimikrobieller Peptide ist kationisch, es gibt allerdings ca. 100 beschriebene AMPs mit einer negativen Nettoladung. Diese anionischen antimikrobiellen Peptide (AAMPs) sind in Säugern (Brogden *et al.*, 1996), Invertebraten (Destoumieux-Garzón *et al.*, 2001) und Pflanzen (Pelegri *et al.*, 2007) beschrieben und haben eine Nettoladung von -1 bis -7 und eine molekulare Masse zwischen 0,5 kDa und 8 kDa (Harris *et al.*, 2009). Für die antimikrobielle Aktivität der AAMPs ist anscheinend die Interaktion mit Membranen ein wichtiger Schritt, wobei der genaue Mechanismus noch nicht geklärt ist. Als Voraussetzung für die antimikrobielle Aktivität werden die amphipatische Struktur, die Interaktion mit Rezeptoren oder der Gebrauch von Metallionen zur Bildung von kationischen Salzbrücken diskutiert. Das bekannteste humane AAMP ist das Dermcidin (Schitteck *et al.*, 2001), welches konstitutiv als Vorläuferprotein in Schweißdrüsen produziert und aus dem proteolytisch die aktive Domäne herausgeschnitten wird.

Im Hintergrund einer ständig steigenden Zahl an multiresistenten Bakterien in Krankenhäusern und in der Landwirtschaft werden AMPs eine bedeutende Rolle in der zukünftigen Behandlung von Infektionskrankheiten zugesprochen.

Allerdings weisen AMPs eine Reihe intrinsischer Unzulänglichkeiten auf, die den Einsatz als Therapeutikum erschweren. Die Peptide sind susceptibel gegenüber Proteasen, es gibt wenige Informationen bezüglich ihrer Immunogenität (Kovacs-Nolan *et al.*, 2009), die Peptide dürfen keine zytotoxische Aktivität gegenüber gesunden eukaryotischen Zellen haben und müssen unter physiologischen Bedingungen funktionieren (Fedders *et al.*, 2008; Pasupuleti *et al.*, 2012). Die Herstellung der Peptide in großem Maßstab ist bisher sehr kostenintensiv. Methodisch stehen die direkte Reinigung aus dem Ursprungsorganismus, eine rekombinante Herstellung in einem prokaryotischen System oder die biochemische Peptidsynthese zur Verfügung. Erstere wird in der Regel zur

Identifikation neuer AMPs verwendet. Die rekombinante Expression von Peptiden in Bakterien ist weit verbreitet und verhältnismäßig einfach zu realisieren.

Jedoch erschwert die toxische Wirkung des Expressionsprodukts gegenüber dem prokaryotischen System häufig die direkte Herstellung von AMPs. Daher wird das Peptid zumeist als Fusionsprotein hergestellt, um die Ausbeute, die Löslichkeit und die Reinigung zu vereinfachen (Zorko und Jerala, 2010). Nicht selten verhindern die verschiedenen Schritte der Isolation, Spaltung und Faltung des Proteins eine problemfreie Produktion von AMPs.

Die biochemische Peptidsynthese ist für Peptide bis zu einer Größe von 50 Aminosäureresten etabliert. Allerdings ist die Methode durch die Reinigung mit Hilfe der *high performance liquid chromatography* (HPLC) noch sehr teuer und für große Mengen ungeeignet.

Eine weitere Option sind Peptidomimetika. Dabei wird die Struktur antimikrobieller Substanzen kopiert und als chemisches Analogon hergestellt (Appelt *et al.*, 2007).

AMPs könnten bei der Behandlung von Krankenhausinfektionen mit multiresistenten Bakterien (MRSA = Methicillin-resistenter Staphylococcus aureus) oder Katheterbezogenen Infektionen zum Einsatz kommen. Pexiganan (Ge *et al.*, 1999) von *Access Pharmaceuticals* ist der bekannteste Vertreter eines AMPs, das als zugelassenes Therapeutikum bei der Behandlung akuter Infektionen verwendet wird (Pasupuleti *et al.*, 2012). Pexiganan wird als Salbe lokal bei der Behandlung von infektiösen Ulzera aufgrund von Diabetes mellitus eingesetzt (Lipsky *et al.*, 2008).

Allen Vorzügen der AMPs zum Trotz ist die Liste der Kandidaten, die in einer der drei klinischen Versuchsphasen gescheitert sind, lang (Pasupuleti *et al.*, 2012).

1.2 Proteinfamilie der Saposin-ähnlichen Proteine

Einige AMPs gehören zur Proteinfamilie der Saposin-ähnlichen Proteine. Die SAPLIPs (*saposin-like proteins*) werden durch ihre strukturelle Gemeinsamkeit definiert (Kishimoto *et al.*, 1992). Die SAPLIP-Domäne enthält ein konserviertes Muster aus sechs Cysteinresten und einigen weiteren hydrophoben Aminosäureresten (Munford *et al.*, 1995), die den Proteinkern bilden. Die Cysteinreste sind an der Ausbildung von drei Disulfidbrücken beteiligt. Die meisten der bisher aufgeklärten Tertiärstrukturen zeigen vier bis fünf amphipathische α -Helices (Liepinsh *et al.*, 1997; Ahn *et al.*, 2003; Anderson *et al.*, 2003; de Alba *et al.*, 2003; Hecht *et al.*, 2004; Popovic und Privé, 2008; Mysliwy *et*

al., 2010) mit drei Disulfidbrücken (Ausnahme Granulysin) (**Abb. 2**). Es sind allerdings auch Proteine beschrieben, die die charakteristische SAPLIP-Faltung ohne das typische Cysteinmuster zeigen, z. B. Bacteriocin AS-48 (González *et al.*, 2000). Funktional interagieren die SAPLIPs mit Lipiden.

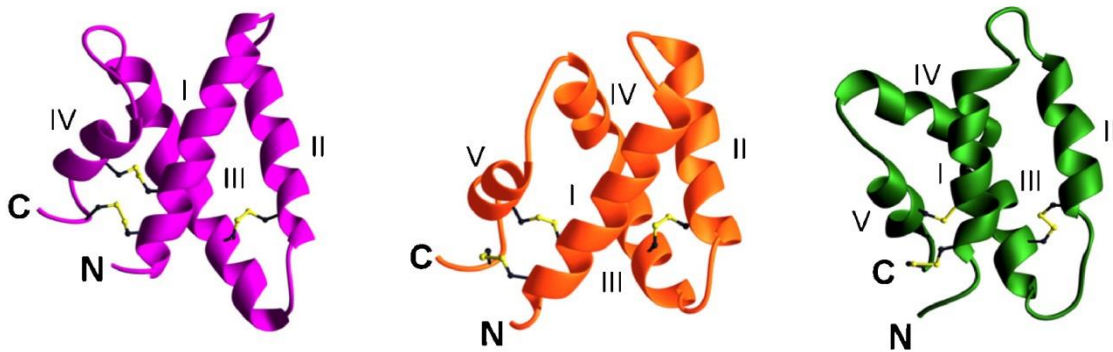


Abb. 2: Tertiärstruktur von Saposin A (magenta), NK-Lysin (orange) und *Amoebapore A* (grün). Alle Proteine zeigen vier - fünf α -Helices mit drei internen Disulfidbrücken (Abbildung aus Mysliwy *et al.*, 2010).

Das menschliche Genom trägt sieben Gene für 11 funktional unterschiedliche Vorläuferproteine mit einer SAPLIP-Domäne (Bruhn, 2005). Die ersten charakterisierten Proteine waren die namensgebenden Saposine des Menschen. Die vier glykosylierten Proteine Saposin A – D entstammen einem gemeinsamen Vorläuferprotein namens Prosaposin (pSAP) und werden durch proteolytische Spaltung freigesetzt. Saposine sind nicht-enzymatische, saure, hitzestabile und Protease-resistente Proteine mit einem Molekulargewicht zwischen 8 – 11 kDa. Sie vermitteln den Abbau von Sphingolipiden durch Glykosidasen, die für die Verstoffwechslung von Membranen und Sphingolipiden benötigt werden, oder interagieren selbst mit Membranen. Die Proteine bilden dadurch eine Brücke zwischen den Lipidsubstraten und den wasserlöslichen Hydrolasen (Darmoise *et al.*, 2010). Trotz der hohen Sequenzidentität zeigen die Saposine als membraninteragierende Lipidbindungs- und Transferproteine unterschiedliche Mechanismen und Spezifitäten.

Saposin A aktiviert die Hydrolyse von β -Galaktosylceramid über die Galaktosylceramid- β -Galaktosidase (Morimoto *et al.*, 1989) und löst unter leicht sauren Bedingungen (< pH 4,7) Lipide aus Liposomen heraus (Locatelli-Hoops *et al.*, 2006).

Defekte in den Genen für Saposin B und C zeigen eine Anhäufung bestimmter Sphingolipide in der Zelle (O'Brien, 1972; Bradová *et al.*, 1993), was zu lysosomalen Speicherkrankheiten wie Morbus Gaucher (Tamargo *et al.*, 2012) führen kann.

Saposin D stimuliert die saure Ceramidase und Sphingomyelinase (Ciaffoni *et al.*, 2001) und ist bei niedrigeren pH-Werten aktiv (Vacarro *et al.*, 1995). Des Weiteren sind die Proteine bei der Präsentation von Lipid-Antigenen für T-Lymphozyten über CD1-Rezeptoren involviert (Darmoise *et al.*, 2010).

Die menschliche Acyloxyacylhydrolase (AOAH) verfügt ebenfalls über eine SAPLIP-Domäne. AOAH wird in Makrophagen, dendritischen Zellen und neutrophilen Granulozyten produziert und wurde erstmals 1983 im Menschen beschrieben (Hall und Munford, 1983), es gibt jedoch eine ältere Veröffentlichung in der ein Enzym mit ähnlichen Eigenschaften in *Dictyostelium discoideum* gefunden wurde (Nigam *et al.*, 1970). AOAH ist eine Lipase, die die Acyloxyacyl-Bindungen in der Lipid A-Region von bakteriellen Lipopolysacchariden (LPS) hydrolysiert und damit dessen Wirkung als Endotoxin reduziert (Munford und Hunter, 1992). AOAH wird als Vorläuferprotein synthetisiert und proteolytisch in zwei Untereinheiten gespalten, wobei die kleine Untereinheit die SAPLIP-Domäne enthält. Die beiden Untereinheiten sind über eine intermolekulare Disulfidbrücke verbunden (Munford *et al.*, 2009).

Bei den Amöben sind auch Lipid-interagierende SAPLIPs beschrieben worden. Aus *Entamoeba histolytica*, dem Erreger der Amöbiasis, wurde ein Protein (SAPLIP 3) mit Membran-fusionierenden Eigenschaften isoliert. Das rekombinant hergestellte SAPLIP 3 funktioniert ähnlich wie Saposin C und fusioniert Phosphatidylserinvesikel bei leicht sauren pH-Werten. Porenbildende oder antimikrobielle Aktivität wurde für SAPLIP 3 nicht nachgewiesen (Winkelmann *et al.*, 2006).

Viele SAPLIPs zeichnen sich durch ihre ausgeprägte antimikrobielle Aktivität aus. Humanes Granulysin (Peña *et al.*, 1997) und das Homolog vom Schwein (NK-Lysin) (Andersson *et al.*, 1995) sind Effektorproteine des angeborenen Immunsystems und in den Granula von T-Lymphozyten und NK-Zellen lokalisiert. Granulysin ist aktiv gegen gram-positive und gram-negative Bakterien und gegen Pilze (Stenger, 1998). Die Tertiärstruktur von Granulysin zeigt die charakteristische SAPLIP-Faltung mit 5 α -Helices (Anderson *et al.*, 2003). Die Struktur und die stark positive Ladung lassen auf Interaktionen mit LPS und den negativ geladenen Kopfgruppen von Phospholipiden schließen (Anderson *et al.*, 2003). In Kombination mit dem porenbildenden Protein Perforin werden intrazelluläre Pathogene wie *Mycobacterium tuberculosis* (Stenger, 1998) und *Plasmodium falciparum* (Farouk *et al.*, 2004) abgetötet.

Als eines der ersten antimikrobiellen SAPLIPs wurden die *Amoebapores* von *Entamoeba histolytica* charakterisiert (Leippe *et al.*, 1991; Leippe, 1997). Im Genom der

Amöbe sind 19 potenzielle SAPLIPs kodiert (Winkelmann *et al.*, 2006). *Amoebapores* sind in den zytoplasmatischen Granula der Zelle lokalisiert und kommen in den drei Isoformen *Amoebapore* A, B und C vor. Alle Polypeptide bestehen aus 77 Aminosäureresten und haben eine molekulare Masse von ~8 kDa (Leippe *et al.*, 1992; Leippe *et al.*, 1994). Sie besitzen das für die Familie der SAPLIPs typische Cysteinmuster und den charakteristischen SAPLIP-Faltungstyp, wie die Aufklärung der Tertiärstruktur (Hecht *et al.*, 2004; Leippe *et al.*, 2005) zeigte.

Die primäre Funktion der Proteine ist das Abtöten von internalisierten Bakterien, wobei beim invasiven Verlauf der Amöbiasis (Amöbenruhr) auch eukaryotische Wirtszellen effizient lysiert werden. Der Mechanismus der Zelllyse beruht auf der Bildung einer Pore in der Zellmembran. *Amoebapore* A zeigt eine pH-abhängige Bildung von Dimeren, die wiederum zu Hexameren oligomerisieren (**Abb. 3**) und in der Membran eine stabile Pore von 2 nm Durchmesser bilden. Dabei kleiden die hydrophilen Reste das Innere der Pore aus, während die hydrophoben Reste an der Außenseite zu finden sind (**Abb. 3**) (Leippe *et al.*, 2005).

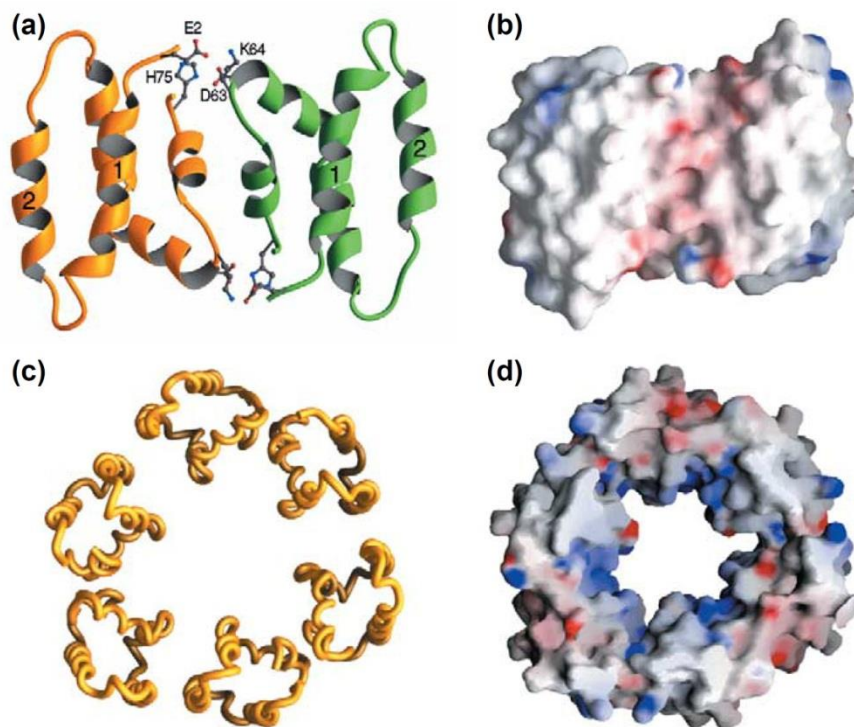


Abb. 3: Strukturmodell des Dimers und Hexamers von *Amoebapore* A. Darstellung eines *Amoebapore*-Dimers (**a**) als Bandmodell und (**b**) mit seinem elektrostatischen Oberflächenpotential. Reste mit positivem Oberflächenpotential sind in blau, Reste mit negativem Potential sind in rot und unpolare Aminosäurereste sind in weiß gezeigt. (**c**) Sechs *Amoebapores* bilden eine hexamere Pore. (**d**) Darstellung des elektrostatischen Oberflächenpotentials des Hexamers. Die hydrophilen Aminosäurereste mit einem positiven Oberflächenpotential kleiden das Innere der Pore aus (Abbildung aus Leippe *et al.*, 2005).

Um nicht selbst dem eigenen zytotoxischen Arsenal zum Opfer zu fallen, verfügt *E. histolytica* über eine spezielle Zusammensetzung von Lipiden in der Membran, bei der das ungewöhnliche Phosphonolipid Ceramidaminoethanolamin und ein hoher Anteil an Cholesterin zu finden sind (Andrä *et al.*, 2004). Dadurch wird die Anheftung der *Amoebapores* an die eigene Zellmembran verhindert.

1.3 *Dictyostelium discoideum* als Modellorganismus

1.3.1 Die soziale Amöbe

Zur Analyse allgemeiner biologischer Fragestellungen werden die sogenannten Modellorganismen zur Hilfe genommen. Diese zeichnen sich durch eine verhältnismäßig kurze Generationszeit sowie eine kostengünstige und einfache Haltung aus. Ferner sind ihre Genome sequenziert und die Organismen gut zugänglich für gentechnische Methoden. Die bekanntesten Modellorganismen sind die Maus (*Mus musculus*), die Taufliege (*Drosophila melanogaster*) und der Fadenwurm (*Caenorhabditis elegans*). Die frei lebende soziale Amöbe *Dictyostelium discoideum* erfüllt ebenso alle erforderlichen Eigenschaften und ist seit Mitte des letzten Jahrhunderts ein bedeutendes Forschungsobjekt für Evolutions- und Zellbiologen.

D. discoideum wurde erstmals von Kenneth Brian Raper im Sommer 1933 aus verrottendem Laub in den Bergen North Carolinas isoliert und 1935 wissenschaftlich beschrieben (Raper, 1935). Zusammen mit ca. 70 weiteren Arten gehört *D. discoideum* zur Unterklasse der Dictyostela, deren erste entdeckte Art *Dictyostelium murocoides* bereits 1869 von dem deutschen Mykologen Julius Oscar Brefeld beschrieben wurde (Brefeld, 1869). Die phänotypische Ähnlichkeit der Fruchtkörper mit denen von Pilzen führte zur fälschlichen Bezeichnung als „Schleimpilz“. Dass neu entdeckte Arten weiterhin nach den Statuten des ICN (*International Code of Nomenclature for algae, fungi, and plants*) eingestuft werden, ist ein Relikt der frühen Fehl kategorisierung. Brefeld war auch der Namenspatron für *Dictyostelium*. Es wurden das griechische *Dictio-* (δίκτηνον = Netz), das botanische Präfix für netzartige Strukturen, mit *-stelium* (Turm) verbunden. Letzterer Term bezog sich auf die Form der Fruchtkörper. Anders als bei den nah verwandten Myxogastria, entsteht bei *Dictyostelium* nach der Aggregation kein Synzytium aus vielen Zellen, sondern die Zellen bleiben individuell erhalten.

Dictyostelium discoideum gehört ins Reich der Protista und dort zu den Amoebozoa, die sich durch ihre amöboide Fortbewegungsweise mittels Pseudopodien auszeichnen

(Simpson und Roger, 2004). Die Amoebozoa werden in acht Gruppen unterteilt (Adl *et al.*, 2005), wobei die Eumycetozoa weiter in die Gruppen der Myxogastria, Protostelia und Dictyostelia aufgeteilt werden. *D. discoideum* hat sich kurz nach der Trennung von Pflanzenzellen, aber noch vor der Trennung von Tier- und Pilzzellen abgespalten (**Abb. 4**) (Eichinger *et al.*, 2005).

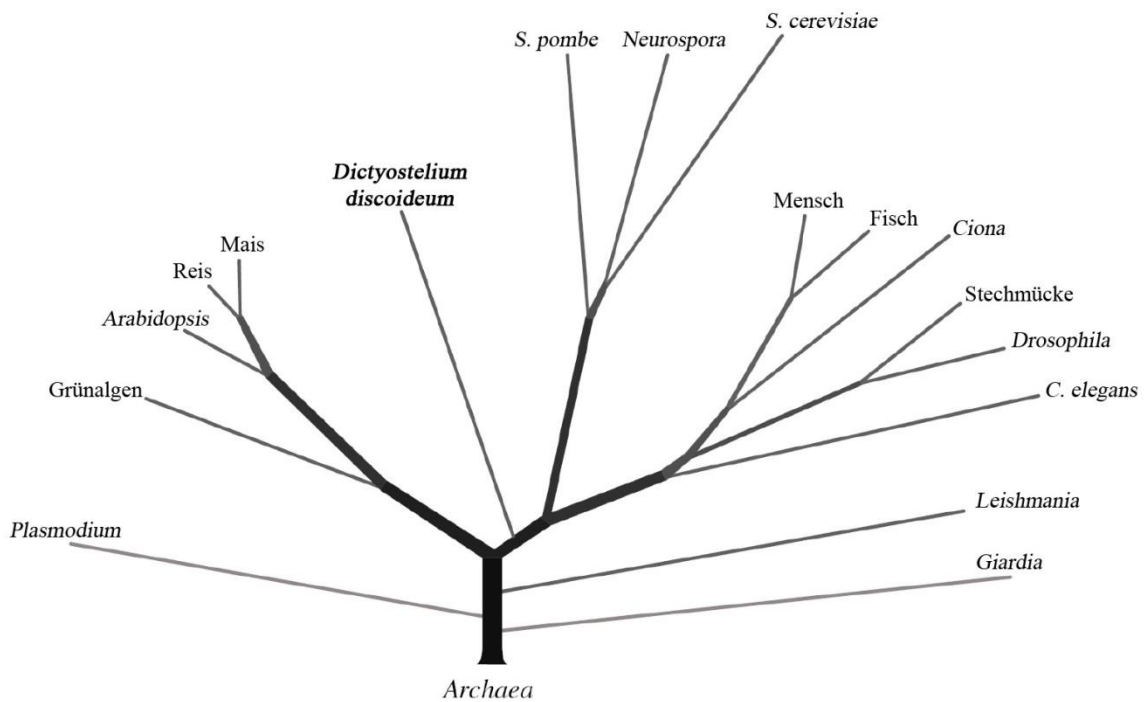


Abb. 4: Proteombasierte eukaryotische Phylogenie. Die Abspaltung von *Dictyostelium discoideum* erfolgte kurz nach der Trennung von Pflanzenzellen und Tier- bzw. Pilzzellen. (Abbildung aus Eichinger *et al.*, 2005)

Das haploide Genom der Amöbe ist mit 34 Mb auf sechs Chromosomen als kompakt anzusehen und mit 77,5 % sehr Adenin und Thymin-reich. Insgesamt sind ~12.500 Proteine in den Genen kodiert.

1.3.2 Lebenszyklus

Der Lebenszyklus von *Dictyostelium discoideum* teilt sich in den vegetativen Lebenszyklus und eine Entwicklungsphase auf. Solange genügend Nahrungsressourcen für die Amöben zur Verfügung stehen, vermehren sich die Einzeller durch einfache Zellteilung. Bei Nahrungsmittelknappheit wird der Entwicklungszyklus initiiert (**Abb. 5 A**), an dem auch Proteine mit einer SAPLIP-Domäne beteiligt sind. An erster Stelle steht der *Pre-Starvation-Faktor* (PSF), mit dem die Zellen das Verhältnis zwischen Nahrungsangebot und Zelldichte ermitteln. Wird ein bestimmter Schwellenwert unterschritten, geben einzelne Zellen das Hungersignal *conditioned medium factor* (CMF) in das Milieu ab (Yuen *et al.*, 1995). Sobald ein Grenzwert an CMF überschritten ist und die Mehrheit der Zellen hungert, werden die Zellen sensibel gegenüber cyclischem 3',5'-Adenosinmonophosphat (cAMP) (Goidl *et al.*, 1972). Die anschließende konzertierte Abgabe von cAMP führt zur Aggregation von ~20.000 Zellen (Loomis, 1975) zu einem Pseudoplasmodium, welches sich über die Phase des *early mount* zu einem mobilen Stadium, dem *slug* (**Abb. 5 B**), weiterentwickelt. Der *slug* bewegt sich auf der Suche nach neuen Nahrungsquellen oder einem geeigneten Platz zur Fruchtkörperbildung mit einer Geschwindigkeit von bis zu einem Zentimeter in der Stunde über feuchtes Substrat. Der *slug* reagiert dabei auf äußere Reize wie Licht (Bonner, 1993), pH-Wert, Hygroskopie und Temperatur (Bonner *et al.*, 1985). Innerhalb des *slugs* sind die Zellen unterschiedlich determiniert. Der Hauptbestandteil der Zellen (80 %) ist als Pro-Sporenzelle für die „Erhaltung der Art“ verantwortlich, während sich die restlichen 20 % der Zellen als Pro-Stielzellen oder Vorläuferzellen der Basalscheibe differenzieren. Die Faktoren, die über das jeweilige Zellschicksal entscheiden, sind nicht vollständig bekannt, allerdings führt der *differentiation inducing factor 1* (DIF1) zusammen mit cAMP zur Differenzierung einer Pro-Stielzelle (Berks und Kay, 1990). Da Zellen der Null-Mutante für *dif1* weiterhin zu Pro-Sporen- und Pro-Stielzellen differenzieren können, gibt es offensichtlich noch weitere, bisher unentdeckte Faktoren (Shaulsky *et al.*, 1995).

Ist ein geeigneter Platz zur Fruchtkörperbildung gefunden, transformiert das Pseudoplasmodium in einen *mexican hat* (**Abb. 5 B**), der sich senkrecht zur Oberfläche aufrichtet und zunehmend verschlankt. In dieser Phase werden die als Sporenzellen determinierten Amöben an die Spitze des sich aufrichtenden Pseudoplasmodiums verlagert, während die Stiel- und Basalzellen in einem zentralen Kanal Richtung Boden wandern (Raper, 1950; Schaap, 2011).

Der entstehende Fruchtkörper muss eine bestimmte Größe haben, um sich optimal durch die Schichten aus Erde und Blättern hindurchzuschieben. Die Größe der Aggregate wird bei $\sim 2 \times 10^4$ Zellen gehalten und durch ein sezerniertes Polypeptid, dem sogenannten *counting factor* (CF), reguliert (Brock und Gomer, 1999). CF ist ein Proteinkomplex von 450 kDa und besteht aus mindestens vier Komponenten, zu denen die Untereinheiten Countin, CF45-1 und CF50 und CF60 gehören. Countin besitzt N-terminal eine SAPLIP-Domäne mit dem charakteristischen Cysteinmuster. Nullmutanten für Countin, CF45-1 und CF50 zeichnen sich phänotypisch dadurch aus, dass der Strom an aggregierenden Zellen nicht stoppt (Brock *et al.*, 2002; Brock *et al.*, 2003; Brock *et al.*, 2006). Dies resultiert in übergroßen Fruchtkörpern, die sich nicht aufrichten oder umklappen. Eine Überexpression einer der Untereinheiten zeigt sich in proportional zu kleinen Fruchtkörpern (Gomer, 2001).

Am oberen Ende des Stiels, dem Sorophor, entsteht ein kugelförmiges Köpfchen aus Sporen, das Sorokarp. Der Begriff Spore ist für *Dictyostelium* irreführend, denn es handelt sich bei diesem Dauerstadium um in Cellulose enzystierte Amöben (Hemmes *et al.*, 1972; West und Erdos, 1990). Die Zysten werden durch Regenwasser oder Phoresie z. B. über Laufkäfer verbreitet. Unter günstigen Umweltbedingungen entwickelt sich dann aus einer Zyste eine neue Amöbe (Cotter und Raper, 1966).

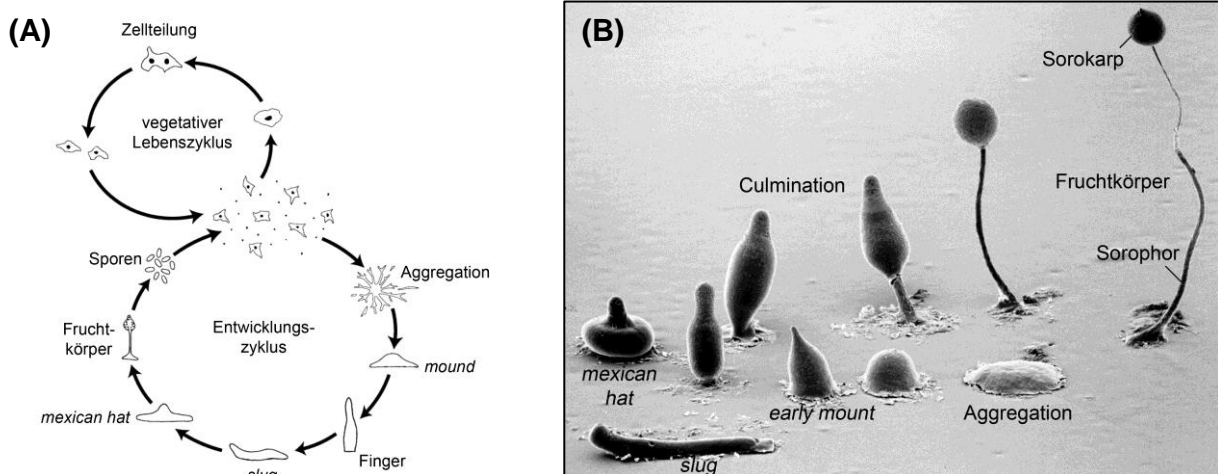


Abb. 5: Lebenszyklus von *Dictyostelium discoideum*. (A) Der Lebenszyklus teilt sich in einen vegetativen und einen Entwicklungszyklus. Im Entwicklungszyklus aggregieren ~ 20.000 Amöben und bilden über verschiedene Zwischenstadien einen Fruchtkörper (Copyright Brown/Strassmann). (B) Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme des Entwicklungszyklus von *D. discoideum* (Copyright, M.J. Grimson und R.L. Blanton, Biological Sciences Electron Microscopy Laboratory, Texas Tech University).

1.3.3 Autophagie

Sporen und Stielzellen sind nicht nur anhand ihrer Genexpressionsmuster sondern auch morphologisch zu unterscheiden. Stielzellen sind stark vakuolisiert und im Gegensatz zu Sporenzellen nicht in der Lage, nach der Überführung in ein Nährmedium zu überleben (Whittingham und Raper, 1960). Die Stielzellen erfahren also einen programmierten Zelltod, wobei der Prozess in *D. discoideum* nicht auf Apoptose zurückgeführt werden kann. Im Genom der Amöbe fehlen jegliche Gene für Caspasen und Vertreter der Bcl2-Familie, die beide die Apoptose in anderen Zellentypen prägen (Giusti *et al.*, 2009). Der programmierte Zelltod wird in *Dictyostelium* Autophagie genannt.

Autophagie tritt bei limitierenden Nahrungsressourcen, während der Entwicklung oder zur Beseitigung dysfunktionaler Zellbestandteile auf. Autophagie im Allgemeinen ist ein kataboler Prozess, bei dem Teile des Zytoplasmas und/oder Organellen in einem Autophagosom mit einer Doppelmembran aufgenommen werden. Das Autophagosom fusioniert mit Lysosomen und die enthaltenen Zellbestandteile werden abgebaut (Calvo-Garrido *et al.*, 2010). Autophagie wurde eingehend in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* charakterisiert und das Genom von *Dictyostelium* birgt zahlreiche zur Hefe orthologe Gene, deren Mutationen in Autophagie-defizienten Phänotypen resultieren. So entstehen in den *Dictyostelium*-Mutanten für die Gene *autophagy 1 (atg1)*, *atg5*, *atg6*, *atg8*, *atg7*, *atg9* (Otto *et al.*, 2003, Otto *et al.*, 2004) und *vacuolar membrane protein 1 (vmp1)* (Calvo-Garrido *et al.*, 2008) keine Autophagosomen und die Fruchtkörper sind häufig klein und unförmig. Die genauen zellulären Mechanismen während der Autophagie sind in *Dictyostelium* noch nicht abschließend geklärt, allerdings wurde ein Modell anhand der bisherigen Ergebnisse und den Erkenntnissen aus der Hefe und anderen Modellorganismen erstellt (**Abb. 6**) (Calvo-Garrido *et al.*, 2010).

Autophagie ist in drei Schritte unterteilt und wird über zwei unterschiedliche Wege gestartet (**Abb. 6**). Die initiale Rekrutierung der Doppelmembran geschieht über den Atg1-Komplex, der über den Nährstoffsensor *target of rapamycin* (TOR) reguliert wird. Alternativ wird die Bildung des Phagophors über die Lipid-Kinase *vacuolar protein sorting 34 (Vps34)* zusammen mit den Proteinen Beclin/Atg6 und Vps15 reguliert. Bei der Reifung zum vollständigen Autophagosom sind weitere Atg-Proteine beteiligt. In der nachfolgenden ersten Ubiquitin-ähnlichen Konjugation entsteht mittels der Enzyme Atg10 und Atg7 ein kovalent gebundener Komplex aus Atg12 und Atg5, der mit Atg16 interagiert. Dadurch wird die zweite Ubiquitin-ähnliche Konjugation erleichtert, bei der Atg8 nach Modifikationen über Atg4, Atg7 und Atg3 an das Phosphatidylethanolamin in der wachsenden Membran des Autophagosoms bindet.

Überdies sind die Proteine Atg2, Atg9, Atg18 und Vmp1 bei der Ausbildung des Autophagosoms involviert (Calvo-Garrido *et al.*, 2010). Im dritten und letzten Schritt fusioniert das fertige Autophagosom mit einem Lysosom und der Inhalt wird im Autolysosom degradiert (**Abb. 6**). Dabei könnten auch Membran-degradierende Proteine wie im Phagosom beteiligt sein.

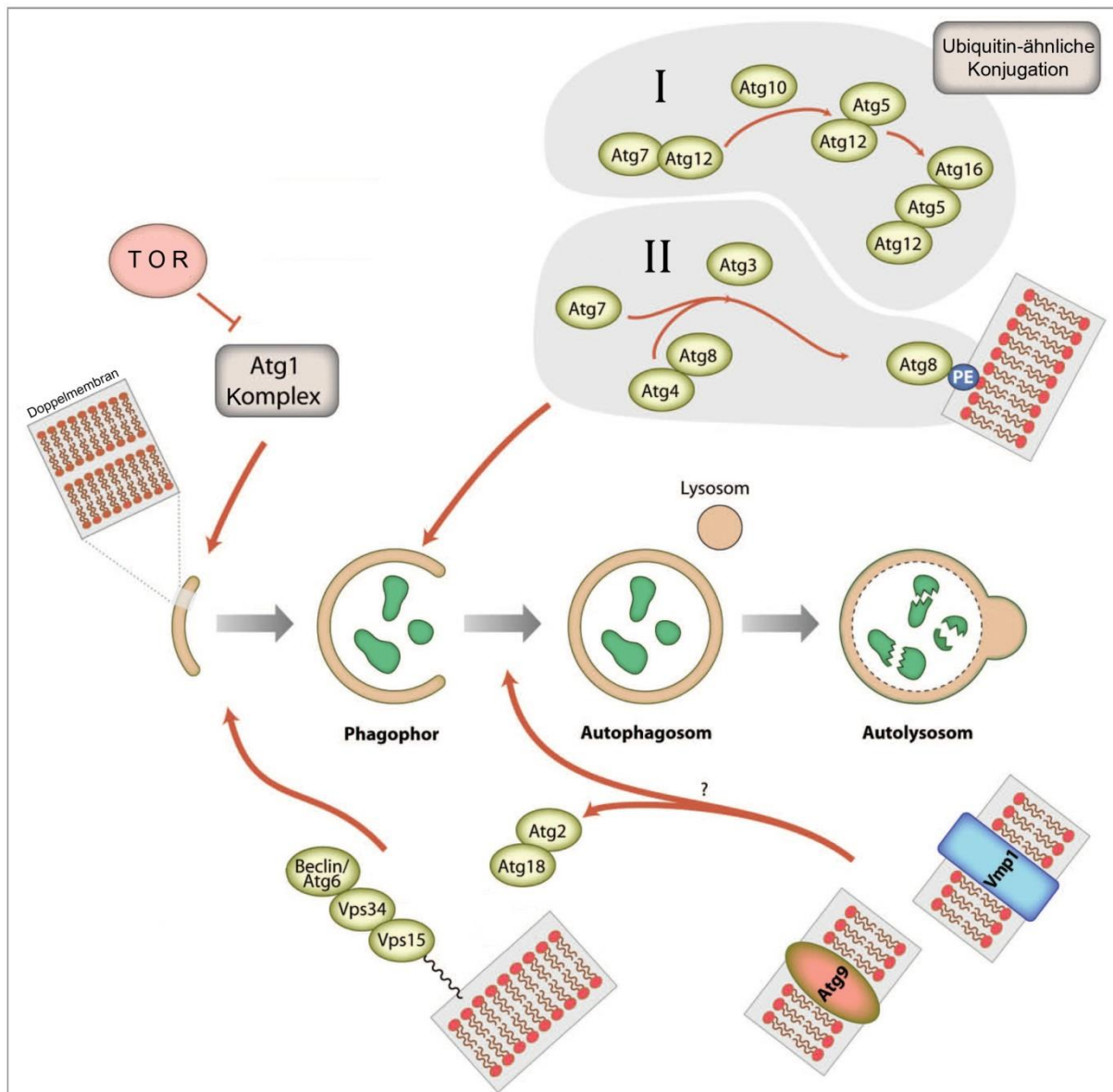


Abb. 6: Modell für die Autophagie in *Dictyostelium discoideum* hergeleitet von *Saccharomyces cerevisiae* Das doppelmembranöse Phagophor umschließt Teile des Zytoplasmas oder Organellen und bildet das Autophagosom. Dieses fusioniert mit Lysosomen zum Autolysosom, in welchem die Zellbestandteile abgebaut werden (Atg, *autophagy-related*; PE, Phosphatidylethanolamin; TOR, *target of rapamycin*; Vmp, *vacuole membrane protein*; Vps, *vacuolar protein sorting*) (Abbildung verändert nach Calvo-Garrido *et al.*, 2010)

1.3.4 *Dictyostelium discoideum* als Infektionsmodell

Dictyostelium ist ein wichtiger Modellorganismus für die Untersuchung von humanpathogenen Keimen. Dazu gehören *Legionella pneumophila* (Hägele *et al.*, 2000), *Mycobacterium avium* (Skriwan *et al.*, 2002), *M. marinum* (Hagedorn und Soldati, 2007), *M. tuberculosis* (Hagedorn *et al.*, 2009), *Pseudomonas aeruginosa* (Cosson *et al.*, 2002), *Vibrio cholera* (Pukatzki *et al.*, 2006), *Klebsiella pneumoniae* (Benghezal *et al.*, 2006), *Neisseria meningitidis* (Colucci *et al.*, 2008), *B. cenocepacia* (Aubert *et al.*, 2008), *Burkholderia pseudomallei* (Hasselbring *et al.*, 2011), *Streptococcus suis* (Bonifait *et al.*, 2011) und *Salmonella typhimurium* (Jia *et al.*, 2009).

Die intrazelluläre Replikation und interzelluläre Verbreitung von Mykobakterien wurden im *Dictyostelium*-Modell eingehend untersucht. Die Pathogene werden über einen Aktin-basierten Mechanismus, das Ejektosom, von Zelle zu Zelle übertragen ohne dem Milieu und damit Antibiotika oder dem Immunsystem ausgesetzt zu sein (Hagedorn *et al.*, 2009).

Die Infektion der Amöben mit *Legionella*-Bakterien zeigt Ähnlichkeiten mit der Infektion von humanen Makrophagen (Steinert, 2011). In beiden Zellen werden die Bakterien in Vakuolen, den sogenannten *Legionella-containing vacuoles* (LCVs), aufgenommen. Dabei interferieren die Bakterien nicht nur mit dem intrazellulären Vesikeltransport, um eine Ansäuerung der LCV zu verhindern (Tiaden *et al.*, 2007), sondern beeinflussen auch den Metabolismus der Wirtszelle (Farbrother *et al.*, 2006; Shevchuk *et al.*, 2009). Des Weiteren konnte im Amöbenmodell gezeigt werden, dass die Replikationsrate der Bakterien in Mutanten mit defekten Mitochondrien erhöht war (Francione *et al.*, 2009). *Dictyostelium* wird auch bei der Erforschung von *Pseudomonas*-Infektionen (Lima *et al.*, 2011) eingesetzt.

1.3.5 *Dictyostelium discoideum* als Modell für menschliche Krankheiten

Zahlreiche Gene, deren Mutation im Menschen mit Krankheiten wie Lissenzephalie (*liss1*) (Meyer *et al.*, 2011) oder lysosomale Speicherkrankheiten wie Niemann-Pick (*npcA*) oder Morbus Gaucher (*limp-2*) (Maniak, 2011) verknüpft sind, kommen als Orthologe in *Dictyostelium* vor und können dort gezielt ausgeschaltet werden. Die Analysen der daraus entstehenden Phänotypen tragen häufig zu einem besseren Verständnis der Krankheiten bei.

Auch neurodegenerative humane Krankheiten werden in der sozialen Amöbe untersucht. Mutationen oder Fehler bei dem *endosomal sorting complexes required for transport*

(ESCRT)-Proteinkomplex führen zur Aggregation fehlgefalteter Proteine in der Zelle und sind mit den Krankheiten Morbus Alzheimer, Morbus Parkinson und Chorea Huntington assoziiert. Mutation zweier ESCRT-Gene in *Dictyostelium* führen zu Defekten im Wachstum, der Endozytose und der Morphogenese (Ilievska *et al.*, 2013).

Des Weiteren werden in *Dictyostelium* Proteine, die sogenannten ROCO-Proteine, analysiert, die im Menschen mit Morbus Parkinson in Verbindung gebracht werden (Gilsbach *et al.*, 2012). Ebenso werden die Proteine Presenilin 1 (Morbus Alzheimer) und Huntingtin (Chorea Huntington) (Myre, 2012) in *Dictyostelium* untersucht.

Dictyostelium wird auch als Modell zur Erforschung der Wirksamkeit von Medikamenten verwendet. Die Zellen sind nicht von einer festen Zellwand umgeben, so dass die Zellmembran direkten Kontakt zum Milieu und den darin gelösten Substanzen hat. Des Weiteren ähnelt die Plasmamembran der Membran höherer Eukaryoten, mit der Ausnahme, dass Cholesterin durch Ergosterin ersetzt ist und Sialinsäuren in der Amöbe fehlen.

Verschiedene Medikamente wurden bei der Charakterisierung der Aufnahme und Replikation intrazellulärer *Legionella*-Bakterien in der Amöbenzellen verwendet (Fajardo *et al.*, 2004). Die Zugabe des Phosphoinositid-3-Kinasen (PI3K)-Inhibitors LY294002 führt zur Stimulation der intrazellulären Replikation von *Legionella*-Bakterien (Peracino *et al.*, 2010). Zusätzlich wurde die Funktion der Phospholipase C bei der Aufnahme von *Legionella*-Bakterien durch pharmakologische Hilfsmittel aufgeklärt (Peracino *et al.*, 2010). Auch der Wirkmechanismus bei der Therapie von Erkrankungen mit manisch-depressiven Symptomen wird in *Dictyostelium* erforscht (Ludtmann *et al.*, 2011).

1.3.6 Immunsystem

Der Beginn der angeborenen Immunität wird auf der basalen Ebene der Amoebozoa vermutet (Leippe, 1999; Chen *et al.*, 2007; Cosson und Soldati, 2008). In *Entamoeba histolytica* ist den *Amoebapores* eine Rolle bei dem Abtöten von Bakterien zugeschrieben worden (Leippe *et al.*, 1994; Bruhn *et al.*, 2003). Auch in *Dictyostelium* gibt es Untersuchungen bezüglich der angeborenen Immunität. In *slugs*, die sich auf Ethidiumbromid-haltigem Agar bewegten, wurde eine Zellpopulation, die sogenannten *sentinel cells* (*s-cells*), isoliert, in denen der toxische Fluoreszenzfarbstoff akkumulierte. Diese *s-cells* zirkulierten in dem *slug* und wurden in regelmäßigen Abständen aus dem Zellkonglomerat ausrangiert, wobei die Anzahl der *s-cells* stets bei ~1 % der *slug*-Zellen gehalten wurde (Chen *et al.*, 2007). Die *s-cells* sind zudem für die Entfernung von *Legionella pneumophila* verantwortlich.

In weiteren Experimenten wurden die *slugs* disaggregiert und auf einem Agar mit pathogenen *Legionella*-Bakterien ausgesetzt. Nach erneuter Aggregation enthielten die *slugs* einige Bakterien. Alternativ wurden mehrere Dutzend *Legionella*-Bakterien mit einer Nadel in den *slug* injiziert. In beiden Fällen phagozytierten die *s-cells* die Bakterien innerhalb des *slugs* und wurden zusammen mit den internalisierten Bakterien zurückgelassen, sodass nach 18 h keine *L. pneumophila*-Bakterien in dem *slug* mehr nachzuweisen waren (Chen *et al.*, 2007). Die Phagozytoserate von fluoreszierenden Latex-*Beads* und GFP-markierten Legionellen war bei *s-cells* im Vergleich zu normalen Zellen erhöht. Die *s-cells* übernehmen anscheinend ähnliche Aufgaben wie die Makrophagen höherer Organismen und könnten einen Teil eines einfachen angeborenen Immunsystems darstellen.

In *Real-time*-Analysen wurden die Mengen bestimmter Transkripte in *s-cells* mit den Mengen in normalen *slug*-Zellen verglichen. Die mRNA-Mengen von *Toll/interleukin-1 receptor (tirA)* und *s-cell enriched leucine rich repeat (slrA)* waren um das 8fache hochreguliert. Orthologe dieser Gene sind in anderen Organismen bei der Erkennung von Bakterien über *leucine rich repeats* (LRRs) involviert (Xu *et al.*, 2000; Akira *et al.*, 2006). Die Anzahl von *s-cells* lag bei der Null-Mutante für *tirA* auf Wildtyp-Niveau, allerdings war die Mutante suszeptibel gegenüber einem *Legionella*-Stamm, der für den Wildtyp avirulent war. Das Wachstum auf *Klebsiella aerogenes* war in der *tirA*-Mutante ebenfalls kompromittiert. Die Ergebnisse lassen darauf schließen, dass TirA für einen effizienten Umgang mit Bakterien benötigt wird und ein Bestandteil eines rudimentären angeborenen Immunsystems darstellt.

Auch in *Entamoeba histolytica* wurde ein Thioredoxin-Protein mit einer TIR-Domäne isoliert. Die entsprechende Null-Mutante zeigte eine verringerte Phagozytoserate von *E. coli*-Bakterien und Erythrozyten. Das Protein ist dementsprechend mit der Regulation der Phagozytose verknüpft (Mancilla-Herrera *et al.*, 2012).

1.3.7 Phagozytose

Dictyostelium-Amöben ernähren sich in ihrem natürlichen Habitat von Bakterien und Hefen, die mittels Chemotaxis aufgespürt, phagozytiert und im Phagolysosom degradiert werden (Cosson und Soldati, 2008). Als Phagozytose bezeichnet man die Endozytose von Partikeln. Das Partikel wird an der Zelloberfläche gebunden, von der Zelle bzw. der Zellmembran umflossen und das neu entstandene Vesikel ins Zellinnere aufgenommen. Das so entstandene Phagosom reift auf seinem Weg durch die Zelle. Verschiedene Vesikel verschmelzen mit dem Phagosom, andere werden wiederum abgeschnürt, bis

die Reste des internalisierten Partikels ins Milieu exozytiert werden (Clarke und Maddera, 2006).

Dictyostelium wird als professioneller Phagozyt bezeichnet und teilt sich diesen Titel mit wichtigen Komponenten des angeborenen Immunsystems von Vertebraten, z.B. Makrophagen, neutrophile Granulozyten und dendritische Zellen. *D. discoideum* ist als einzellige Amöbe in der Lage ~300 Bakterienzellen pro Stunde aufzunehmen und zu verdauen (Bozzaro *et al.*, 2008). In der Anwesenheit von Bakterien liegt die Generationszeit bei ungefähr 3 h. Das ergibt 900 Bakterien pro Generation oder 5 Bakterien pro Minute. Obwohl *Dictyostelium* neben Bakterien auch eine Reihe anderer Partikel phagozytiert (Hefezellen oder Latex-Beads) und sich die Zellen unterschiedlicher Stämme in Größe und Form erheblich unterscheiden, gibt es unter den Dictyosteliden nur eine bekannte Art die sich kannibalisch ernährt. Die Art *Dictyostelium caveatum* frisst Zellen anderer Dictyosteliden-Spezies, jedoch nicht ihre Artgenossen (Waddell und Duffy, 1986). Das ist ein Hinweis auf ein ausgeprägtes System zur Selbst-nicht-Selbst-Erkennung.

Dictyostelium discoideum ist ein bedeutender Modellorganismus für die Erforschung der Phagozytose. Es wurden fluoreszierende Bakterien, Latex-Beads und Hefezellen verwendet, um die dynamischen Prozesse der Phagozytose zu durchleuchten. Die Bindung des Partikels führt zu einer Rekrutierung von Aktinfilamenten an der Membran, was den Anschluss des phagozytotischen Bechers bewirkt (Clarke und Maddera, 2006). Dabei wird das *Zipper*-Modell favorisiert, bei dem die Phagozytose lokal durch progressiv bindende Oberflächenrezeptoren kontrolliert wird. Der Prozess kann in unterschiedlichen Phasen gestoppt werden. Nicht jedes gebundene Partikel wird aufgenommen, und selbst bei einer Rekrutierung von Aktin werden 50 % der Phagozytoseversuche wieder abgebrochen. Diese Experimente wurden mit Hefezellen durchgeführt (3 – 5 µm Durchmesser) (Maniak *et al.*, 1995). Die Auswertung ähnlicher Versuche mit Bakterien wird durch die flagellare Mobilität der Bakterien erschwert (Bozzaro *et al.*, 2008). Nach erfolgreicher Phagozytose wird das entstandene Kompartiment zügig angesäuert. Das Phagosom fusioniert mit azidischen Vesikeln, die die vakuolare H⁺-ATPase enthalten. Untersuchungen des endosomalen pHs mittels Fluoreszenzspektroskopie ergab eine Ansäuerung des Endosomenlumens auf pH 4,6 innerhalb der ersten 20 min (Aubry *et al.*, 1993). In weiterführenden Experimenten mit dem pH-sensitiven Fluoreszenzfarbstoff *Oregon green*, der besonders geeignet für niedrige pH-Werte ist, wurde gezeigt, dass der intraendosomale pH von *Dictyostelium* auf Werte unterhalb von pH 3,5 abgesenkt werden kann (Marchetti *et al.*, 2009). Dazu wurde der Farbstoff *Oregon green*, der mit

einem pKa-Wert von 4,7 bei sehr niedrigen pH-Werten nicht vollständig protoniert vorliegt, an Dextran gekoppelt und zusammen mit Alexa647-Dextran (pH-unsensibel) dem Nährmedium beigemischt. Die Amöbenzellen wurden für 20 min mit dem Nährmedium inkubiert und anschließend die Fluoreszenz der Zellen abzüglich der Autofluoreszenz des Mediums an verschiedenen Zeitpunkten mittels *fluorescence activated cell sorting* (FACS) analysiert. Anhand einer Kalibrationskurve wurden die gemessenen Daten in pH-Werte umgerechnet. Der phagosomale pH fällt innerhalb von 5 min auf pH 3,5, um wieder auf pH 6 anzusteigen (10 min – 60 min) (Marchetti *et al.*, 2009). *Pulse-Chase*-Experimente mit über die Phagozytose von Latex-*Beads* gereinigten Phagosomen bestätigen die frühe Anreicherung des Phagosoms mit vakuolärer H⁺-ATPase (Gotthardt *et al.*, 2006).

Es steht zur Diskussion, ob *Dictyostelium* in der Lage ist, zwischen Latex-*Beads* und Bakterien zu unterscheiden. Im Gegensatz zu Bakterien können Latex-*Beads* nicht abgebaut werden und verlangsamen die Reifung des Phagosoms (Bozzaro *et al.*, 2008). Zudem sind toxische Effekte der *Beads*, insbesondere in großer Anzahl, nicht auszuschließen.

In der Literatur wird immer wieder die Existenz eines Phagozytose-spezifischen Rezeptors in *D. discoideum* postuliert. In geschüttelter Flüssigkultur mit einem hundertfachen Überschuss an Bakterienzellen müssen als Voraussetzung für eine erfolgreiche Phagozytose enge und stabile Bindungen zwischen dem zu internalisierenden Partikel und der Zellmembran entstehen. Es sind Mutanten beschrieben, die zwar auf Agar zur Phagozytose befähigt sind, in Flüssigkultur allerdings eingehen (Cornillon *et al.*, 2000). Diese Mutanten könnten prinzipiell einen Defekt in einem Membran-Rezeptor, in einem Teil des Zytoskeletts oder in der Signalkaskade haben. Die Suche nach Phagozytose-spezifischen Rezeptoren ist in den letzten Jahren wenig erfolgreich gewesen. Für folgende Proteine wird eine Funktion bei der Perzeption von Partikeln diskutiert.

Talin: Talin A verknüpft in Metazoen die Adhäsionsmoleküle mit den Komponenten des Zytoskeletts (Critchley, 2005). In *Dictyostelium* kann die Mutante weder *E. coli* B/r in Suspension aufnehmen, noch sich auf Glas oder Plastik anheften. Nur *Salmonella minnesota* R595-Bakterien, denen alle Zuckerreste mit Ausnahme von zwei Resten am Lipid A-Kern der Lipopolysaccharide fehlen (Lüderitz *et al.*, 1966), sind adhäsiv genug, um phagozytiert zu werden. Die Makropinozytoserate ist normal. Es wird vermutet, dass Talin in einem Komplex mit *E. coli*-spezifischen Rezeptoren eine Rolle spielt (Niewöhner *et al.*, 1997).

Ein lektin-like-Rezeptor: Der Rezeptor bindet glykosylierte Partikel, z.B. den terminalen Glukoserest der Lipopolysaccharide von *E. coli* B/r (Vogel *et al.*, 1980). Die Mutante phagozytiert Bakterien normal, jedoch keine hydrophilen Latex-Beads.

Einen unspezifischen Rezeptor: Der Rezeptor vermittelt die Aufnahme von Partikeln über hydrophobe Interaktionen. Die genetisch uncharakterisierte Mutante phagozytiert hydrophobe Partikel (unbehandelte Latex-Beads) (Vogel *et al.*, 1980), aber keine hydrophilen Partikel wie Protein-beschichtete Latex-Beads, Bakterien oder Erythrozyten.

Phg1: Phg1 ist in dreifacher Ausführung (*phg1A/B/C*) im Genom von *Dictyostelium* vorhanden. Die Proteine nehmen voraussichtlich eine redundante Funktion in der Zelle ein. Das Protein Phg1 gehört zu der Familie der TM9-Proteine mit neun Transmembrandomänen und einer N-terminalen luminalen Domäne. In *Dictyostelium* und *Saccharomyces* (Froquet *et al.*, 2008) sind jeweils drei Vertreter, in der Fliege *Drosophila* (Bergeret *et al.*, 2008) und dem Menschen sind jeweils vier Vertreter der Proteine gefunden worden. In Hefen und der Fliege sind die TM9-Proteine bei der Adhäsion von Partikeln involviert, in menschlichen Melanom-Zellen führt die erhöhte Expression des Gens zur kannibalischen Phagozytose von gesunden Gewebszellen (Lozupone *et al.*, 2009).

Die Null-Mutante für *phg1* in *Dictyostelium* phagozytiert weder Latex-Beads noch *E. coli* B/r-Bakterien. Die Fähigkeit zur Aufnahme von *Klebsiella aerogenes* ist unbeeinflusst (Cornillon *et al.*, 2000), allerdings überleben die *Klebsiella*-Bakterien im Inneren der *Dictyostelium*-Zelle (Benghezal *et al.*, 2006). Phg1 reguliert zusammen mit SadA (Fey *et al.*, 2002) die Synthese und den Transport von SibA an die Zelloberfläche (Froquet *et al.*, 2012). Phg1 kontrolliert ebenfalls die Menge und die Stabilität von Kil2 (Le Coadic *et al.*, 2013).

Similar to Integrin Beta (SibA): SibA ist ein Typ I-Transmembranprotein auf der Zelloberfläche von *Dictyostelium*-Amöben. Die zytosolische, extrazelluläre und die Transmembran-Domäne enthalten Charakteristika von Säuger-Integrinen. Die genetische Inaktivierung von *sibA* führt zu einer beeinträchtigten Anhaftung an Substrate oder von Partikeln und einer verringerten Phagozytose von Latex-Beads. Die Phagozytoserate von *Klebsiella*-Bakterien liegt auf Wildtyp-Niveau (Cornillon *et al.*, 2006). Die zytosolische Domäne von SibA interagiert mit Talin.

Phg2: Phg2 ist eine Serin/Threonin Kinase, die an Proteine aus der Ras-Familie bindet. Die Null-Mutante für *phg2* zeigt eine veränderte Aktinpolymerisation und ist defizient für die Anhaftung an Glassubstrate und für die Aufnahme von Latex-Beads. Die Makropinozytose und die Adhäsion an hydrophobe Substrate ist ungestört (Gebbie *et al.*, 2004). Dem Protein wird eine Rolle in der Regulierung der Phagozytose zugesprochen, aber keine als Rezeptor.

Alle Mutanten zeigen ähnliche Defekte bei der Adhäsion und Phagozytose von Partikeln, jedoch gibt es bis dato keinen eindeutig beschriebenen Phagozytoserezeptor in *Dictyostelium discoideum*.

Auch intrazelluläre Faktoren sind an der effizienten Verwertung von Futter oder der Abwehr von Pathogenen beteiligt:

Kil1: Kil1 ist eine Sulfotransferase und überträgt Sulfatgruppen auf Proteine (Benghezal *et al.*, 2006). Das Gen *kil1* besitzt eine große Ähnlichkeit mit dem menschlichen *ndst1*, das eine membrangebundene Sulfotransferase kodiert, die bei der Übertragung von Sulfatgruppen auf Zuckerreste und bei der Synthese sulfatierter Proteine beteiligt ist (Hashimoto *et al.*, 1992). Des Weiteren bindet Phosphoadenosinphosphat (PAP), ein kompetitiver Hemmer von Sulfotransferasen (Klaassen und Boles, 1997), an KIL1. Auch in der *Knock-out*-Mutante für *kil1* sind keine Proteine mit einer Sulfatgruppe nachweisbar.

Die Mutante zeigt eine verringerte Phagozytose von *Klebsiella*-Bakterien, obgleich der Defekt weniger ausgeprägt ist als bei der *phg1*-Mutante. Die Phagozytose von Latex-Beads und *Bacillus subtilis* (Benghezal *et al.*, 2006) ist unverändert. Ebenso sind die Zusammensetzung der lysosomalen Enzyme und die Absenkung des pHs im Phagolysosom unverändert verglichen mit Wildtypzellen.

Kil2: Kil2 ist eine Typ V P-ATPase in der phagosomalen Membran und pumpt wahrscheinlich Kationen in das Phagosomenlumen (Lelong *et al.*, 2011). Die *kil2*-Mutante zeigt einen Wachstumsdefekt auf *Klebsiella*, das Wachstum auf *Bacillus subtilis* und *Pseudomonas aeruginosa* ist ebenso wie die Phagozytoserate von Latex-Beads und *Klebsiella*-Bakterien auf Wildtyp-Niveau. Die Mutante kann folglich *Klebsiella* aufnehmen, jedoch nicht degradieren, was sich in einer gesteigerten Ansammlung von lebenden Bakterien in der Zelle widerspiegelt (Lelong *et al.*, 2011). Des Weiteren war die phagosomale Protease-Aktivität erniedrigt. Beide Defekte konnten durch die Zugabe von

10 mM MgCl₂ kompensiert werden, wobei der Effekt dosisabhängig war. Die Zugabe weiterer Kationen (CaCl₂, MnCl₂, ZnCl₂, NiCl₂, NaCl, KCl oder FeSO₄) hatte keinen Effekt. Kil2 fungiert also entweder als Magnesiumtransporter oder ist indirekt an der Regulierung der intraphagosomalen Magnesiumkonzentration beteiligt.

Natural resistance associated macrophage protein (Nramp): Nramp1 spielt eine Rolle bei der angeborenen Immunität von Makrophagen gegen verschiedene Pathogene (Vidal *et al.*, 1993) und ist ein H⁺-abhängiger Transporter bivalenter Kationen. Mutationen in Nramp1 im Menschen sind verknüpft mit einer erhöhten Suszeptibilität gegenüber *Mycobacteria*- oder *Salmonella*-Infektionen und Autoimmunkrankheiten (Bellamy, 2003; Blackwell *et al.*, 2003; Jabado *et al.*, 2003; Malik *et al.*, 2005). In *Dictyostelium* sind zwei Nramp-Gene vorhanden, Nramp1 und Nramp2 (Peracino *et al.*, 2006). Die Nramp1-Mutante zeigt ebenfalls eine verstärkte Empfindlichkeit gegenüber Mykobakterien und Legionellen, wobei die Phagozytose der Bakterien unbeeinflusst ist (Peracino *et al.*, 2006). Die Überexpression des Gens schützt die Zelle vor der Infektion mit *Legionella pneumophila*, wahrscheinlich durch den Abtransport von Eisenionen aus dem Phagosomenlumen. Nramp1 ist ein 53 kDa Protein mit 11 Transmembrandomänen und wird in die Membran von Makropinosomen und Phagosomen eingebaut (Peracino *et al.*, 2006). Das Protein fungiert als Metall-Kationen-Transporter unter ATP-Verbrauch.

Offenbar sind die aufgezählten Proteine bei der intrazellulären Verwertung von *Klebsiella pneumoniae* beteiligt und interagieren miteinander (**Abb. 7**). Die Adhäsion der Bakterien und anderer Partikel wird über Phg1 und SibA reguliert. Phg1 ist auch an der Ansäuerung des Lysosoms und bei der Regulation der Zusammensetzung der lysosomalen Enzyme inklusive Lysozym beteiligt (**Abb. 7**). Zusätzlich ist die Übertragung von Sulfatgruppen an Proteine von Bedeutung, wie der *Knock-out* der Sulfotransferase Kil1 zeigt. Die Regulation der intraphagosomalen Magnesiumkonzentration ist außerdem für die Abtötung von *Klebsiella*-Bakterien wichtig (Le Coadic *et al.*, 2013).

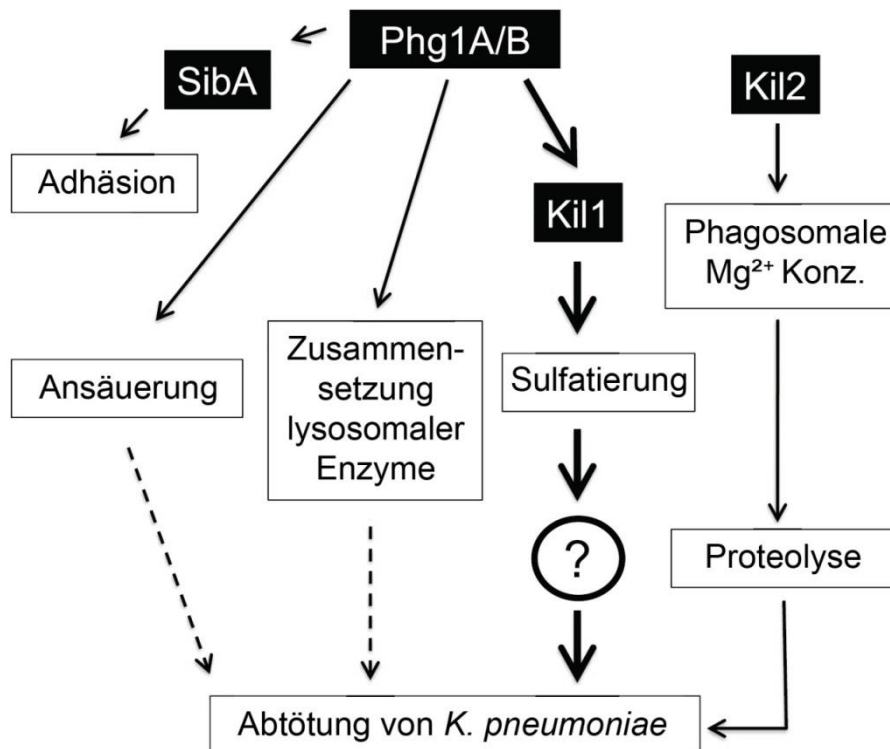


Abb. 7: Mechanismen der Abtötung von *Klebsiella pneumoniae*. Bei der intrazellulären Abtötung der Bakterien in *Dictyostelium* ist Phg1 bei der Regulierung der Adhäsion, des intraphagosomalen pHs und der Zusammensetzung der lysosomalen Enzyme beteiligt. Die Hauptaufgabe von Phg1 ist jedoch die Kontrolle der intrazellulären Menge von Kil1, welches für eine effiziente Verwertung der Bakterien benötigt wird. Zusätzlich reguliert die P-ATPase Kil2 die phagosomale Mg²⁺-Konzentration und die phagosomale Protease-Aktivität (Abb. entnommen aus Le Coadic *et al.*, 2013).

1.3.8 Antimikrobielle Proteine in der Amöbe

Obwohl *Dictyostelium* seit über 40 Jahren ein Modellorganismus für die Erforschung verschiedener zellulärer Prozesse ist, sind die Vorgänge innerhalb des Phagolysosoms weitestgehend unbekannt. Dabei ist der Erkenntnisgewinn bezüglich der Phagozytose und der Degradierung von Bakterien in *Dictyostelium* durch die Ähnlichkeit der Amöbe mit humanen Immunzellen wie Makrophagen und neutrophilen Granulozyten auch für das Verständnis der Abwehr von Mikroorganismen im Menschen wertvoll.

Die Analyse antimikrobieller Effektormoleküle begann schon 1967, als Wissenschaftler um die *Dictyostelium*-Koryphäe Prof. Dr. Günther Gerisch die Degradation von Lipopolysacchariden in Amöben beobachteten (Malchow *et al.*, 1967). Wiener und Ashworth (1970) isolierten eine β -Glukosidase und andere Hydrolasen aus xenisch und

axenisch kultivierten Dictyostelien, deren pH-Optimum nicht im Bereich pH 4 – 5, wie bei anderen Organsimen, sondern bei pH 3 lag. Braun *et al.* (1972) verknüpften die Präferenz der Enzyme für azidische pH-Werte mit einer Funktion bei der Verwertung von Futterbakterien und einer Lokalisation in den Lysosomen. Sie wiesen ebenfalls die Existenz einer „Lysozym-ähnlichen Muraminidase“ nach, welche den Murein-Lipoprotein-Komplex der bakteriellen Zellwand spaltete.

Mit Hilfe von modifizierten *Escherichia coli*-Bakterien wurde für *Dictyostelium* die Kinetik von Partikelbindung, Aufnahme und Degradation erforscht (Maselli *et al.*, 2002). Das Gen für das rot fluoreszierende Protein DsRed wurde in die Bakterienzellen eingebracht und die Expression induziert. Die gewaschenen, lebenden Zellen wurden zusammen mit *Dictyostelium*-Zellen inkubiert und die Phagozytose und Degradation der Bakterien über die Zeit festgestellt. Die Verwendung von lebenden Bakterien mit einer natürlichen, unveränderten Zelloberfläche erlaubte ein experimentelles Modell, das nicht auf fluoreszierende *Beads* oder tote, mit fluoreszierenden Farbstoffen inkubierte Bakterien zurückgreifen musste (Cornillon *et al.*, 2000). Der Grad der Degradation wurde über die abnehmende Fluoreszenz des DsRed-Proteins bestimmt. Das Signal des DsRed-Proteins wurde nicht durch niedrige pH-Werte abgeschwächt. Für die Analyse der Degradation wurden Ax2-*Dictyostelium*-Zellen 30 min mit *E. coli*-DsRed inkubiert und mit 5 mM Natriumazid gewaschen, um die freien und oberflächengebundenen Bakterien zu entfernen. Das Fluoreszenzsignal von DsRed nahm mit einer Halbwertszeit von 45 min graduell ab (Maselli *et al.*, 2002).

Ferner sind die Serin-Proteasen Cathepsin G und Elastase an dem intrazellulären Abtöten von *Staphylococcus aureus* und *Candida albicans* beteiligt (Reeves *et al.*, 2002; Korkmaz *et al.*, 2008). Null-Mutanten für die NADPH-Oxidase zeigten keine Unterschiede in der Fähigkeit, Bakterien abzutöten, was auf eine untergeordnete Rolle von Sauerstoff-Radikalen in *Dictyostelium* schließen lässt (Benghezal *et al.*, 2006).

Der bis dato einzige beschriebene antimikrobielle Faktor in *Dictyostelium* ist das Amöbenlysozym AlyA (Müller *et al.*, 2005). Lysozym ist generell ein bakterizides Enzym, das die β -1,4-glykosidische Bindung zwischen N-Acetylglukosamin und der N-Acetylmuraminsäure in der bakteriellen Zellwand hydrolysiert. Lysozym kommt in Bakterien, Bakteriophagen, Pilzen, Pflanzen und Tieren vor (Jollès und Jollès, 1984) und wurde erstmals 1922 im Nasensekret von Alexander Fleming entdeckt. Im Genom von *D. discoideum* sind potenzielle Lysozyme aus vier verschiedenen Klassen kodiert. Es

gibt drei Vertreter des c-Typs (*Chicken type*), zwei Phagen-Typ-Lysozyme (*T4-phage type*), drei Lysozyme des *E. histolytica*-Typs (*Eh-type*) und vier Vertreter der *D. discoideum*-eigenen Lysozym-Klasse Aly (Amöben-Lysozyme). Letztere wurden identifiziert, indem aus Zell-Extrakten aktivitätstragende Proteine (AlyA) isoliert wurden (Müller *et al.*, 2005), die lyophilisierte Zellwände von *Micrococcus luteus* lysierten. Das 12,7 kDa große Enzym zeigte keine antimikrobielle Aktivität gegen die gram-negativen Bakterien *Escherichia coli* und gegen die gram-positiven Bakterien *Staphylococcus aureus*, allerdings wurde das Wachstum der gram-positiven Bakterien *Bacillus subtilis* und *Bacillus megaterium* inhibiert. Die Aktivität von Aly A war bei niedrigen pH-Werten (pH 4,5 – 6) und geringer Ionenstärke am höchsten (Müller *et al.*, 2005).

Die Extrakte einer Null-Mutante für *alyA* wurden mit Wildtyp-Extrakten verglichen und zeigten eine 40 % geringere Lysozym-Aktivität, was durch eine bis zu zweifach effizientere Phagozytose und einen bis zu 1,8fach größeren Plaquedurchmesser, verglichen mit dem Wildstamm, kompensiert wurde. Wie die meisten Lysozyme hat AlyA eine vielfach höhere Aktivität gegen gram-positive Bakterien. Anhand der Fusionskonstrukte von AlyA und gelb fluoreszierendem Protein wurde das Lysozym in speziellen lysosomalen Vesikeln lokalisiert, in denen ansonsten keine lysosomalen Enzyme nachzuweisen waren. Die Vesikel verschmolzen im weiteren Verlauf mit Phagosomen, was zu einem rapiden Rückgang der Fluoreszenzsignals des markierten Lysozyms führte. Da das Enzym ein saures pH-Optimum besitzt, liegt es nahe, dass das Lysozym im Phagolysosom der Zelle lokalisiert ist und dort für die Degradation von Bakterien mitverantwortlich ist.

Zusammen mit AlyL und DDB_G0276439, denen einen Lysozym-ähnliche Aktivität vorausgesagt ist, existieren im Genom des *Dictyostelium*-Stamms Ax2 14 potenzielle Lysozym-Gene. Einige Komponenten des *Counting factor*-Komplexes weisen eine hohe strukturelle Ähnlichkeit mit *Eh-type*-Lysozymen auf, allerdings konnte bisher nur schwache Peptidoglykan-spaltende Aktivität für die Proteine nachgewiesen werden.

Im Genom von *D. discoideum* sind 17 Gene enthalten, die potenzielle AMPs mit einer SAPLIP-Domäne kodieren (**Abb. 8**). Die entsprechenden Proteine zeigen eine deutliche Sequenzähnlichkeit zu *Amoebapores* (Michaelis, 2006) und wurden *Amoebapore like peptides* (Apls) getauft. Neben dem charakteristischen Cysteinmuster enthält die vorausgesagte Primärstruktur der meisten Apls ein oder mehrere potenzielle N-Glykosylierungsstellen (Asn-Xaa-Ser/Thr). Die Gene kodieren Vorläuferproteine aus denen maximal 33 einzelne Apls (**Tab. 1**) mit jeweils einer SAPLIP-Domäne geschnitten werden könnten (**Abb. 8**).

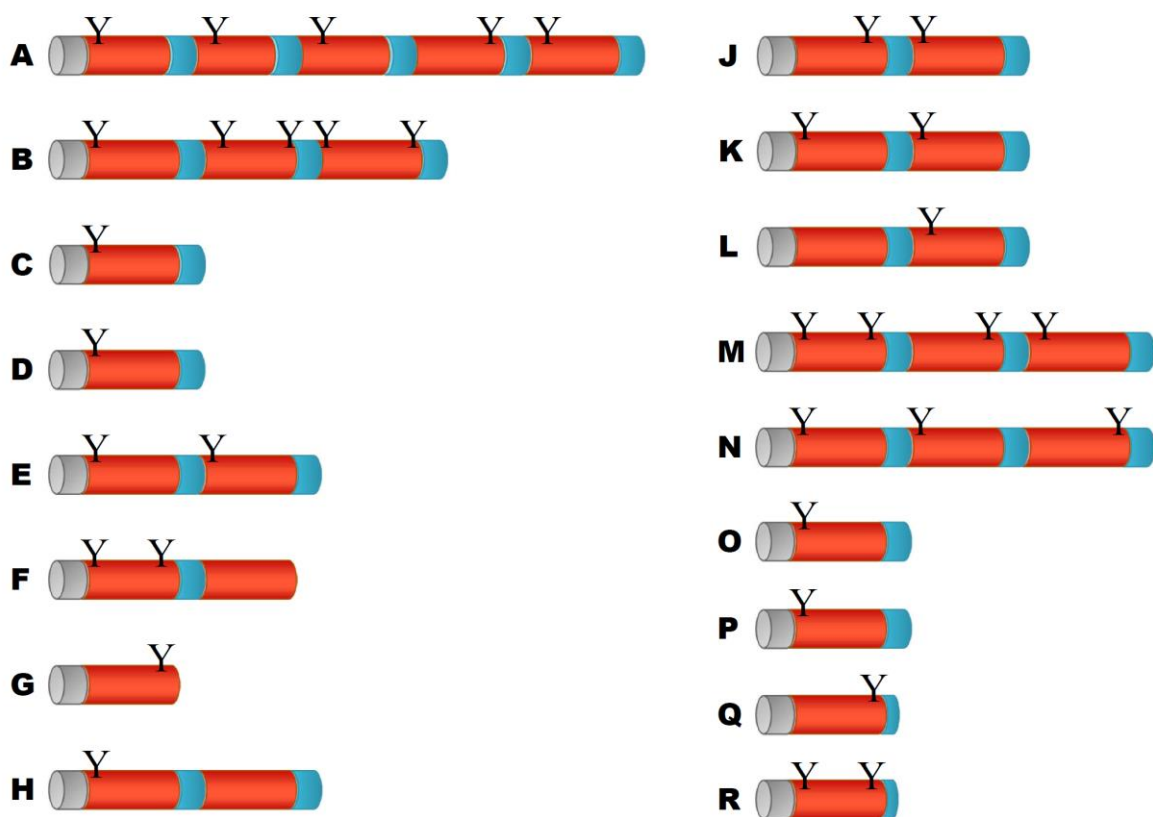


Abb. 8: Molekulare Organisation der Apls. Das Signalpeptid ist grau dargestellt, die SAPLIP-Domänen sind rot und die Serin-reichen Regionen zwischen den Domänen blau dargestellt. Potenzielle N-Glykosylierungsstellen (Asn-Xaa-Ser/Thr) sind mit Y dargestellt (verändert nach einer Abbildung von Prof. Dr. Matthias Leippe und Dr. Rosa Herbst, unpubliziert).

Vorausgesetzt der N-Terminus der geschnittenen murenen Apls beginnt wie bei den *Amoebapores* vier Aminosäurereste vor dem ersten Cysteinrest, haben alle 33 SAPLIPs eine molekulare Masse zwischen 8 und 9 kDa. Ebenso liegt der isoelektrische Punkt (mit Ausnahme von Apl F2 und Apl L1) zwischen pI 3,6 und pI 4,8 und damit im anionischen Bereich (**Tab. 1**). Durch die ähnliche Proteinstruktur und die relativ nahe Verwandtschaft zwischen den beiden amöboiden Organismen *E. histolytica* und *D. discoideum* lässt sich eine antimikrobielle Funktion der SAPLIP-Proteine vermuten.

Tab. 1: Alle 33 Apls mit molekularer Masse und isoelektrischem Punkt

Name	pI	MW in kDa	Name	pI	MW in kDa
Apl A1	4,09	8,98	Apl J1	3,91	8,92
Apl A2	4,23	9,01	Apl J2	4,39	8,67
Apl A3	4,27	8,67	Apl K1	4,84	8,94
Apl A4	4,32	8,70	Apl K2	4,19	9,03
Apl A5	4,39	8,46	Apl L1	5,53	8,41
Apl B1	4,13	8,69	Apl L2	4,25	9,11
Apl B2	4,59	8,37	Apl M1	3,87	9,12
Apl B3	4,1	8,21	Apl M2	4,2	9,07
Apl C	3,63	8,53	Apl M3	4,4	8,52
Apl D	4,62	8,78	Apl N1	4,11	8,74
Apl E1	4,73	9,26	Apl N2	4,54	8,81
Apl E2	4,56	9,91	Apl N3	4,04	9,06
Apl F1	3,94	8,56	Apl O	4,16	8,91
Apl F2	8,28	8,70	Apl P	4,61	8,61
Apl G	4,76	8,82	Apl Q	4,69	8,87
Apl H1	4,13	8,77	Apl R	4,16	8,34
Apl H2	4,04	8,26			

Im Zuge der Doktorarbeit von M. Sc. Ranjani Dhakshinamoorthy wurden einzelne *Knock-out*-Mutanten für verschiedene Apl-kodierende Gene hergestellt (Dhakshinamoorthy, 2012). Die Mutante für *aplD* wurde eingehend phänotypisch charakterisiert. Dabei wurde im *Growth Assay* (Froquet *et al.*, 2009) die Fähigkeit dieser Mutante untersucht, auf verschiedenen Bakterien und unter unterschiedlichen Bedingungen zu wachsen. Hierzu

wurden die Bakterien *Klebsiella pneumoniae aerogenes*, *Escherichia coli* B/r und DH5 α , *Micrococcus luteus* und *Bacillus subtilis* verwendet. Zusätzlich wurden verschiedene klinische Isolate von *Klebsiella pneumoniae* (KP21, waaC, K⁻ und 52145) und *Pseudomonas aeruginosa* (PT531, DP5 und DP28) von M. Sc. Ranjani Dhakshinamoorthy auf Wachstumsdefekte untersucht. Die Mutante *aplD*⁻ wuchs im Vergleich zum Wildtyp signifikant schlechter auf den Bakterien KP21 und K⁻.

Ebenfalls wurde die Transkription von *aplD* mittels quantitativer *Real-time-PCR* untersucht. Dazu wurden axenisch gewachsene *Dictyostelium*-Zellen auf Phosphatagar ausplattiert und der Entwicklungszyklus gestartet. Alle vier Stunden wurden Proben entnommen und die Transkription von *aplD* untersucht. Die qRT-PCR-Analyse ergab eine konstitutive Transkription von *aplD* im Amöben-Stadium mit einer 12 – 15fachen Hochregulierung gegenüber den Kontrollgenen *gpdA* und *mlA* nach 16 h Entwicklungszeit (Dhakshinamoorthy, 2012).

Die Analyse der Transkription mittels RNA-Sequenzierung zeigte ebenfalls einen starken Anstieg der Transkripte von *aplD* während des Entwicklungszyklus mit einem Maximum nach 16 h (Rot et al., 2009) (**Abb. 9**). Für die Charakterisierung des antimikrobiellen Arsenalts war daher Apl D von besonderem Interesse.

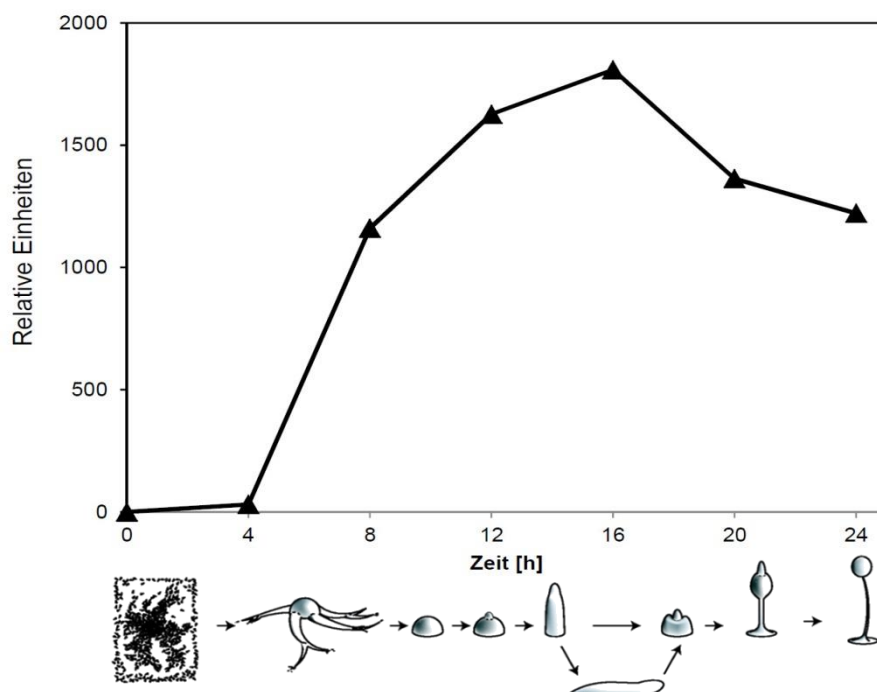


Abb. 9: Transkription von *aplD* während des Entwicklungszyklus. *aplD* wird in allen Stadien exprimiert. Die maximale Transkription von *aplD* ist nach 16 h (*slug*-Phase) erreicht. Die Daten der RNA-Sequenzierungen wurden von der Datenbank *Dictybase.org* entnommen (Rot et al., 2009).

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, ausgewählte antimikrobielle Effektormoleküle in der sozialen Amöbe *Dictyostelium discoideum* zu identifizieren und zu charakterisieren. Dabei sollten insbesondere die Klasse der potenziell antimikrobiellen SAPLIP-Proteine und der Lysozymen untersucht werden, da ihnen eine bedeutende Rolle bei der Verwertung von Futterbakterien und der Abwehr von potenziellen Pathogenen zugesprochen wird. Als Forschungsorganismus wurde *D. discoideum* gewählt, da sich die Amöbe von Bakterien ernährt und als Modellorganismus zur Erforschung der Phagozytose etabliert ist.

In einem ersten Arbeitsschritt sollte analysiert werden, welche Apls und Lysozyme als Proteine in der Zelle vorliegen. Dabei sollten auch mögliche Prozessierungsvarianten der Proteine untersucht werden. Nachfolgend sollten die abundantesten Vertreter aus einem natürlichen Zellextrakt gereinigt und auf ihre antimikrobielle Funktion analysiert werden. Sollte eine effiziente Reinigung der Proteine nicht möglich sein, sollten einige ausgewählte Apls rekombinant hergestellt werden.

Zur Funktionsanalyse sollten die Proteine auf ihr Wirkspektrum und ihren Wirkmechanismus untersucht werden. Dazu sollten die Proteine auf bakteriostatische und bakterizide Wirkung sowie auf zytotoxische Aktivität getestet werden. Zudem sollte die membranpermeabilisierende Aktivität gegenüber verschiedenen gram-positiven und gram-negativen Bakterien sowie gegenüber eukaryotischen Zellen analysiert werden. Gegebenenfalls sollte der Wirkmechanismus durch die Analyse der porenbildenden Aktivität aufgeklärt werden.

Die Arbeit sollte neue Erkenntnisse über das antimikrobielle Arsenal von *D. discoideum* bringen und damit für ein besseres Verständnis der intrazellulären Vorgänge bei der Abtötung aufgenommener Mikroorganismen sorgen.

2 Material

2.1 Allgemeine Geräte

4700 Proteomics Analyzer Workstation	Applied Biosystems
Äkta Purifier P-900	Amersham Bioscience
Gefriertrocknungsanlage Alpha 2-4 LSC	Martin Christ
Gelsystem 45-1010-i (Mini-Gele)	PeqLab
Homogenisator Sonoplus	Bandelin Electronic
Inkubator Innova 40R	NewBrunswick
Inkubator TH30	Edmund Bühler
Lichtmikroskop Orthoplan	Leitz
Lichtmikroskop IMT-2	Olympus
Thermocycler MasterCycler epGradient	Eppendorf AG
Mikrotiterplattenscanner LEDetect 96	Deelux Labortechnik
Mikrotiterplattenscanner Fluoroskan II	Labsystems
NanoDrop ND-1000 UV/Vis-Spectrophotometer	Thermo Fisher Scientific
Photometer Ultraspec 1100 pro	Amersham Bioscience
Sonotrode MS73 + UW2200	Bandelin Electronic
Spannungsgeber E835/E861	Consort
Spotpicker 2D-Gel 99-90-101	Labtech International
Sterilbank KR-130 BW	Kojaer
Thermomixer comfort	Eppendorf AG
Ultraschallbad Sonorex Super RK106	Bandelin Electronic
Vakuumsystem UVS400A	Thermo Electron
Varioklav	Thermo Scientific
Wasseraufbereitung TKA Genpure	TKA
Zählkammer Neubauer <i>improved</i>	Karl Hecht Glaswaren

2.2 Zentrifugen

Kühlzentrifuge 5417R	Eppendorf AG
Kühlzentrifuge Rotanta 460R	Hettich Zentrifugen
Tischzentrifuge Minispin	Eppendorf AG
Ultrazentrifuge L7-65	Beckmann

Vakuum-Zentrifuge SpeedVAC Savant SPD131DDA

Thermo Electron

2.3 Chemikalien

α -Cyano-4-Hydroxy-Zimtsäure (ACHC)	Sigma-Aldrich, München
Acrylamid-Lösungen 2K	Applichem, Darmstadt
Ammoniumbicarbonat (ABC)	Sigma-Aldrich, München
Ammoniumpersulfat (APS)	Applichem, Darmstadt
Ampicillin Natriumsalz	Applichem, Darmstadt
Agarose für Molekularbiologie	Fluka, Sigma-Aldrich, München
Bacto™Tryptone	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Bacto™Proteose Peptone No. 3	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Bacto™Yeast Extract (technical grade)	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Bakteriologisches Pepton LP0037	Oxoid, Hampshire, UK
Bovines Serumalbumin (A2153)	Sigma-Aldrich, München
Bromphenolblau (BPB)	Merck, Darmstadt
Coomassie Brilliant Blue G 250	Applichem, Darmstadt
Formaldehyd (37 %)	Sigma-Aldrich, München
Iodacetamid (IAA)	Calbiochem, Schwalbach
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Sigma-Aldrich, München
Maltose Monohydrat	Sigma-Aldrich, München
Natriumacetat	Applichem, Darmstadt
Natriumcarbonat	Sigma-Aldrich, München
Natriumchlorid	MP Biomedicals, Solon (USA)
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Applichem, Darmstadt
TEMED	Applichem, Darmstadt
Trifluoressigsäure (TFA, min. 99 %)	Applichem, Darmstadt

Soweit nicht anders angegeben, wurden alle weiteren Chemikalien von der Firma Roth (Karlsruhe) bezogen.

2.4 Verbrauchsmaterialien

<i>Micro BCA Protein Assay Kits</i>	Pierce, USA
Mikrotiterplatten, 96-Loch, Rundboden	Sarstedt, Nürnberg
Mikrotiterplatten, 96-Loch, Flachboden	Sarstedt, Nürnberg
Parafilm	Brand, Wertheim
Petrischalen, 92 mm x 16 mm	Sarstedt, Nürnberg
Proteinmarker <i>SeeBlue® Plus2</i>	Invitrogen, Karlsruhe
Protease Inhibitor Cocktail Tablets, EDTA-free	Roche, Mannheim
Reaktionsgefäße, 2 ml und 1,5 ml	Sarstedt, Nürnberg
Reaktionsröhrchen, 15 ml und 50 ml	Sarstedt, Nürnberg
Schüttelkolben mit Schikane 300 ml, 1000 ml, 2000 ml	Schott, Mainz
Serologische Pipetten	Sarstedt, Nürnberg
TALON® Metal Affinity Resin	Takara Clontech, USA
Valinomycin (≥90 % HPLC, V0627)	Sigma-Aldrich, München

2.5 Peptide

Zur Analyse der antimikrobiellen und porenbildenden Aktivität wurden folgende Peptide über Sigma-Aldrich bezogen:

Melittin	GIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQ-NH ₂	M2272 (≥85 % HPLC)
Cecropin P1	SWLSKTAKKLENSAKKRISGIAIAIQGGPR	C7927 (≥95 % HPLC)
Alamethicin	Acetyl-BPBABAQBVBGLBPVBBQQO, (B: α-Aminobuttersäure, O: Phenylalaninol)	A4665 (≥98 % HPLC)

Melittin und Cecropin P1 wurden zu 100 µM in 0,01 % TFA angesetzt. Alamethicin wurde zu 50 µM in reinem Ethanol gelöst.

2.6 Wasser

Es wurde gefiltertes Wasser aus einer TKA Genpure Wasseraufbereitungsanlage bezogen. Das Wasser wird im Folgenden als H₂O bezeichnet.

2.7 Puffer und Medien

LB-Medium

- 10 g NaCl
- 10 g Trypton (Pepton aus Casein)
- 5 g Hefeextrakt
- ad 1 L mit H₂O

LB-Agar-Platten

- 15 g Bacto-Agar
- ad 1 L LB-Medium
- autoklavieren

Pro Platte wurde unter sterilen Bedingungen 10 – 15 ml der noch heißen LB-Agar-Lösung in eine sterile Petrischale gegossen.

Maltose HL-5
(Cornillon *et al.*, 1994)

- 14,3 g Bacto-Pepton LP0037
- 7,15 g Hefeextrakt
- 18,0 g Maltose Monohydrat
- 0,641 g Na₂HPO₄·2H₂O
- 0,490 g KH₂PO₄
- pH liegt zwischen pH 6,6 und 6,7
- ad 1 L mit H₂O
- autoklavieren

Soerensen-Phosphatpuffer (pH 6,0)
(Malchow *et al.*, 1972)

- 2 mM Na₂PO₄
- 15 mM KH₂PO₄
- autoklavieren

Soerensen-Phosphatagar-Platten (pH 6,0)

- 15 g Bacto-Agar
- ad 1L mit Sörensens-Phosphatpuffer
- autoklavieren

Pro Platte wurde unter sterilen Bedingungen 10 – 15 ml der noch heißen Soerensen-Phosphatpuffer-Agar-Lösung in eine sterile Petrischale gegossen.

TBS (pH 7,0) 150 mM NaCl
 20 mM Tris-HCl
 → autoklavieren

8 M Urea TBS (pH 7,0) 8M Urea in 20 mM Tris-HCl

2.8 Verwendete Zelllinien und Bakterien

Für die Zellkultur und die Experimente mit *Dictyostelium discoideum* wurde der Stamm Ax2 214 (DBS0235534) verwendet.

Für die Analyse der fungiziden Aktivität wurde der Stamm *Saccharomyces cerevisiae* S 150 (mit freundlicher Unterstützung von Prof. Dr. Frank Kempken, Botanisches Institut, CAU Kiel) benutzt.

Folgende Bakterienstämme wurden für die Analyse der antimikrobiellen Aktivität verwendet.

Tab. 2: Bakterien-Stämme

Name	Stamm	Ursprung
<i>Escherichia coli</i>	B/r (DBS0348878)	Dicty Stock Center
	K12 D31 YpCr	Laborsammlung (Boman <i>et al.</i> , 1974)
	B834	Laborsammlung (Wood, 1966)
	BL21	Laborsammlung (Shuman, 1989)
	BL21trxB	Laborsammlung (Derman <i>et al.</i> , 1993)
	C43	Laborsammlung (Miroux und Walker, 1996)
<i>Bacillus megaterium</i>	ATCC 14581 DSM #32	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>aerogenes</i> (DBS0349838)	ehemals <i>Aerobacter aerogenes</i> , jetzt <i>Klebsiella pneumoniae</i> von Prof. Dr. Pierre Cosson
	KP21	Klinisches Isolat mit vergrößerter Polysaccharid-Kapsel von Prof. Dr. Pierre Cosson
	K ⁻	Mutante des Stamms KP52145 mit verringerter Polysaccharid-Kapsel von Prof. Dr. Pierre Cosson

3 Methoden

3.1 Kultur von *Dictyostelium discoideum* im Labor

3.1.1 Zellkultur

Zum Start einer Amöbenkultur wurden 10 ml raumtemperiertes HL-5-Medium mit 100 - 200 µl einer Ax2-Sporensuspension vermischt und für 48 h bei 22 °C ohne Schütteln in einer 50 ml Petrischale inkubiert, bis sich auf dem Boden der Petrischale eine konfluente Schicht adhärenter Zellen gebildet hatte. Die *Dictyostelium*-Zellen wurden unter sterilen Bedingungen mittels Auf- und Abpipettieren mit einer 10 ml serologischen Pipette abgelöst, in einen 300 ml Schikanekolben mit 100 ml Medium überführt und bei 22 °C und 150 U/min kultiviert.

Die Kulturen wurden in der exponentiellen Wachstumsphase geerntet. Dies entsprach einer maximalen Dichte von 5×10^6 Zellen/ml. Die stationäre Wachstumsphase war bei 3×10^7 Zellen erreicht. Die Generationszeit betrug 8 – 10 h.

Die Zellsuspension wurde unter der Sterilbank in 50 ml Reaktionsröhrchen abgefüllt und bei 310 g für 5 min bei 22 °C zentrifugiert. Danach wurden die Zellen zweimal mit Sörensen-Phosphat-Puffer gewaschen.

3.1.2 Zellzahlbestimmung

Die Zellzahlbestimmung erfolgte in einer Neubauer *improved*-Zählkammer, die über zwei Zählfelder verfügt. Bei der Neubauer *improved* Zählkammer beträgt die Fläche des kleinsten Quadrates 0,0025 mm². Vor dem Beladen wurde die Zählkammer angehaucht und das Deckgläschen vorsichtig aufgelegt, sodass sich zwischen dem Glas und den seitlichen Trägerstegen newtonsche Ringe bildeten. Damit ist die Höhe der Zählkammer auf 0,1 mm begrenzt und es ergibt sich ein Volumen von 0,00025 µl über jedem Kleinstquadrat. Jedes Zählfeld wurde mehrmals mit 10 µl der Zellsuspension beladen und unter dem Lichtmikroskop ausgezählt. Um die Zellzahl pro ml zu erhalten, wurde die durchschnittliche Anzahl an Zellen in 0,00025 mm³ errechnet und mit dem Faktor 4×10^6 multipliziert.

3.1.3 Produktion von Sporen

Die in Sörensen-Phosphat-Puffer gewaschenen Zellen wurden auf eine Dichte von $1 - 2 \times 10^8$ Zellen/ml eingestellt und 500 μ l dieser Suspension pro Phosphat-Agar-Platte durch eine rotierende Bewegung ausplattiert. Die Platten wurden bei Raumtemperatur für 48 h bis zur Bildung von Fruchtkörpern inkubiert. Unter sterilen Bedingungen wurden 5 ml Sörensen-Phosphat-Puffer auf eine Platte mit entwickelten *D. discoideum*-Zellen pipettiert und durch vorsichtiges Schütteln und Klopfen die Sporenköpfchen abgelöst. Die Sporensuspension wurde abgenommen und auf eine weitere Sporenplatte übergesetzt. So wurden mehrere Platten geerntet. Die Sporenkonzentration wurde auf 1×10^7 Sporen/ml eingestellt und als 1 ml Aliquots in Kryoröhrchen abgefüllt. Diese wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

3.1.4 Proteinextraktion aus *Dictyostelium*-Zellen

Puffer und Lösungen:

Extraktionspuffer	3 M Urea
	3 % (w/v) SDS
	1 % (w/v) Chaps
	50 mM Tris-HCl pH 6,8

Die Zellen wurden in der exponentiellen Phase geerntet, bei 310 g für 5 min sedimentiert und zweimal mit Sörensen-Phosphat-Puffer gewaschen. Der Überstand wurde verworfen, das Sediment in dem fünffachen Volumen an Extraktionspuffer aufgenommen und die Zellen auf dem Schüttler aufgeschlossen. Die Probe wurde in der vorgekühlten Tischzentrifuge bei 20.000 g und 4 °C für 30 min zentrifugiert. Der klare Überstand wurde abgenommen und bei -20 °C gelagert.

3.1.5 Proteinextraktion mit Essigsäure

Puffer und Lösungen:

Extraktionsmedium	10 % (v/v) Essigsäure
-------------------	-----------------------

Die Zellen wurden in der exponentiellen Phase geerntet und zweimal mit Sörensen-Phosphat-Puffer gewaschen. Die Zellen wurden zentrifugiert, in fünffachem Volumen 10 % Essigsäure aufgenommen und über Nacht rotierend bei 4 °C aufgeschlossen. Die

Proben wurden für 1 h bei 4 °C und 150.000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und bei -20 °C gelagert.

3.2 Methoden für die rekombinante Expression

3.2.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Bei der PCR wird ein Teilbereich der DNA durch Denaturierung, die wiederholte Anlagerung von spezifischen Oligonukleotiden und die Elongation der DNA durch eine thermostabile DNA-Polymerase amplifiziert (Mullis und Faloona, 1987; Saiki *et al.*, 1992). Die Reaktion findet in Thermocyclern statt. Für einen typischen PCR-Ansatz wurde folgendes Pipettierschema verwendet:

Tab. 3: Pipettierschema für einen typischen PCR-Ansatz

Taq Polymerasepuffer (10x) (ohne MgCl ₂)	1 µl
MgCl ₂ 25 mM	0,8 µl
dNTP-Mix 10 mM	1 µl
Oligonukleotid (vorwärts) 10 µM	1 µl
Oligonukleotid (rückwärts) 10 µM	1 µl
Taq DNA-Polymerase	0,1 µl
DNA-Matrize*	x µl
H ₂ O	ad 10 µl

* Das Volumen der DNA-Matrize richtet sich nach der DNA-Konzentration.

Das PCR-Programm wurde mit einer initialen DNA-Denaturierung bei 95 °C für 3 min gestartet und das Genfragment mit 30 bis 40 Zyklen amplifiziert. Ein Zyklus bestand aus einer Denaturierung bei 94 °C für 30 s, einer Anlagerung der Oligonukleotide bei der jeweils spezifischen Temperatur für 30 s und der Elongation der Oligonukleotide durch die Taq-Polymerase bei 72 °C für 1 min. Die Länge des Elongationsschrittes wurde anhand des zu amplifizierenden Fragments berechnet, wobei als Richtwert 1000 Basen pro Minute herangezogen wurden. Das Programm wurde mit einem finalen Elongationsschritt bei 72 °C für 5 min beendet und die Proben auf 4 °C bis zur Entnahme gekühlt.

3.2.2 Agarose-Gelelektrophorese

Puffer:

TAE-Puffer (50x)	50 mM EDTA, 2 M Tris-Acetat pH 8,0
DNA-Ladepuffer (6x)	50 % (v/v) Glycerin, 10 mM EDTA, 0,1 % (w/v) SDS, 0,025 % (w/v) Bromphenolblau, 0,025 % (w/v) Xylencyanol, pH 8,0

DNA und PCR-Produkte wurden in 1,5 %igen Agarosegelen aufgetrennt. Dazu wurde 7,5 g Agarose in 500 ml 1x TAE-Puffer aufgekocht und bei 60 °C im Heizbad flüssig gehalten. Für ein kleines Agarosegel wurden 40 ml der Agaroselösung mit 3,5 µl Ethidiumbromid (1 %ige Lösung in H₂O) vermischt, in die Gelgießkammer mit einem Kamm für die Taschen gegossen und das Gel für 30 min bei RT stehen gelassen. Das ausgehärtete Gel wurde in der Gellaufkammer mit 1x TAE überschichtet. Die DNA-Proben wurden mit 6x DNA-Ladepuffer versetzt und in die Taschen des Agarosegels pipettiert. Der Gellauf erfolgte bei 30 V für 15 min, dann bei 80 V bis die gewünschte Auftrennung der Proben erreicht wurde. Die Gelbanden wurden in einem Transilluminator mit UV-Licht sichtbar gemacht und fotografiert.

3.2.3 DNA-Reinigung aus Agarosegelen

Die Isolierung einzelner DNA-Banden aus dem Agarosegel erfolgte auf dem UV-Tisch durch Ausschneiden der Bande mit einem Skalpell. Zur Reinigung der DNA aus dem Gelstück wurde das *NucleoSpin Gel and PCR Clean-Up Kit* von Machery und Nagel verwendet. Es wurde nach Herstellerangaben gearbeitet mit der Änderung, dass statt 50 µl Elutionvolumen zweimal mit denselben 20 µl Elutionspuffer eluiert wurde, um eine höhere DNA-Konzentration in der Probe zu erhalten.

3.2.4 Konzentrationsbestimmung der Nukleinsäuren

Die Konzentration der DNA wurde am NanoDrop ND-1000 bestimmt. Dazu wurden 2,5 µl der Probe geladen und die Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen, wobei der Absorptionskoeffizient von $A_{260} = 1$ einer Konzentration von 50 µg/ml DNA entsprach. Die Reinheit der Probe wurde durch das Verhältnis von A_{260}/A_{280} untersucht. Werte zwischen 1,8 und 2,0 wurden als rein definiert.

3.2.5 Herstellung der DNA-Konstrukte für die rekombinante Expression

Die Konstrukte für die rekombinante Expression der Proteine rApl B2, rApl B3, rApl C und rApl D wurden bei der Firma *GeneArt* als synthetische Gene bestellt. Bei den Genen ist die Präferenz des produzierenden Bakteriums *Escherichia coli* für bestimmte Triplets bei dem Kodongebrauch berücksichtigt. Die Konstrukte wurden bei *GeneArt* in den Vektor pMA-T mit einer Ampicillinresistenz kloniert. 5 µg gefriergetrockneter Plasmid-DNA wurden in 50 µl H₂O gelöst.

3.2.6 Restriktionsenzymatische Spaltung von DNA

Um das entsprechende Gen aus dem Vektor auszuschneiden, wurde der amplifizierte Vektor mit dem Apl-Gen (2 µg Plasmid-DNA) mit spezifischen Restriktionsendonukleasen (Fermentas) geschnitten. Der Spaltungsansatz wurde auf dem Agarosegel aufgetrennt, die *apl*-Bande aus dem Gel herausgetrennt und gereinigt. Der Zielvektor wurde mit den gleichen Restriktionsendonukleasen linearisiert und aus dem Agarosegel gereinigt.

3.2.7 Ligation

In einem Ligationsansatz wurden geschnittenes Fragment und geschnittener Vektor in einem molaren Verhältnis von 10:1 vermischt und der Ansatz nach Herstellerangaben mit Ligasepuffer, Ligase (Fermentas) und H₂O vervollständigt. Die komplementären Überhänge wurden durch das Enzym Ligase zusammengefügt.

3.2.8 Transformation in chemisch kompetente *Escherichia coli*-Zellen

Puffer und Medien

SOC-Medium	10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl ₂ , 2 % (w/v) Bacto-Trypton, 0,5 % (w/v) Hefe-Extrakt, ad 1 L H ₂ O → autoklavieren, steril 20 mM Glukose hinzufügen
TfB I	10 mM CaCl ₂ , 50 mM MnCl ₂ , 100 KCl, 15 % (v/v) Glycerin 30 mM Kaliumacetat pH 5,8
TfB II	75 mM CaCl ₂ , 10 mM KCl, 15 % (v/v) Glycerin, 10 mM MOPS pH 7,0 mit NaOH einstellen

Für die Vermehrung der *apl*-Konstrukte wurde der Vektor pMA-T mit dem *apl*-Gen in chemisch kompetente *E. coli* DH5 α -Bakterien eingebracht. Dazu wurden 50 – 100 μ l der Bakteriensuspension auf Eis mit 1 μ l (entspricht 100 ng Plasmid-DNA) für 30 min inkubiert. Dieser Ansatz wurde für 30 s im Heizblock bei 42 °C erwärmt, direkt mit 800 μ l eiskaltem SOC-Medium vermischt und bei 37 °C und 800 rpm für 40 min inkubiert. Es wurden jeweils 100 μ l und 700 μ l unter der Sterilbank auf vorgewärmten LB-Agar-Platten mit 100 μ g/ml Ampicillin ausplattiert und für 16 h bei 37 °C inkubiert. Bakterien, die das Plasmid mit der Ampicillinresistenz aufgenommen hatten, wurden am nächsten Tag von der Agar-Platte gesammelt.

Zur Herstellung der chemisch kompetenten Bakterien wurden 500 ml LB-Medium mit dem entsprechenden Bakterienstamm angeimpft und bei 37 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 kultiviert. Die Kultur wurde für 15 min auf Eis abgekühlt, bei 2000 g und 4 °C für 5 min zentrifugiert, das Sediment aus 50 ml Kultur in 15 ml kaltem TfB I-Puffer aufgenommen und für 15 min auf Eis stengelassen. Die Suspension wurde wieder zentrifugiert, in 4 ml eiskaltem TfB II-Puffer resuspendiert, aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

3.2.9 Überprüfung der Transformation

Die auf der LB-Agar-Platte mit Ampicillin gewachsenen Bakterien wurden mit einer *colony check PCR* überprüft. Dazu wurde der in 3.2.1 beschriebene PCR-Ansatz ohne die DNA-Matrize angesetzt. Stattdessen wurde mit einer sterilen 10 μ l-Pipettenspitze eine Probe der Bakterienkolonie entnommen und dem PCR-Ansatz beigemischt. Durch den initialen Denaturierungsschritt wurde die DNA in den Bakterien freigesetzt und fungierte als DNA-Matrize in der PCR. Mit genspezifischen Oligonukleotiden wurde das in die Bakterien eingebrachte Gen nachgewiesen.

3.2.10 Plasmid-Amplifikation und Reinigung

Der Plasmidvektor wurde in chemisch kompetente Bakterien eingebracht und die Bakterien über Nacht auf LB-Platten mit Ampicillin inkubiert. Eine einzelne Kolonie wurde unter der Sterilbank in 10 ml LB-Medium mit 100 μ g/ml Ampicillin transferiert und bei 37 °C kultiviert. Ein Aliquot der gesättigten Bakterienkultur wurde sedimentiert und mit dem *NucleoSpin Plasmid QuickPure Kit* von Machery und Nagel die Plasmid-DNA extrahiert. Es wurde nach Herstellerangaben gearbeitet mit der Änderung, dass statt

50 µl Elutionvolumen zweimal mit demselben 20 µl Elutionspuffer eluiert wurde, um eine höhere DNA-Konzentration in der Probe zu erhalten.

3.2.11 Sequenzierung von Nukleotiden

Die DNA-Sequenzierungen wurden bei GATC Biotech durchgeführt. Mittels PCR und zwei T7-Oligonukleotiden wurde die gesamte Gensequenz inklusive der multiplen Klonierungsstelle (MCS), der Affinitätsreste und dem Zielprotein sequenziert.

3.2.12 Rekombinante Synthese von Apls in *Escherichia coli*-Bakterien

Folgende *E. coli*-Stämme wurden für die rekombinante Expression der Apls eingesetzt.

<i>E. coli</i> B834	B834 ist der Elternstamm von BL21, verfügt über weniger Proteasen, ist Methionin auxotroph und ist daher leicht für eine ³⁵ S-Methionin-Markierung von Proteinen einsetzbar.
<i>E. coli</i> BL21	BL21 verfügt nicht über die <i>lon</i> und <i>ompT</i> Proteasen.
<i>E. coli</i> BL21trxB	BL21trxB erleichtert die zytoplasmatische Ausbildung von Disulfidbrücken und erhöht dadurch den Anteil an löslichen und korrekt gefalteten Proteinen. Die Bakterien besitzen eine Resistenz gegen Kanamycin.
<i>E. coli</i> C43	C43 erleichtert die Expression von toxischen Proteinen, da eine Mutation in dem <i>lacUV5</i> Promoter (Wagner <i>et al.</i> , 2008) den mit der Synthese toxischer Proteine assoziierten Zelltod verringert.

Zusätzlich wurden folgende Vektoren für die Herstellung der Apls ausgewählt.

pET-28a(+)	Der pET-28a(+)-Vektor hat 5369 bp. Das entstehende Fusionsprotein hat N-terminal einen His-Rest aus 6 Histidinresten, eine Thrombinschnittstelle (LVPRGS), einen T7-Rest und einen weiteren His-Rest hinter der MCS.
pET-32a(+)	Der pET-32a(+)-Vektor hat 5900 bp. Das entstehende Fusionsprotein hat N-terminal einen Thioredoxin-Rest bestehend aus 109 Aminosäureresten, einen His-Rest, eine Thrombinschnittstelle (LVPRGS), einen S-Rest und einen weiteren His-Rest hinter der MCS. Das Fusionsprotein ist dementsprechend

um einiges größer verglichen mit dem Fusionsprotein aus dem pET-28a(+)-Vektor.

Empirisch wurde die optimale Kombination aus Vektor und Expressionsbakterien für die rekombinante Expression der Apls analysiert. Exemplarisch wird die rekombinante Expression von Apl D (im Folgenden als rApl D bezeichnet) erläutert.

3.2.13 Rekombinante Expression von rApl D

Der amplifizierte Plasmid pMA-T mit dem *rApl D*-Gen und der Vektor pET-32a(+) wurden mit den Restriktionsendonukleasen KpnI und XhoI geschnitten, das Fragment und der linearisierte Vektor aus dem Gel gereinigt und die komplementären Enden ligiert.

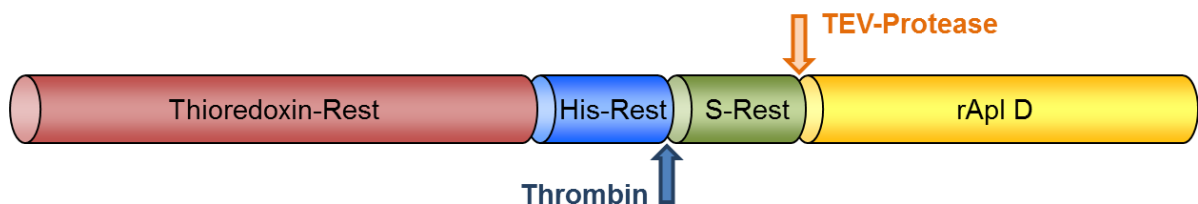


Abb. 10: Fusionsprotein rApl D. Schematische und nicht-proportionale Darstellung des Fusionsproteins von rApl D, das in den Vektor pET-32a(+) ligiert wurde. Die Pfeile kennzeichnen die Proteaseschnittstellen von Thrombin und der TEV-Protease.

Der ligierte Vektor wurde in chemisch kompetente *E. coli* C43-Bakterien transformiert und der Erfolg der Transformation überprüft. Von der Agarplatte des Transformationsansatzes wurde eine einzelne Kolonie entnommen, in 3 ml LB mit 100 µg/ml Ampicillin überführt und für 16 h bei 37 °C und 200 rpm inkubiert. Die gesättigte Bakterienkultur wurde 1:500 mit frischem LB-amp⁺ verdünnt und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,3 – 0,4 inkubiert. Zusätzlich wurde aus einem Aliquot der Vorkultur das Plasmid isoliert und sequenziert, um sicher zu stellen, dass keine Mutationen in der Gensequenz eingebaut wurden. Nach Erreichen der entsprechenden optischen Dichte wurde die Expression des Fusionsproteins mit 0,5 mM Isopropyl-β-D-1-thiogalactopyranosid (IPTG) induziert und für 6 h bei 37 °C und 200 rpm inkubiert. Die Bakterien wurden bei 6000 g sedimentiert und zweimal mit TBS pH 7,0 gewaschen. Nach der letzten Sedimentation wurde der Überstand komplett abgenommen und das Bakteriensediment bei -20 °C eingefroren.

3.2.14 Proteinextraktion aus Bakterien

Das eingefrorene Bakteriensediment wurde gewogen und in dem fünffachem Volumen eiskaltem TBS pH 7,0 rückgelöst. Alle folgenden Schritte erfolgten gekühlt. Die Suspension wurde zehn Mal 15 s sonifiziert. Die Sonotrode wurde auf 0,7 s Arbeitsschritt und 0,3 s Pause eingestellt. Nach jedem 15 s-Zyklus wurde mindestens 30 s gewartet, um eine Erwärmung der Suspension zu vermeiden. Die sonifizierte Probe wurde in der vorgekühlten Ultrazentrifuge bei 150.000 g und 4 °C für eine Stunde zentrifugiert. Der klare Überstand, der die löslichen Proteine enthielt, wurde abgenommen und bei -20 °C gelagert. Das Sediment wurde mit dem fünffachem Volumen TBS mit 8 M Urea überschichtet, rückgelöst und ein zweites Mal wie oben erläutert aufgeschlossen. Der Überstand nach der zweiten Zentrifugation enthielt die unlöslichen Proteine aus den Einschlusskörperchen.

3.2.15 Immobilisierte Metallionenaffinitätschromatographie (IMAC)

Der Überstand mit den löslichen Proteinen wurde über eine IMAC gegeben. Die Seitengruppen der sechs Histidinreste des His-Restes im Fusionsprotein interagierten mit den in der Agarose eingebetteten zweifach geladenen Kobaltionen, sodass das Fusionsprotein von den restlichen Bakterienproteinen getrennt wurde. Es wurden 3 ml *TALON® Metal Affinity Resin* in einen leere 15 ml Polypropylen-Säule gefüllt und 3 x mit TBS gewaschen, indem jeweils 10 ml TBS per Schwerkraft das Säulenmaterial durchlaufen hatten. Anschließend wurden 5 ml der löslichen Proteine auf die Säule geladen und der Durchfluss verworfen. Ungebundene Proteine wurden mit 3 x 10 ml TBS ausgewaschen. Gebundene Proteine wurden mit einem Stufengradienten mit 10 mM, 50 mM, 100 mM und 500 mM Imidazol vom Säulenmaterial gelöst. Der Hauptbestandteil des rApl D war in den Fraktionen mit 100 mM und 500 mM Imidazol enthalten, wobei neben dem Fusionsprotein auch bakterielle Proteine vorhanden waren. Ebenso wurde mit den unlöslichen Proteinen verfahren.

Nach der proteolytischen Spaltung des Fusionsproteins mit der TEV-Protease wurde der Ansatz ein weiteres Mal über die IMAC gegeben. Das geschnittene Protein rApl D wurde im Durchfluss aufgefangen. Der abgespaltene Teil des Fusionsproteins mit Thioredoxin-Rest und Histidin-Rest sowie die in der Probe enthaltene TEV-Protease mit dem HQ-Rest hatten an das Säulenmaterial gebunden und wurden nach einem Waschschrift mit 500 mM Imidazol wieder von der Säule eluiert.

3.2.16 Pufferaustausch

Nach der Vorreinigung des Fusionsproteins über die IMAC wurde der Puffer über Dialyse ausgetauscht, um das enthaltene Imidazol zu entfernen. Dazu wurde die Lösung mit dem Fusionsprotein in *Spectra/Por Dialysis Membrane*-Dialyseschläuche mit einem MWCO von 3.500 Da pipettiert und mindestens gegen das 200fache Probenvolumen dialysiert.

Bei kleineren Proteinen zwischen 5 und 10 kDa wurden *Slide-A-Lyzer G2* Dialysekassetten von Pierce mit einem MWCO von 2.000 Da verwendet.

3.2.17 Proteinreinigung über *fast protein liquid chromatography* (FPLC)

Alle Chromatographieschritte wurden auf einem Äkta Purifier P-900 mit dem Fraktionssammler Frac-950 durchgeführt. Alle Lösungen wurden in H₂O angesetzt, mindestens 15 min entgast und mit einem 0,2 µM-Filter gefiltert. Die aufgetragenen Proben wurden generell bei 20.000 g zentrifugiert und der Überstand ebenfalls gefiltert. Die Extinktion der Proben wurde bei 214 nm für die Peptidbindung und bei 280 nm für aromatische Aminosäuren gemessen und in mAU (*milli-absorbance units*) angezeigt. Die Steuerung des Geräts und die Auswertung der Chromatogramme erfolgten mit der Software Unicorn 5.0 von Amersham Bioscience.

3.2.17.1 Anionenaustausch-Chromatographie

Puffer A	20 mM Tris-HCl pH 7,0
Puffer B	1 M NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 7,0

Um das Fusionsprotein von den bakteriellen Proteinkontaminationen zu trennen, wurde die Proteinlösung gegen 20 mM Tris-HCl pH 7,0 (Puffer A) dialysiert und auf eine GE Healthcare Resource Q 1 ml-Anionenaustausch-Säule gegeben. Bei dem für Anionenaustausch-Chromatographie niedrigen pH von 7,0 sollten nur die stark anionischen Proteine mit einem pI von < 5,0 an die Säule binden und so den Anteil des Fusionsproteins im Proteingemisch erhöhen. Gebundene Proteine wurden mit einem linearen Gradienten von 0 – 100 % Puffer B von der Säule gelöst und in einzelnen Fraktionen aufgefangen.

Für die Reinigung des geschnittenen Proteins rApl D wurde eine GE Healthcare Mini Q 4.6/50 PE – Anionenaustausch-Säule mit den gleichen Puffern verwendet.

3.2.17.2 Umkehrphasen-Chromatographie

Eluent A	0,08 % TFA
Eluent B	0,08 % TFA, 84 % ACN

Bei der Umkehrphasen-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (RP-HPLC) werden die hydrophoben Eigenschaften der Proteine ausgenutzt. Die Proben werden auf 0,08 % TFA gebracht und über die Säule gegeben. Die enthaltenen Proteine binden an das unpolare Säulenmaterial (stationäre Phase) werden anschließend mit einem Gradienten des polaren Lösungsmittels (mobile Phase) wieder von der Säule gelöst und in Fraktionen aufgefangen. Die entsprechenden Fraktionen wurden mittels Gefriertrocknung eingengt und in Puffer gelöst. Für die Reinigung von rApl B2 wurde die Vydac Protein C4-Säule verwendet. Die Chromatographie wurde bei Raumtemperatur mit einer Flussgeschwindigkeit von 0,5 ml/min durchgeführt. Das Injektionsvolumen betrug 500 – 1000 µl.

3.2.18 Proteolytische Spaltung

Das gereinigte Fusionsprotein wurde gegen 0,5 mM EDTA in 50 mM HEPES pH 7,0 dialysiert. Für die proteolytische Spaltung wurde die Proteinlösung auf 1 mM DTT gebracht und pro 10 µg Fusionsprotein 1 U Promega ProTEV Plus-Protease eingesetzt und über Nacht bei 30 °C inkubiert. Der Erfolg der proteolytischen Spaltung wurde im Gel kontrolliert.

3.3 Allgemeine molekularbiologische Methoden

3.3.1 Phagolysosomenpräparation

Puffer und Lösungen:

SSB	Soerensen-Phosphatpuffer (pH 8,0) mit 120 mM Sorbitol
HESES	20 mM 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES)-KOH, pH 7,2, 0,25 M Saccharose
Homogenisierungspuffer	HESES mit 2x <i>Complete</i> EDTA-freiem Protease-Inhibitor Cocktail

Membranpuffer	20 mM HEPES-KOH, pH 7,2, 20 mM KCl, 2,5 mM MgCl ₂ , 1 mM DTT, 20 mM NaCl.
Lysispuffer	7 M Urea, 2 M Thiourea, 2 % CHAPS, 2 % ASB-C8Ø, 1 % DTT

Die Phagolysosomenpräparation erfolgte nach dem Protokoll von Dieckmann *et al.* (2008). Es wurden Ax2 Zellen in axenischem HL-5 Medium in geschüttelter Flüssigkultur bis zu einer Zelldichte von 5×10^6 Zellen/ml bei 22 °C kultiviert. 1,25 ml der Latexbead-Lösung (Sigma LB-8, 0,8 µM Durchmesser, 10 %ige Lösung) wurden bei 10.000 g für 5 min zentrifugiert und zweimal in SSB gewaschen, um restliches Natriumazid und Detergenzien aus der Stock-Lösung zu entfernen. Das Bead-Sediment wurde final in 1 ml SSB aufgenommen und auf Eis gestellt. In 12,5 ml Zentrifugenröhrchen (Beckmann, 14 x 89 mm) wurde ein Saccharose-Stufengradient mit 2 ml 60 %iger, 3 ml 35 %iger, 3 ml 25 %iger und 2 ml 10 %iger Saccharoselösung in 20 mM HEPES-KOH pH 7,2 vorgelegt.

Die Zellkultur wurde quantifiziert, $2,5 \times 10^9$ Zellen geerntet, in 50 ml SSB resuspendiert und einmal gewaschen. Das Zellsediment wurde in 8 ml eiskaltem SSB aufgenommen und die Bead-Lösung dazugegeben. Diese wurde vor der Zugabe für 5 min im Ultraschallbad sonifiziert. Die Zell-Bead-Lösung wurde für 15 min auf Eis inkubiert um die Anheftung der Latex-Beads an die Zellen zu maximieren. Die Phagozytose wurde durch Überführen der Lösung in 100 ml vorgewärmtes HL-5 Medium gestartet und bei 22 °C und 120 rpm für 15 min inkubiert. Zum Stoppen der Phagozytose wurde die Lösung in 330 ml eiskaltes SSB gegeben und für 8 min bei 2000 g zentrifugiert. Das Zellsediment wurde in 50 ml HESES aufgenommen, für 5 min bei 500 g zentrifugiert, das Sediment in 100 ml vorgewärmtes HL-5 Medium überführt und die Suspension für 45 min bei 22 °C und 120 rpm inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit HESES gewaschen, um nicht-internalisierte *Beads* zu entfernen. Die Zellen wurden bei 500 g für 5 min sedimentiert und in 2 ml Homogenisierungspuffer aufgenommen.

Die Zellsuspension wurde in einem EMBL-Kugel-Homogenisator aufgeschlossen, um intakte Organellen zu erhalten. Es wurde ein Homogenisator mit einem 8 mm Tunnel und einer 7,99 mm Kugel verwendet, sodass ein Zwischenraum von 5 µm um die Kugel entstand. Das Zellsediment wurde in acht Passagen durch den EMBL-Homogenisator mit 1 ml Spritzen langsam aufgeschlossen. Die Zell-Lösung wurde auf 10 mM ATP, 10 mM MgCl₂ und 45 % Saccharose gebracht, wobei das ATP jeweils frische angesetzt wurde. Die Lösung wurde für 15 min vorsichtig auf dem Rolltisch durchmischt und

zwischen die 60 %ige und die 35 %ige Saccharoselösung in den Stufengradienten mit einer Kanüle geladen. Die Proben wurden für 150 min bei 28.000 g im Ausschwingrotor SW41Ti zentrifugiert. Die Fraktion mit den intakten Phagolysosomen befand sich nach der Zentrifugation zwischen der 10 %igen und der 25 %igen Saccharoselösung und wurde mit einer Kanüle und einer Spritze abgenommen. Die Phagolysosomen in 37 ml Membranpuffer aufgenommen und ein weiteres Mal für 50 min bei 28.000 g zentrifugiert. Das Zellsediment wurde mit ASB-8Ø Lysispuffer aufgeschlossen und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

3.3.2 Licht-induzierte Herstellung von *slugs*

Entwicklungspuffer (DB) 5 mM Na₂HPO₄, 5 mM KH₂PO₄, 1 mM CaCl₂, 2 mM MgCl₂
pH auf 6,5 einstellen

In der mittleren Phase des Entwicklungszyklus von *D. discoideum* wird aus dem Fingerstadium entweder ein beginnender Fruchtkörper oder ein phototaktischer und mobiler *slug*. Dieser sucht mit einer Geschwindigkeit von bis zu 1 mm in der Stunde (Dormann *et al.*, 1996) einen geeigneten Platz für die Kulmination und orientiert sich dabei an schwachen Lichtquellen (positive Phototaxis). Für die Herstellung von *slugs* wurden Ax2-Zellen in Flüssigmedium kultiviert und dreimal mit DB gewaschen um restliches Medium zu entfernen. Die Zellen wurden bei 500 g sedimentiert und in DB auf eine Zelldichte von 2,5 x 10⁷ Zellen/ml eingestellt. 50 µl der Zellsuspension wurden in einer 4 cm langen Zellwurst an das eine Ende einer Soerensen-Phosphatagar-Platte pipettiert und für 30 min ruhig stehen gelassen. Überschüssiges Wasser wurde mit einem Stückchen Filterpapier abgenommen. Die Agarplatte wurde auf ein feuchtes Tuch gestellt, um einer Austrocknung der Platten vorzubeugen. Zur Induktion der Chemotaxis wurde ein Pappkarton abgedunkelt und auf einer Seite ein circa Stecknadelkopf-großes Loch eingeschnitten. Der Karton wurde lichtdicht über die Platten gestülpt, sodass sich die Zellwurst genau gegenüber dem Loch befand. Außerhalb des Pappkartons wurde vor dem Loch eine Lampe installiert. Die *slugs* formten sich nach ca. 16 h und wanderten zur Lichtquelle hin. Nach 24 h wurden die *slugs* durch Abspülen von der Platte geerntet. Die *slugs* wurden final in Extraktionspuffer (50 mM Tris, 3 M Urea, 3 % SDS, 1 % Chaps, pH 6,8) aufgenommen, lysiert und der Proteinextrakt für 30 min bei 20.000 g zentrifugiert.

3.3.3 Gefriertrocknung

In der Gefriertrocknung erfolgte die Trennung der Proteine/Peptide von den organischen Lösungsmitteln ACN oder TFA. Dazu wurde die Lösung mit H₂O auf eine ACN-Konzentration von unter 50 % verdünnt und für mehrere Stunden bei -80 °C eingefroren. Die gefrorenen Lösungen wurden mit durchlöcherter Deckeln versehen und in der Gefriertrocknungsanlage in einem Vakuum von 0,1 mbar getrocknet.

3.3.4 BCA-Test

Der BCA-Test wurde mit Hilfe des *Micro BCA Protein Assay Kits* von Pierce nach Herstellerangaben in Mikrotiterplatten durchgeführt. Als Standardprotein für die Kalibrierreihe diente BSA. Die Messung erfolgte im LEDetect 96 (Deelux Labortechnik) bei 562 nm.

3.3.5 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE erfolgte nach dem von Schagger und von Jagow (1987) veröffentlichtem Protokoll, in dem Tricin als Folgeion benutzt wurde. Die Gelkammern wurden von der Firma PeqLab® bezogen. Für Minigele wurde die Gelkammer 45-1010-i mit der Größe 80mm x 60mm x 1mm benutzt.

Puffer und Lösungen:

Anodenpuffer	0,2 M TRIS
pH 8,9 mit HCl eingestellt	
Kathodenpuffer	0,1 M TRIS
	0,1 M Tricin
	0,1 % (w/v) SDS
Acrylamid 2K-Lösung (30 %)	Acrylamid/Bisacrylamid 32 : 1
Rotiphorese Gel 30	Acrylamid/Bisacrylamid 37,5 : 1
Gelpuffer (3x), pH 8,45	3 M TRIS
	0,3 % (w/v) SDS
Glycerin	Fertiglösung
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Fertiglösung

Ammoniumpersulfat (APS)	40 % (w/v)
SDS-Probenpuffer (2x)	125 mM TRIS
	17,2 % (v/v) Glycerin
	4 % (w/v) SDS
	0,05 % (w/v) Bromphenolblau
	0,05 % (w/v) Phenolrot

Die Gele wurden als diskontinuierliche Gele gegossen. Ein 4 %iges Sammelgel bildete die erste, ein 13 %iges Trenngel die zweite Phase.

Tab. 4: Pipettierschema für sechs 13 %ige Minigele

	Trenngel	Sammelgel
Acrylamidkonzentration (%)	13	4
Acrylamid 2K-Lösung (30 %)	-	0,54 ml
Rotiphorese Gel 30	3,46 ml	-
Gelpuffer (3-fach)	2,66 ml	1,34 ml
Glycerin	1,6 ml	-
H₂O	0,28 ml	2,12 ml
TEMED	4 µl	4 µl
APS	8 µl	8 µl

Nach dem Auspolymerisieren wurden die Gele bei 4 °C aufbewahrt. Die Gele wurden in die Gelkammer eingespannt und Anoden- und Kathodenpuffer in die dafür vorgesehenen Tanks gegossen. Die Anode befand sich am unteren Ende des Gels, die Kathode am oberen Ende. Nachdem der Kamm aus den Taschen gezogen worden war, wurden alle Kammern gründlich mit Kathodenpuffer gespült um restliches SDS zu entfernen.

3.3.6 Probenvorbereitung für SDS-PAGE

Um Disulfidbrücken innerhalb eines Proteins/Peptids aufzubrechen, mussten die Proben vor der Gelelektrophorese reduziert und alkyliert werden.

Puffer und Lösungen:

2 M DTT

1 M IAA

Die Proben wurden bei 56 °C und 50 mM DTT für 20 min reduziert und für mindestens 30 min bei RT im Dunkeln mit 150 mM IAA alkyliert. Vor dem Auftragen wurde die Probe für 15 min bei 70 °C denaturiert und mit SDS-Probenpuffer versetzt.

Die Probe wurde in die gespülte Kammer pipettiert. Als Proteinstandard wurden 5 µl Proteinmarker *SeeBlue*® Plus 2 verwendet.

Der Gellauf erfolgte bei 25 mA für 30 min, dann bei 50 mA bis die Lauffront des Bromphenolblaus fast das Ende des Gels erreicht hatte.

3.3.7 2D-Gelelektrophorese

Bei der zweidimensionalen SDS-Gelelektrophorese wurden im ersten Schritt die aufgetragenen Proteine/Peptide anhand ihres isoelektrischen Punktes aufgetrennt und dann in einem SDS-Tricin-Gel nach ihrer Größe getrennt. Dabei wurden je nach Fragestellung verschiedene pH-Gradienten verwendet.

Puffer und Lösungen:

Rehydrierungspuffer A:	8 M Harnstoff 4 % (w/v) CHAPS 65 mM DTT 0,5 % (v/v) IPG-Puffer des jeweiligen pHs
Äquilibriumspuffer 1:	50 mM TRIS-HCl pH 8,8 6 M Harnstoff 30 % (v/v) Glycerin 2 % (w/v) SDS 65 mM DTT eine Spur BPB
Äquilibriumspuffer 2:	50 mM TRIS-HCl pH 8,8 6 M Harnstoff 30 % (v/v) Glycerin 2 % (w/v) SDS 135 mM IAA eine Spur BPB
SDS-Elektrophoresepuffer:	(siehe SDS-PAGE)
Agarose-Lösung:	0,8 % (w/v) NA Agarose in Kathodenpuffer eine Spur BPB

3.3.7.1 Isoelektrische Fokussierung (Die erste Dimension)

Die isoelektrische Fokussierung (IEF) erfolgte auf einer EttanIPGphorII. Dabei wanderten die aufgetragenen Proteine durch die Gelmatrix und sammelten sich in dem ihrem pI entsprechenden pH-Bereich. Es wurden 18 cm lange *IPG-DryStrips* der Firma GE Healthcare verwendet. Die Streifen wurden in einer Halterung (*Stripholder*) mit Proteinlösung und Rehydrationspuffer rehydriert. Je nach pH-Gradient wurden unterschiedliche Mengen Protein verwendet. Die Probe wurde mit Rehydrationspuffer A auf ein Volumen von 360 µl gebracht und für 8 min und 20.000 g bei RT zentrifugiert. Anschließend wurden 350 µl der Proteinlösung pro *IPG-DryStrip* (18 cm) in einen gesäuberten *Stripholder* pipettiert. Der *IPG-DryStrip* wurde von der Anode ausgehend von der Schutzfolie befreit und mit der Gelseite nach unten in den *Stripholder* gelegt, wobei die Polaritäten zu beachten waren. Der *IPG-DryStrip* wurde mit 1 - 1,5 ml mineralöhlhaltiger *IPG-Cover Fluid*-Lösung überschichtet und mit der Abdeckung des *Stripholders* abgedichtet, um einen optimalen Kontakt zwischen Gel und Elektrode zu gewährleisten. Bei größeren Proteinmengen wurden nach 12 h kleine Streifen Elektrodenpapier zwischen Elektrode und Anode/Kathode gelegt. Bei den verschiedenen pH-Gradienten wurden unterschiedliche Spannungen angelegt.

Tab. 5: Spannungsprotokoll der IEF für unterschiedliche Gradienten

pH-Gradient	3 – 5,6 NL	3 – 10 NL
Menge an Protein	250 µg	500 µg
Elektrodenpapier	+	-
Spannungsprotokoll		
6h	0 V	0 V
6h	50 V	50 V
1h	200 V	200 V
1h	500 V	500 V
1h	1000 V	1000 V
1,5h Gradient bis	8000 V	8000 V
Fokussierung bis	64.000 Vh	84.000 Vh
Halteschritt	700 V	700 V

Maximal wurden 50 µA/ *IPG-DryStrip* zugelassen. Die Temperatur betrug 20 °C.

3.3.7.2 Vorbereitung des IEF-Streifens für die zweite Dimension

Für die SDS-PAGE wurde der *IPG-DryStrip* reduziert und alkyliert. Dazu wurden bei zwei serologischen Pipetten (5 ml) das spitze Ende abgebrochen und mit Parafilm verschlossen. Die Pipetten wurden jeweils mit 6 ml Äquilibrierungspuffer 1 und 2 gefüllt. Nach der Fokussierung wurde der *IPG-DryStrip* aus der Halterung entfernt, kurz mit H₂O gewaschen, in die serologische Pipette mit Äquilibrierungspuffer 1 transferiert und 15 min auf einem Kippschüttler inkubiert. Danach wurde der *IPG-DryStrip* mit H₂O gewaschen, in die serologische Pipette mit Äquilibrierungspuffer 2 transferiert und 15 min inkubiert. Zum Schluss wurde der *IPG-DryStrip* kurz mit H₂O gewaschen, mit der Gelseite nach oben auf ein feuchtes Tuch gelegt und die überstehenden Plastikenden mit einer Schere abgeschnitten.

3.3.7.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Die zweite Dimension)

Es wurde das Tricin-Gelsystem nach Schägger und von Jagow (1987) verwendet. Die Gele wurden in der PeqLab 45-2020-i Apparatur als Maxigele (180 mm x 180 mm x 1,5 mm) gegossen. Dabei wurde das Trenngel bis auf 0,5 cm vor den Glasplattenrand gegossen und über Nacht auspolymerisiert. Auf ein Sammelgel wurde verzichtet.

Der *IPG-DryStrip* wurde mit der Gelseite nach innen auf das Trenngel gelegt, wobei das anodische Ende des Streifens stets nach links orientiert war. Als Marker wurde 8 µl *SeeBlue*®-Proteinstandard auf ein 0,5 cm x 0,5 cm großes Elektrodenpapier pipettiert und links am anodischen Bereich des *IPG-DryStrips* auf dem Gel platziert. Der *IPG-DryStrip* wurde mit warmer 0,5 %iger Agarose-Lösung in Kathodenpuffer luftblasenfrei überschichtet. Nach dem Aushärten der Agarose-Lösung wurden die Tanks mit Kathoden und Anodenpuffer gefüllt. Der Gellauf erfolgte bei 20 mA für 40 min und 40 - 50 mA über Nacht bis die Bromphenolblaulauffront ca. 1 cm vor Ende des Gels war. Die Elektrophorese erfolgte gekühlt bei 15 °C. Im Ergebnisteil werden die 2D-Gelbilder so abgebildet, dass der anodische Teil des *IPG-DryStrips* links im Bild zu sehen ist.

3.3.8 Proteinfärbung

3.3.8.1 Coomassiefärbung nach Kang *et al.* (2002)

Aluminiumsulfat-(14-18)-Hydrat	5 % (w/v)
Ethanol	10 % (v/v)
CBB G-250	0,02 % (v/v)
o-Phosphorsäure	2 % (w/v)

Nach dem Gellauf wurde das Gel aus der Kassette genommen und zehn Minuten in H₂O gewaschen. Anschließend wurde das Gel für mindestens 2 h in Coomassie-Färbelösung inkubiert. Die Gele wurden mit Wasser entfärbt.

3.3.8.2 Coomassiefärbung nach Gelhaus

Stammlösung	
Ammoniumsulfat	10 % (w/v)
O-Phosphorsäure	2 % (w/v)
CBB G-250	0,02 % (v/v)
Arbeitslösung	
Stammlösung	80 % (v/v)
Acetonitril	20 % (v/v)
Entfärbelösung	
Acetonitril	20 % (v/v)
HCl	10 mM

Die Färbung wurde verändert nach Neuhoff *et al.* (1988) durchgeführt. Die Gele wurden nach dem Gellauf ohne Waschen direkt mit der Arbeitslösung für 24 h inkubiert. Danach wurde die Färbelösung abgenommen und die Gele mit Entfärbelösung inkubiert.

3.3.8.3 Silberfärbung nach Heukeshoven und Dernick (1985)

Lösung 1:	30 % (v/v) EtOH, 10 % (v/v) Essigsäure
Lösung 2:	30 % (v/v) EtOH, 0,5 M Natriumacetat, 0,5 % (v/v) Glutardialdehyd, 0,02 % (w/v) Na ₂ S ₂ O ₃
Lösung 3:	H ₂ O
Lösung 4:	0,2 % (w/v) AgNO ₃ , 0,02 % (v/v) Formaldehyd
Lösung 5:	2,5 % (w/v) Na ₂ CO ₃ , 0,01 % (v/v) Formaldehyd
Lösung 6:	1,5 % (w/v) EDTA

Das Gel wurde für mindestens 10 min in Lösung 1 fixiert und für 10 min in Lösung 2 inkubiert. Nach viermaligem Waschen in H₂O, wurde das Gel für 20 min in Lösung 4 inkubiert und mit Lösung 5 entwickelt, bis die Proteinbanden deutlich sichtbar waren. Die Entwicklung wurde mit Lösung 6 gestoppt.

3.3.8.4 Proteinfärbung mit Flamingo

Lösung 1:	40 % (v/v) EtOH, 10 % (v/v) Essigsäure
Lösung 2:	<i>Flamingo Fluorescent Gel Stain</i> , 10fach Lösung

Das Gel wurde über Nacht in Lösung 1 gelassen. Lösung 2 wurde mit H₂O 1:10 verdünnt und über Nacht mit dem Gel inkubiert. Das Gel wurde auf einen Fluoreszenzscanner gelegt, der Farbstoff bei 512 nm angeregt und das Emissionsmaximum bei 535 nm gemessen.

3.3.9 Bioinformatik

Alle Aminosäuresequenzen von Proteinen/Peptiden aus *D. discoideum* wurden unter www.dictpbase.org anhand der DDB-Nummer herausgesucht. Die für den Vergleich herangezogenen Proteine/Peptide anderer Organismen wurden der Datenbank NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) unter www.ncbi.nlm.nih.gov entnommen. Die Analyse der Proteinsequenzen wurde mit dem Programm *ClustalW* der Internetseite von EMBL-EBI (*European Bioinformatics Institut*) vorgenommen. Die Strukturanalysen bezüglich der Signalpeptide erfolgten mit dem Programm *SignalP 3.0 Server* des CBS (*Center for Biological Sequence Analysis, University of Denmark*) (Nielsen *et al.*, 1997; Bendtsen *et al.*, 2004).

Für die *in-silico* Berechnung der molekularen Masse und des theoretischen isoelektrischen Punkts von Proteinen/Peptiden wurde das Programm *ProtParam tool* unter www.expasy.org verwendet.

Die Berechnung der Proteinladung bei bestimmten pH-Werten wurde mit dem Programm *Protein Calculator* durchgeführt.

Internetadressen:

Dictybase	http://dictybase.org/
ProtParam	http://expasy.org/tools/protparam.html
SignalP	http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/
ClustalW	http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html
NCBI-Datenbank	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/
Protein Calculator	http://www.scripps.edu/~cdputnam/protcalc.html
SWISS Model workspace	http://swissmodel.expasy.org/workspace/
UCSF Chimera	http://www.cgl.ucsf.edu/chimera/

3.3.10 Massenspektrometrie

Die Identifizierung von Proteinen per Massenspektrometrie wurde im Labor von Dr. Christoph Gelhaus mit einer *4700 Proteomics Analyzer Workstation* (wie in Schmidt *et al.*, 2008) durchgeführt. Dabei wurden zwei verschiedene Methoden angewandt:

1. MALDI-TOF (*Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization – Time of Flight*) MS
2. kombinierte Tandem-Massenspektrometrie (MS-MS/MS)

Bei der Massenbestimmung wurde von den Proteinen/Peptiden nach der tryptischen Spaltung ein Peptidmassen-Fingerabdruck (*Peptid mass fingerprint*, PMF) erstellt. Mit diesem wurde in Proteindatenbanken mit der Suchmaschine *Mascot V 2.0* nach dem passendem Protein/Peptid gesucht. Zusätzlich wurden fünf abundante Peptide pro PMF ausgewählt und mittels MS/MS fragmentiert, um weitere Sequenzinformationen zu erhalten.

3.3.10.1 Probenvorbereitung für Massenspektrometrie Zoophysiologie

Puffer und Lösungen:

Wasser (*HPLC-grade*)

50 % (v/v) ACN in 12,5 mM ABC

100 % ACN

0,3 % (v/v) TFA in ACN

0,1 % (v/v) TFA in 5 % (v/v) ACN

0,1 % (v/v) TFA

Trypsin (*Serva NB seq. Grade*) (Trypsin-Stammlösung 0,2 mg/ml porkines Trypsin in 50 mM ABC)

Matrixlösung 8 mg/ml ACHC in 60 % (v/v) ACN/0,1 % (v/v) TFA

Für die Identifizierung von Proteinen aus einem Gel wurden die entsprechenden Punkte mit einem *Spotpicker*, der vorher in HPLC-Wasser und 50 % EtOH gewaschen wurde, ausgestochen. Das Gelstück wurde drei Mal mit 100 µl HPLC-Wasser und einmal mit 100 µl 50 % (v/v) ACN/12,5 mM ABC gewaschen, wobei jeweils für circa 3 min inkubiert wurde. Anschließend wurde das Gelstück in 100 µl 100 % (v/v) ACN für einige Minuten geschrumpft, der Überstand abgenommen und das Gelstück für 15 min getrocknet. Die Trypsin-Lösung wird in 20 mM ABC auf 5 ng/µl verdünnt und jedes Gelstück mit 20 µl der Trypsin-Lösung für 30 min auf Eis inkubiert und über Nacht bei 37 °C gespalten. Die Trypsin-Spaltung wurde mit 20 µl 0,3 % (v/v) TFA in ACN gestoppt und das Reaktionsgefäß für 10 min ins Ultraschallbad gestellt. Der Überstand wurde abgenommen und in eine neue Mikrotiterplatte (Polypropylen) überführt. Zum trockenen Gelstück wurden erneut 20 µl ACN gegeben, das Reaktionsgefäß für 10 min ins Ultraschallbad gestellt und der Überstand mit dem vorherigen vereinigt. Die ACN-Peptid-Suspension wurde in der Vakuumzentrifuge bei RT für 90 min eingeeengt. Die Peptide wurden in 0,6 µl Matrixlösung aufgenommen und auf ein *MALDI-Grid* pipettiert.

Als feste Modifikationen wurden Carbamidomethylierungen und als variable Modifikation wurde die Oxidation von Methioninresten berücksichtigt. Die maximale Anzahl verfehlter Spaltungen durch Trypsin betrug eins. Für eine schnelle Suche wurde eine Protein-Datenbank mit den aus dem Genom abgeleiteten Proteinsequenzen aller mutmaßlichen Apls und Lysozyme aus *D. discoideum* angefertigt. Ferner wurde die NCBI-Datenbank für das Taxon *D. discoideum* benutzt.

3.3.10.2 Probenvorbereitung für Massenspektrometrie IEM (LC-MS) (Institut für experimentelle Medizin, AG systematische Proteomforschung)

Puffer und Lösungen:

Wasser (*HPLC-grade*)

50 % (v/v) ACN in 12,5 mM ABC

Die Proben wurden mit dem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und mehrmals mit H₂O gewaschen. Die Coomassie-gefärbten Proteinbanden wurden mit 50 % ACN/12,5 mM ABC entfärbt, indem die Gelstücke mehrmals und über Nacht in der Lösung inkubiert wurden. Die tryptische In-Gel-Spaltung und alle weiteren Schritte erfolgten im IEM durch Dr. Thorsten Overath. Die Gelstücke wurden für 30 min bei RT in der Vakuumzentrifuge getrocknet, für 30 min bei 56 °C mit 100 µl 10 mM DTT reduziert und für 20 min bei RT mit 100 µl mit 55 mM IAA alkyliert. Die Proben wurden mit 100 mM Ammoniumhydrogencarbonat gewaschen und mit 100 % ACN in der Vakuumzentrifuge geschrumpft. Der Überstand wurde verworfen. Die getrockneten Gelstücke wurden mit 5 µl Trypsin (10 ng/µl) überschichtet und mit 200 µl 5 % ACN in 50 mM Ammoniumhydrogencarbonat bei 37 °C über Nacht inkubiert. Der Überstand wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Die Gelstücke wurden jeweils 15 min mit 100 µl 60 % ACN in 0,5 % TFA und mit 100 % ACN inkubiert und die jeweiligen Überstände zusammengeführt. Das Peptideluat wurde geteilt und vollständig im Mikrokonzentrator eingengt. Eine Hälfte der Peptideluate wurde für die NanoHPLC-ESI-MS/MS Analytik verwendet. Hierfür wurden die Proben in 12 µl 3 % ACN in 0,1 % TFA gelöst und für fünf Minuten im Ultraschallbad behandelt. 10 µl hiervon wurden für die massenspektrometrische Analyse über NanoHPLC-ESI-MS/MS verwendet. Die gelösten Peptide wurden an einer Ultimate 3000 NanoHPLC (DIONEX) über C18 Umkehrphasen-Chromatographie (RP) separiert. 10 µl der in 3 % ACN in 0,1 % TFA gelösten Peptide wurden auf einer PepMap C18 Vorsäule (DIONEX) konzentriert und über eine PepMap100 analytische Säule (DIONEX) aufgetrennt. Als Puffer wurden 0,05 % Ameisensäure (Puffer A) und 80 % ACN in 0,04 % Ameisensäure (Puffer B) verwendet. Die massenspektrometrische Analyse der über RP-Chromatographie separierten Peptide erfolgte an einem LTQ Orbitrap Velos mit ETD-Massenspektrometer (Thermo Scientific), ausgerüstet mit einer *nano electro spray*-Quelle (nESI) im positiven Modus. Die

Kapillartemperatur während der Ionisierung betrug 197 °C und die Quellenspannung 1,3 kV.

Die Interpretation der Fragmentspektren erfolgte über den Proteom Discoverer V 1.2 (Thermo Scientific). Die für die Proteinidentifizierung verwendete Datenbank wurde über www.uniprot.org bezogen. Es wurden alle Proteinsequenz-Einträge (Swissprot) der Protein Knowledgebase (UniProtKB) für die Taxonomie *Dictyostelium discoideum* [44689] (reviewed) verwendet.

Um als identifiziert zu gelten mussten mindestens zwei Peptide mit hoher Wahrscheinlichkeit oder mindestens drei Peptide mit mäßiger Wahrscheinlichkeit einem Protein aus allen vier Analysen zugeordnet werden.

3.3.11 Circular dichroismus-Spektropolarimetrie

Die Analyse der Sekundärstruktur und damit der korrekten Faltung des rekombinant hergestellten Proteins erfolgte in der Biochemie (AG Grötzinger) der CAU durch Dr. Matthias Michalek. Zur Untersuchung der Konformation von rApl D wurde eine 13,2 µM Lösung des Proteins in 10 mM Natriumphosphatpuffer pH 6,8 im J-720 Spektropolarimeter (Japan Spectroscopic, Tokyo, Japan) analysiert, das nach Chen und Yang (1977) kalibriert worden war. Dabei wurde die Absorption von links- und rechtszirkulär polarisiertem Licht am chiralen Zentrum des Peptidrückgrats abhängig von der Art und Struktur des Peptids ausgenutzt. Es wurden vier Spektren von 195 bis 250 nm bei einer Bandweite von 2 nm und einer Geschwindigkeit von 5 nm/min in einer Quartzküvette von 0,5 mm Schichtdicke gemessen und in molarer Elliptizität $[\theta]$ ausgedrückt.

$$[\theta]_{MRW,\lambda} = \frac{\theta_{\lambda} \times MW}{100 \times d \times c \times N_A}$$

MRW bezeichnete die berechnete mittlere molare Masse aller Aminosäurereste des Proteins, λ gab die Wellenlänge an. Daneben beschrieb MW die molekulare Masse des Protein (g/mol), d gab die Schichtdicke der Küvette in cm an. Die Konzentration des Proteinprobe (c) wurde in g/cm³ und die Elliptizität bei der jeweiligen Wellenlänge (θ_{λ}) in mgrad angegeben. Die Elliptizität des Puffers wurde von den Werten abgezogen. Die Ergebnisse wurden mittels CONTIN II (Provencher und Glöckner, 1981) in die Vorhersage der Sekundärstrukturelemente umgewandelt.

3.3.12 Modellierung der Tertiärstruktur

Für die Modellierung der Tertiärstruktur wurde die Aminosäuresequenz des rekombinanten rApl D mit dem Programm SWISS-MODEL Workspace - *An Automated Comparative Protein Modelling Environment* (Version 8.05) analysiert (Arnold *et al.*, 2006). Das Programm greift auf eine Datenbank mit Tertiärstrukturen bereits bekannter Proteine zurück und modelliert das zu analysierende Protein anhand der Tertiärstruktur mit der größten Übereinstimmung. Die Ergebnisse wurden als *Protein Databank*-Datei gespeichert. Die Auswertung und Darstellung der Ergebnisse wurde mit der Software UCSF Chimera - *an extensible molecular modeling system* durchgeführt (Pettersen *et al.*, 2004).

3.4 Aktivitätstests

3.4.1 Mikrosuszeptibilitätstest

Puffer und Lösungen:

- 0,1 % BSA-Lösung
- 10 mM Natriumphosphatpuffer pH 5,2 (steril)
- 10 mM Natriumphosphatpuffer pH 7,4 (steril)
- 10 mM Kaliumphosphatpuffer pH 5,2 (steril)
- Melittin (*from Bee venom; sequencing grade*)
- LB Agar-Platten

Mit dem Mikrosuszeptibilitätstest wurde die minimale inhibitorische Konzentration (*minimal inhibitory concentration*, MIC) antimikrobieller Proteine gegen gram-negative und gram-positive Bakterien ermittelt. Dabei wurde in einer Rundboden-Mikrotiterplatte eine Verdünnungsreihe des potenziell antimikrobiellen Stoffs erstellt und anschließend eine definierte Anzahl an Mikroorganismen dazugegeben. In derjenigen Vertiefung, in der nach einer Wachstumsphase keine Bakterien zu sehen waren, ist die minimale inhibitorische Konzentration erreicht worden.

Um eine Anheftung des Proteins an die Wand der Mikrotiterplatte zu vermeiden, wurde jede Vertiefung mit 200 µl 0,1 % BSA-Lösung gefüllt, für mindestens 10 min inkubiert und dann entfernt. Nachfolgend wurde in jede Vertiefung 90 µl eines 10 mM Natriumphosphatpuffers mit einem pH von entweder pH 5,2 oder pH 7,4 vorgelegt.

Anschließend wurde die erste Spalte der Mikrotiterplatte mit der Protein-Lösung, die mit Na-Phosphat-Puffer des entsprechenden pHs verdünnt wurde, auf 180 µl aufgefüllt und seriell durch die Mikrotiterplatte 1:2 verdünnt.

Als Positivkontrolle wurde das antimikrobielle Peptid Melittin verwendet, als Sterilkontrolle wurde in eine Reihe 10 µl steriles LB-Medium zu den 90 µl Puffer pipettiert. Als Wachstumskontrolle wurde das Solvens (0,1 % TFA) der Protein-Lösung in dem entsprechenden Volumen der eingesetzten Protein-Lösung verwendet.

Es wurde auf antimikrobielle Aktivität gegen *Escherichia coli* D31 YpCr und *Bacillus megaterium* (ATCC 14581) getestet. Beide Bakterien-Stämme wurden in ihrer logarithmischen Wachstumsphase ($OD_{600} = 0,1$ bis $0,2$) aus dem Inkubator genommen und mit vorgewärmten LB-Medium auf 10.000 CFU/ml (*Colony Forming Units*) verdünnt. Von dieser Verdünnung wurde in jede Vertiefung, mit Ausnahme der Sterilkontrolle, 10 µl pipettiert, sodass sich in jeder Vertiefung 100 CFU befanden. Die Mikrotiterplatte wurde mit Parafilm abgedichtet und in einer feuchten Kammer bei 37 °C für 24 h inkubiert, bis die gewachsenen Bakterien als Sediment in der Vertiefung sichtbar waren. Die minimale inhibitorische Konzentration wurde als die Konzentration definiert, bei der kein Bakterienwachstum zu beobachten war.

Zur Bestimmung der minimalen letalen Konzentration (*Minimal Lethal Concentration*, MLC) wurde aus der Vertiefung mit der höchsten und zweithöchsten Peptidverdünnung ohne Bakterienwachstum zwei Aliquots à 40 µl, sowie aus der Vertiefung mit der niedrigsten Proteinkonzentration, die Bakterienwachstum zeigte, ein Aliquot von 10 µl genommen und mit entsprechendem Puffer auf 100 µl aufgefüllt. Diese wurden auf einer LB-Agar-Platte ausplattiert und für 24 h bei 37 °C inkubiert. Diejenige Verdünnungsstufe, die keine Koloniebildung zeigte, wurde als die minimale bakterizide Konzentration definiert.

Zur Bestimmung der Zellzahl anhand der optischen Dichte wurden die von Dr. Henning Fedders erstellten Werte verwendet:

$OD_{600} B. megaterium = 0,1$ entspricht $2,8 \times 10^6$ CFU (colony forming units)/ml

$OD_{600} E. coli = 0,1$ entspricht $2,5 \times 10^7$ CFU (colony forming units)/ml

Die Versuche wurden bei pH 5,2 mit 10 mM Kaliumphosphatpuffer wiederholt.

3.4.2 Hämolysetest

Puffer und Lösungen:

0,1 % BSA-Lösung

1 x PBS (50 mM Natriumphosphatpuffer, 150 mM NaCl, pH 7,4) (steril)

Melittin (*from Bee venom; sequencing grade*)

50 %ige Hammelerythrozytensuspension

Mit dem Hämolysetest wurde die hämolytische Aktivität der eingesetzten Peptide überprüft. Zur Analyse wurden Hammelerythrozyten verwendet, die einen im Vergleich zu menschlichen Erythrozyten hohen Anteil an Sphingomyelinen und einen geringen Anteil an Phosphatidylcholin enthalten.

Eine Mikrotiterplatte mit Rundboden wurde mit 0,1%iger BSA-Lösung inkubiert und nach 15 min auf einem Tuch ausgeschlagen. In sieben Reihen der Platte wurden 80 µl PBS vorgelegt, in die letzte Reihe wurden 80 µl ddH₂O pipettiert. Die Löcher der ersten Spalte wurden mit den zu analysierenden Proben befüllt und auf 160 µl mit PBS aufgefüllt. Als Positivkontrolle wurde das hämolytische Peptid Melittin mit 20 µM eingesetzt. Als Negativkontrolle wurde das Solvens der Proben in der entsprechenden Menge in die Platte pipettiert. Die Peptide und Kontrollen wurden seriell durch die Mikrotiterplatte verdünnt, sodass jedes Loch ein Volumen von 80 µl enthielt.

Die 50 %ige Hammelerythrozytensuspension wurde mehrmals mit PBS gewaschen und final auf 12,5 % eingestellt. Jeweils 20 µl wurden in jedes Loch der Mikrotiterplatte gegeben und die Platte für 1 h bei 37 °C inkubiert. Der Grad der Lyse wurde optisch ausgewertet, wobei der Hämolysewert in der Reihe mit dddH₂O als 100 % genommen wurde.

3.4.3 Membranpermeabilisierungstest mit SYTOX®Green

Puffer pH 4,4 25 mM NaCl, 20 mM MES pH 4,4

Puffer pH 5,2 25 mM NaCl, 20 mM MES pH 5,2

Puffer pH 7,4 25 mM NaCl, 10 mM HEPES pH 7,4

Die Membranpermeabilisierungstest wurden von Heidrun Ließegang durchgeführt. Die membranpermeabilisierende Aktivität von antimikrobiellen Peptiden wurde über den Farbstoff SYTOX®Green (Invitrogen) nachgewiesen. Die geschädigte bakterielle

Zellmembran wird für den Farbstoff permeabel, der daraufhin in die Zelle eintritt und mit der DNA interkaliert. Der entsprechende Anstieg der Fluoreszenz wird im Fluoroskan II (Labsystems) bei einer Anregungswellenlänge von 495 nm und einer Emission von 538 nm aufgezeichnet.

Dazu wurde eine Flachboden-Mikrotiterplatte mit 96 Vertiefungen mit 200 µl 0,1 % BSA pro Vertiefung gefüllt und für 15 min inkubiert. Die Lösung wurde wieder entfernt und in jede Vertiefung 25 µl des jeweiligen Puffers vorgelegt. In der ersten Spalte der Platte wurden in einem Volumen von 25 µl die Kontrollpeptide bzw. die zu analysierende Probe oder die Pufferkontrolle pipettiert und seriell 1:2 durch alle 12 Spalten verdünnt. Die 25 µl aus der letzten Spalte wurden verworfen. Anschließend wurden 25 µl der 4 µM SYTOX®Green-Lösung in jede Vertiefung gegeben und die Platte vor Licht geschützt.

Die zu untersuchenden Bakterien wurden in der logarithmischen Wachstumsphase (OD_{600} zwischen 0,4 und 0,5) geerntet, zweimal mit dem entsprechenden Puffer gewaschen und geteilt. Alle Schritte wurden bei 4°C oder aus Eis durchgeführt. Die eine Hälfte der Bakterien wurde in 4 ml Puffer aufgenommen, die andere Hälfte wurde mit 4 ml 70 % EtOH für 5 min abgetötet und als Positivkontrolle verwendet. Gram-positive Bakterien wurden auf eine Zelldichte von 2×10^6 CFU/ml, gram-negativen Bakterien auf 2×10^7 CFU/ml in dem jeweiligen Puffer eingestellt. Dann wurden 50 µl der Bakteriensuspension in jede Vertiefung der Versuchsplatte pipettiert. Zur Bestimmung des maximalen Totwertes wurden in die letzten beiden Reihen der Platte 50 µl der vorher mit EtOH abgetöteten Bakterien zu den 25 µl Puffer und den 25 µl SYTOX®Green gegeben. Die Messung erfolgte im Fluoroskan II alle 10 min für mindestens 2 h. Die gemessenen Fluoreszenzwerte wurden in den Prozentsatz der permeabilisierten Bakterien umgerechnet. Dabei wurde von der Fluoreszenz der Kontrollpeptide bzw. der Probe (F_{Probe}) das Signal der Pufferkontrolle (F_{Puffer}) abgezogen und durch die Fluoreszenz der vorher abgetöteten Bakterien (F_{tot}) (abzüglich der Pufferfluoreszenz) geteilt.

$$\text{Prozent permeabilisierte Bakterien} = (F_{\text{Probe}} - F_{\text{Puffer}}) / (F_{\text{tot}} - F_{\text{Puffer}}) \times 100$$

Für die Bakterien *Klebsiella pneumoniae* KP21 wurden die Versuche in der Anwesenheit von 10 µM Zn^{2+} oder 1 mM Mg^{2+} durchgeführt. Dazu wurde der MES-Puffer mit der entsprechenden Menge der Ionen versetzt.

Für die Analyse der zytotoxischen Aktivität von rApl D gegen *Dictyostelium* wurde der SYTOX®Green-Test mit einigen Abwandlungen verwendet. Die Amöben wurden in

axenischem HL5-Medium in Petrischalen kultiviert, in der logarithmischen Wachstumsphase geerntet und in 20 mM MES pH 5,2 mit 150 mM NaCl resuspendiert. Pro Vertiefung wurden 5×10^4 Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen von rApl D (maximal 5 μM) und den beiden Kontrollpeptiden Melittin und Cecropin P1 (maximal 12,5 μM) bei RT inkubiert. Als Totkontrolle wurden Zellen mit 70 % Ethanol behandelt. Durch die Membranpermeabilisierung interagiert der Fluoreszenzfarbstoff SYTOX®Green mit der freigesetzten DNA. Der Anstieg der Fluoreszenz wurde als Maß der Permeabilisierung verwendet.

Für die Analyse der fungiziden Aktivität von rApl D wurde der Hefenstamm *Saccharomyces cerevisiae* S150 verwendet. Für den Test wurden pro Vertiefung 1×10^4 Zellen in 20 mM MES pH 5,2 mit 25 mM NaCl resuspendiert und ebenfalls mit einer Verdünnungsreihe der Peptide inkubiert. Als Totkontrolle wurden die Zellen mit 1,5 % Essigsäure, 70 % EtOH oder 1 % Triton X-100 behandelt, die Zellen ließen sich allerdings in keinem der Ansätze lysieren. Daraufhin wurde die höchste permeabilisierende Aktivität des Kontrollpeptids Melittin als 100 % gesetzt und die Aktivitäten der anderen Peptide in das entsprechende Verhältnis gesetzt.

3.4.4 Liposomendepolarisationstest

3.4.4.1 Liposomenpräparation

Liposomenpuffer 50 mM Tris-Maleat, 50 mM K_2SO_4 , 0,5 mM EDTA,
0,02 % (w/v) Natriumazid, mit KOH einstellen

Für die Herstellung der Liposomen wurden 60 mg α -Phosphatidylcholin (Typ II S) (SIGMA) aus Sojabohnen in 1,5 ml Chloroform gelöst und unter N_2 -Begasung im Exsikkator getrocknet, sodass ein gleichförmiger Lipidfilm entsteht. Die Lipide wurden in 1,5 ml Liposomenpuffer aufgenommen und für 15 min auf Eis mit Ultraschall behandelt bis die Lösung klar wurde. Die Lösung wurde 3 x in flüssigem Stickstoff eingefroren und 3 x 5 s beschallt. Die Liposomen wurden bei 4 °C gelagert (Pick, 1981).

3.4.4.2 Porenbildende Aktivität

Küvettenpuffer 50 mM TRIS-Maleat, 50 mM Na₂SO₄, 0,5 mM EDTA,
0,02 % (w/v) Natriumazid, pH mit NaOH einstellen

Das gereinigte rApl D wurde auf porenbildende Aktivität mit Hilfe des Liposomen-Depolarisationstests untersucht. Dabei wurde die Freisetzung des potentialsensitiven Fluoreszenzfarbstoffs 3,3'-Diethylthiadicarbocyaniniodid (DTDC = diS-C2-[5]) in einem Fluoreszenzspektrometer (LS 50 B) gemessen und dargestellt (Loew *et al.*, 1983). Es wurden 2 µl Liposomen (40 mg/ml) und 8 µl des Fluoreszenzfarbstoffes DTDC mit 8 ml Küvettenpuffer pH 5,2 gemischt, um eine Endkonzentration von 1 µM DTDC zu erhalten, was einer Fluoreszenz von 100 % entspricht. 1 ml des Ansatzes wurde in einer Küvette mit 2 µl Valinomycin versetzt, was zu einer Reduktion der Fluoreszenz um etwa 90 % führte. Durch die Zugabe von Valinomycin wurde ein K⁺-Diffusionspotenzial induziert und der Farbstoff an die Liposomen gebunden. Dadurch verlor der Farbstoff seine fluoreszierende Eigenschaft. Nach Zugabe eines porenbildenden Proteins wurde das Diffusionspotenzial zerstört und die Fluoreszenz stieg proportional zur Menge des freigesetzten Farbstoffs an. Der Anstieg der Fluoreszenz um 5 % des Ausgangswertes wurde als eine Unit definiert. Als Positivkontrolle wurde das porenbildende Peptid Alamethicin verwendet.

4 Ergebnisse

Dictyostelium discoideum ist als potenter Phagozyt in der Lage bis zu 300 Bakterien pro Stunde aufzunehmen, abzutöten und zu verwerten (Bozzaro *et al.*, 2008). Um ein besseres Verständnis über die intrazellulären Vorgänge bei der Abtötung der aufgenommenen Bakterien zu erhalten, soll in dieser Arbeit die antimikrobielle Basis der Amöbe molekular charakterisiert werden. Dies beinhaltet die Identifikation der vorhandenen Effektormoleküle auf Proteinebene sowie die Analyse des Wirkmechanismus und des antimikrobiellen Spektrums ausgewählter Proteine.

4.1 Qualitative Analyse antimikrobieller Proteine in *D. discoideum*

Für die Analyse des antimikrobiellen Arsenal von *Dictyostelium discoideum* wurde zuerst erforscht, welche potenziell antimikrobiellen Effektormoleküle als Protein oder Peptid in *D. discoideum* vorliegen.

4.1.1 Proteomische Analyse von *Dictyostelium*-Phagolysosomen

Als erster Versuchsansatz wurde die Anreicherung von Phagolysosomen, das Kompartiment in dem antimikrobielle Proteine voraussichtlich ihre Wirkung entfalten, in einem Saccharosegradienten gewählt. Durch die Extraktion der Proteine nach Dieckmann *et al.* (2008) wurden spezifisch phagolysosomale Proteine in für Proteomics ausreichenden Mengen isoliert. In einer nachfolgenden 2D-Gelelektrophorese wurden die Proteine anhand ihres isoelektrischen Punkts auf einem pH-Gradienten aufgetrennt und analysiert. Gotthardt *et al.* (2006) identifizierten mit dieser Methode aus Phagolysosomen von *Dictyostelium discoideum* 179 lysosomale Proteine. Durch den Einsatz des Gelsystems nach Laemmli (1970) wurden Proteine unterhalb von 20 kDa nur unzureichend separiert. Eine Verwendung des Gelsystems nach Schagger und von Jagow (1987) sollte zur Auftrennung und Identifikation des niedermolekularen Bereichs zwischen 5 und 20 kDa führen. Dabei sollten neben dem Beweis der Existenz von Apls und Lysozymen auch Aussagen über die Prozessierung und die zelluläre Lokalisation getroffen werden. Zur Identifikation der Proteine wurde die Massenspektrometrie eingesetzt.

Dictyostelium-Zellen wurde mit Latex-Beads inkubiert und die Phagozytose nach 45 min Inkubationszeit gestoppt. Die Zellen wurden vorsichtig in einem EMBL-Kugel-Homogenisator aufgeschlossen, um eine Zelllysate mit intakten Organellen zu erhalten. Das Lysat wurde auf einen Saccharosegradienten geladen und anhand der Dichte aufgetrennt. Die gereinigten und intakten Phagolysosomen befanden sich nach der Zentrifugation zwischen der 10 % und der 25 % Saccharoseschicht (**Abb. 11**). Sie wurden abgenommen, in ASB-C8Ø Lysispuffer lysiert und die enthaltenen Proteine auf einem 2D-Gel aufgetrennt (**Abb. 12, Abb. 13**).

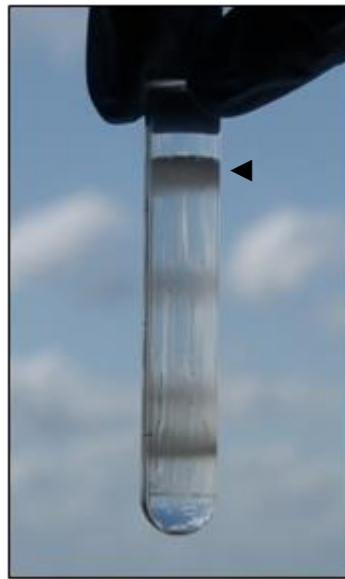


Abb. 11: Phagosomenpräparation nach Dichtegradientenzentrifugation. Die gereinigten Phagosomen (◄) befanden sich zwischen der 10 % und der 25 % Saccharoseschicht.

Der Proteingehalt des Extraktes wurde mit dem 2D-Quant-Kit bestimmt. 500 µg Protein wurden auf dem pH-Gradienten pH 3 – 10 NL (**Abb. 12**) und 250 µg Protein auf dem pH-Gradienten 3 – 5,6 NL (**Abb. 13**) aufgetrennt. Die entstandenen Proteinpunkte wurden massenspektrometrisch analysiert.

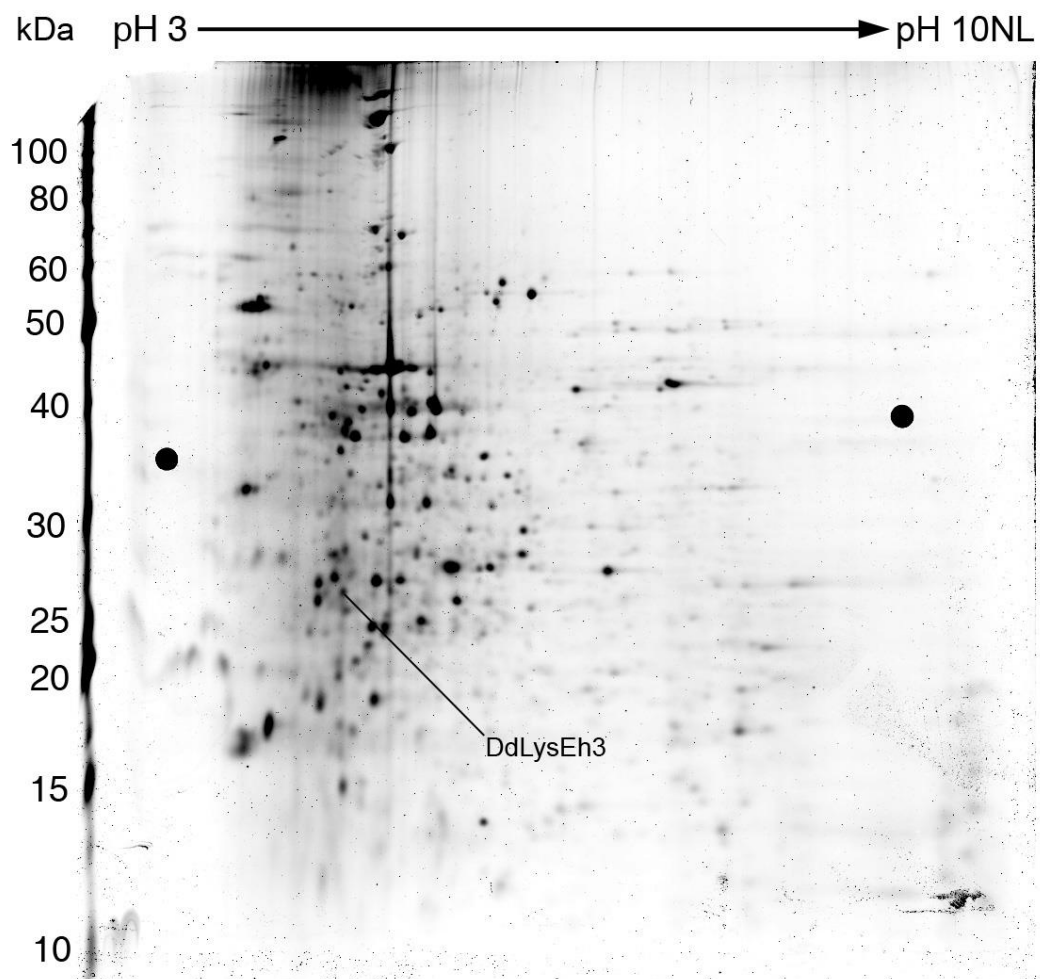


Abb. 12: 2D-PAGE der Proteine aus der Phagosomenpräparation mit dem pH-Gradienten 3 – 10 NL. Das Gel wurde mit FlamingoPink gefärbt. Es wurden 500 µg Protein aus Phagosomen aufgetrennt. Die Eichproteine sind links im Gel dargestellt. Der Proteinpunkt, der als DdLysEh3 identifiziert wurde, ist angezeigt.

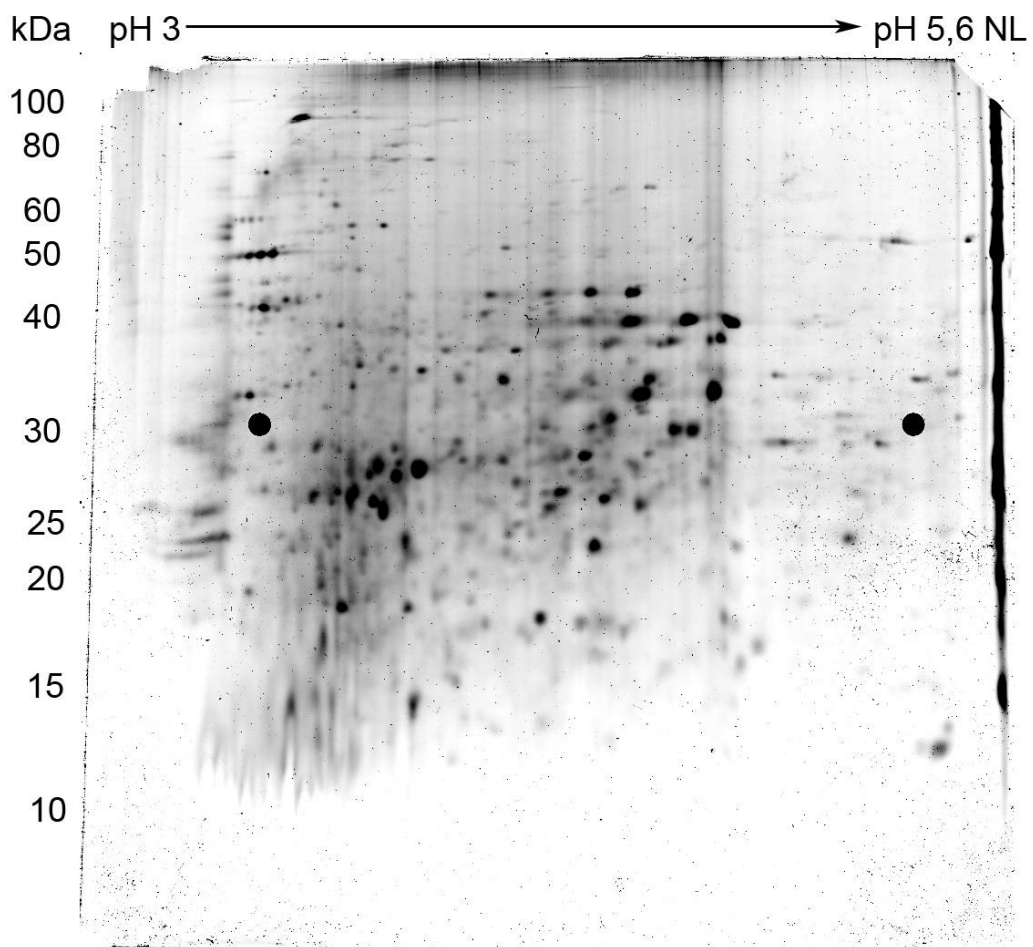


Abb. 13: 2D-PAGE der Proteine aus der Phagosomenpräparation mit dem pH-Gradienten 3 – 5,6 NL. Das Gel wurde mit FlamingoPink gefärbt. Es wurden 250 µg Protein aus Phagosomen aufgetrennt. Die Eichproteine sind links im Gel dargestellt.

Die Analyse der massenspektrometrischen Daten der 2D-Gele mit den pH-Gradienten 3 – 10 NL und 3 – 5,6 NL führte zur Identifikation von 71 Proteinen. 63 Proteine wurden anhand von *gene ontology*-Modellen (*GO terms*) der Datenbank *Dictybase.org* einem spezifischen Kompartiment zugeordnet (**Abb. 14**). Für die Zuordnung wurden sowohl Ergebnisse aus vorausgegangenen Publikationen als auch Vorhersagemodelle anhand von Sequenzähnlichkeiten der entsprechenden Proteine verwendet.

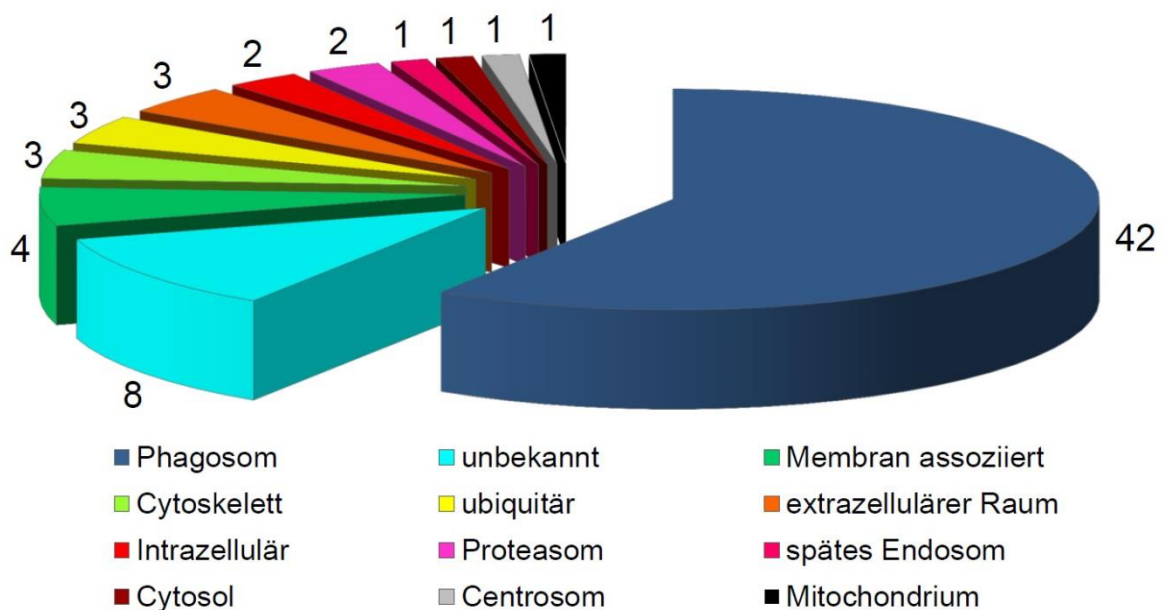


Abb. 14: Kompartimentzuordnung der identifizierten Proteine. Nach der Phagosomenpräparation und der massenspektrometrischen Analyse wurden 71 unterschiedliche Proteine identifiziert. Die Zuordnung erfolgte anhand der Annotationen in der Datenbank *Dictybase.org*.

Die Resultate der proteomischen Phagolysosomenanalyse wurden mit den Ergebnissen der Analysen von Gotthardt *et al.* (2006) und Dieckmann *et al.* (2012) verglichen, die ebenfalls die Proteinzusammensetzung der Phagolysosomen untersucht hatten. Die Daten wurden mit der Veröffentlichung von Journet *et al.* (2012), die das Proteom von Makropinosomen in *D. discoideum* analysiert hatten, abgeglichen. Jedes der 71 Proteine konnte in einer der drei Veröffentlichungen wiedergefunden werden, daher wurde davon ausgegangen, dass die Methode zur Präparation der Phagolysosomen in *D. discoideum* erfolgreich durchgeführt worden war. Eine vollständige Liste aller identifizierten Proteine befindet sich im Anhang dieser Arbeit (**Tab. 19**).

Die Analyse der Proteine führte nicht zu einer Identifikation von Apls, allerdings wurde das bis dahin nicht annotierte Lysozym DdLysEh3 (*Entamoeba histolytica*-Typ) identifiziert (**Abb. 12**).

Die Ergebnisse der massenspektrometrischen Analysen werden in dem weiteren Verlauf der Arbeit in Tabellenform angegeben und nach folgendem Schema dargestellt:

Zuerst wird die unter *Dictybase.org* geführte alte (DDB) und neue (DDB_G) Zugangsnummer des Gens sowie die Position des Gens im Genom der Amöbe angegeben.

Anschließend wird die voraussichtliche Aminosäuresequenz des kompletten Proteins angezeigt, wobei die identifizierten Peptide in **rot** dargestellt sind. Bei identifizierten Apls ist die voraussichtliche Sequenz des maturen Apls mit jeweils einer SAPLIP-Domäne **fett** und unterstrichen markiert.

In der Tabelle werden die Zugangsnummer des identifizierten Proteins, das Molekulargewicht der kompletten Aminosäuresequenz in Dalton, der Gesamt-Protein-Score und die Anzahl der identifizierten Fragmente angegeben. Des Weiteren ist die aufgezeichnete, erwartete und berechnete Masse des identifizierten Fragments in Dalton, der jeweilige Protein-Score und die Aminosäuresequenz des identifizierten Fragments angegeben, wobei die N-terminale Trypsinschnittstelle (Arginin oder Lysin) in Klammern dargestellt ist. In der letzten Zeile der Tabelle werden der zugeordnete Name des Proteins und die Sequenzabdeckung angezeigt.

Die Identifikation von DdLysEh3 zeigte folgende Ergebnisse:

Tab. 6: Identifikation von DdLysEh3

```
>DDB0252581|DDB_G0293566 |Protein|gene: DDB_G0293566 on chromosome: 6
position 3051866 to 3052770
```

```
MRFIISLLFVFTLIFNLAFFSHIGIDVSSGTNESGFECFKQKKYSRAIIRCYESIGSIDTNCKPSIENAKKAGIET
IDVYLFPCYDCGNPENQVTTTSHYLDYLDKDLDFLWLDIEGPGQYWSGSYDNNKKFIQGLLDSAKTAGFKHVGIIY
TSESQWPGIVGSWDGGKDYPIWYANYDGAENFNDFSPFNGWTKPHMKQYAGNINECGLGIDKNYWE
```

DDB_G0293566		Masse: 24891 Da	Score: 53	Treffer: 1
Massen in Da				
aufgezeichnet	erwartet	berechnet	Score	Fragment
1091.6069	1090.5996	1090.6022	53	(K) FIQGLLDSAK
Protein: DdLysEh3 (Sequenzabdeckung: 4,7 %)				

Bereits in meiner Diplomarbeit wurden die Lysozyme DdLysEh1 und DdLysEh2 identifiziert. Ein Sequenzvergleich verdeutlicht die Ähnlichkeit der Primärstrukturen der drei Lysozyme. Die Berechnungen ergaben eine Sequenzidentität von 36,7 % und eine Sequenzähnlichkeit von 55,6 % zwischen diesen drei Lysozymen (**Abb. 15**).

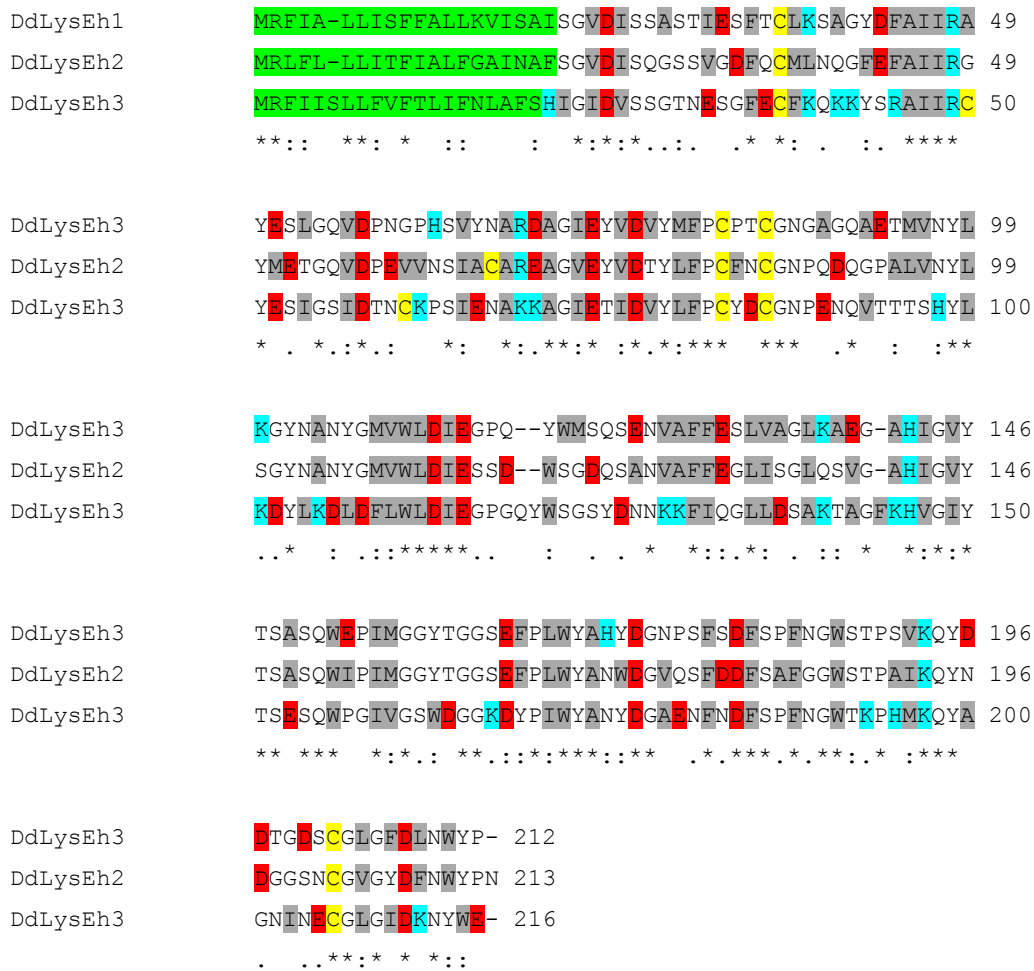


Abb. 15: Sequenzvergleich der Primärstrukturen der Vorläuferproteine von den zwei bereits bekannten *Eh-like*-Lysozymen aus *D. discoideum* und dem neu identifizierten Lysozym DdLysEh3 (DDB0252581) inklusive der Signalpeptide. Legende: * = identischer Aminosäurerest in allen Proteinen; : = konservierter Austausch; . = semi-konservierter Austausch. **Grau** entspricht hydrophoben Aminosäureresten, **blau** entspricht kationischen Aminosäureresten, **rot** entspricht anionischen Aminosäureresten, **gelb** entspricht Cysteinresten. Das Signalpeptid ist **grün** unterlegt.

4.1.2 Proteomische Analyse von axenischen *Dictyostelium*-Zellen

In Kooperation mit M. Sc. Stephan Philipp, Dr. Christoph Gelhaus und Mitarbeitern der AG Tholey wurde ein Zellextrakt aus axenisch kultivierten *Dictyostelium discoideum* massenspektrometrisch analysiert. Die Zellen wurden dreimal mit Sörensen-Phosphat-Puffer gewaschen und in Extraktionspuffer (50 mM Tris, 3 M Urea, 3 % SDS, 1 % Chaps, pH 6,8) aufgenommen. Die Proteinkonzentration wurde mit einem BCA-Test bestimmt. 50 µg Protein wurden auf einem eindimensionalen 13 %igen Tricin-SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetrennt, gefärbt und die entstandenen Banden in dem Bereich zwischen ~1 und ~20 kDa mit einem Skalpell ausgeschnitten (markiert durch die roten Kästen 14 - 27) (Abb. 16).

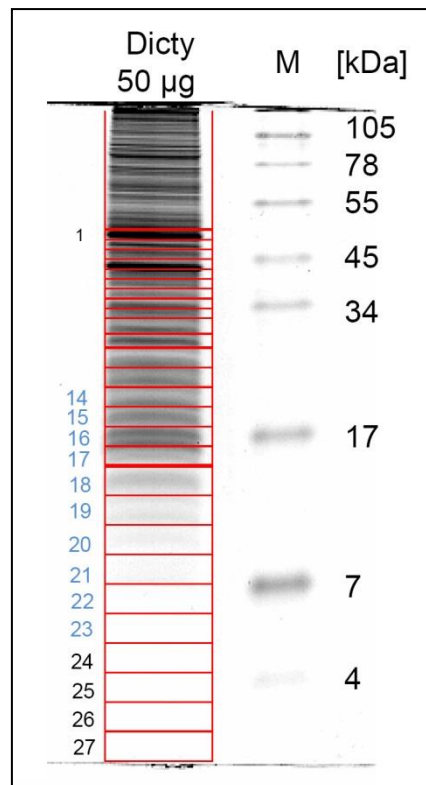


Abb. 16: Polyacrylamidgel eines Proteinextrakts von *Dictyostelium discoideum*. Es wurden 50 µg Protein eingesetzt. Das Gel wurde mit FlamingoPink gefärbt, in Stücke geschnitten und die Gelstücke 14 – 27 für die Massenspektrometrie vorbereitet. Die Eichproteine sind rechts im Gel dargestellt.

Die Proteine in den Gelstücken 14 - 27 wurden trypsinisiert und die Peptide mittels LC-MS analysiert. Für die Datenbankanalyse wurde eine selbst zusammengestellte Datenbank verwendet, die neben allen annotierten und bei NCBI gelisteten Einträgen für *Dictyostelium* auch alle Apls und deren voraussichtliche Spaltprodukte mit den einzelnen SAPLIP-Domänen sowie alle potenziell vorhandenen Lysozyme enthielt.

Folgende Proteine wurden in dem Proteinextrakt axenischer Zellen identifiziert:

Gelstück 14:

Tab. 7: Identifikation von DdLysEh1

>DDB0252580|DDB_G0274181 |Protein|gene: DDB_G0274181 on chromosome: 2 position 4831162 to 4832097

MRFIALLISFFALLKVISASISGVDISSASTIESFTCLKSAGYDFAIIRAYESLGQVDPNGPHSVYNARDAGIEYV
DVYMFPCPTCGNGAGQAETMVNYLKGYNANYGMVWLDIEGPQYWMSQSENVAFFESLVAGLKAEGAHIQVYTSAS
QWEPIMGGYTGGSEFPLWYAHYDGNPSFSDSPFNWSTPSVKQYDDTGDSCGLGFDLNWYP

DDB_G0274181		Masse: 23187 Da	Score: 156	Treffer: 2
Massen in Da				
aufgezeichnet	erwartet	berechnet	Score	Fragment
1112.5757	1111.5684	1111.5662	90	(K) SAGYDFAIIR
2174.0298	2173.0225	2173.0188	80	(R) AYESLGQVDPNG PHSVYNAR
Protein: DdLysEh1 (Sequenzabdeckung: 14,2 %)				

Tab. 8: Identifikation von DdLysEh2

>DDB0252576|DDB_G0293492 |Protein|gene: DDB_G0293492 on chromosome: 6 position 2951996 to 2953178

MRLFLLLITFIALFGAINAFSGVDISQSSVGDVFCMLNQGFEFAIIRGYMETGQVDPEVVNSIACAREAGVEYV
DTYLFPCFNCGNPDQGPALVNYLSGYNANYGMVWLDIESSDWSGDQSANVAFFEGLISGLQSVGAHIQVYTSAS
QWIPIMGGYTGGSEFPLWYANWDGVQSFDDFSAFGGWSTPAIKQYNDGGSNCGVGYDFNWYPN

DDB_G0293492		Masse: 23164 Da	Score: 101	Treffer: 2
Massen in Da				
aufgezeichnet	erwartet	berechnet	Score	Fragment
2212.0002	2210.9930	2210.9936	64	(R) GYMETGQVDPEV VNSIACAR
2226.0220	2225.0147	2225.0093	50	(R) GYMETGQVDPEV VNSIACAR
Protein: DdLysEh2 (Sequenzabdeckung: 9,4 %)				

Gelstück 20 und 21:

Tab. 9: Identifikation von Apl B2

>DDB0233715|DDB_G0286651 |Protein|gene: aplB on chromosome: 4 position 4791776 to 4792931

MCVMKFLIVLILALFALSSVNASSAIECELCEYAANYGELLIQSNATETETIIDKVENFCKVIPSSFQATCDSLIA
 NYGKQLIQMIVNKESPSTLCAQIDMCASSTEAVQGILECDICQFIVKQVNKYISGNATEAQILKFLDTDCEVFGK
GGSVTCQNIIVNNYAPQIINLIINNASPSQVCGLVGLCGSSSLKIEEPVQGELECGVCEVIAQQCSNYIKANKTESE
 IVGLLDQFCSTLSIFESACDTIVASSAPKIINLLLQNSATVVCTEIGFCGNSSSGNNHSSSEESSSSSQPSS
 SESSESSYSGSMTGASSGSASGSGSGTSGNMKIYIK

DDB_G0286651		Masse: 8360 Da	Score: 114	Treffer: 2
Massen in Da				
aufgezeichnet	erwartet	berechnet	Score	Fragment
1330.5942	1329.5870	1329.5911	71	(K) FLDTDCEVFGK
1594.8008	1593.7935	1593.7895	56	GILECDICQFIVK
Protein: Apl B2 (Sequenzabdeckung: 30,8 %)				

Es wurden die beiden *Entamoeba histolytica*-Typ Lysozyme DdLysEh1 und DdLysEh2 in Bande 14 identifiziert. Zusätzlich wurde Apl B2 mit Hilfe der modifizierten Datenbank inklusive der Spaltprodukte der Präproteine in den Banden 20 und 21 nachgewiesen. Die vorhergesagte Proteinmasse von 8365 Da stimmt mit der tatsächlich im SDS-Gel gefundenen Proteingröße von ~8 kDa (**Abb. 16**) überein. Des Weiteren wurde der vorausgesagte N-Terminus von vier Aminosäureresten vor dem ersten Cystein bestätigt. Die Ergebnisse ließen darauf schließen, dass aus einem größeren Vorläuferprotein Apl B die einzelnen SAPLIP-Domänen bzw. zumindest das Protein Apl B2 herausgeschnitten wurden.

4.1.3 Proteomische Analyse von *Dictyostelium-slugs*

Da die Ergebnisse aus der Dissertation von M. Sc. Ranjani Dhakshinamoorthy (Dhakshinamoorthy, 2012) zeigten, dass die Transkripte von *ap1D* besonders in den mehrzelligen, wandernden Stadien, den sogenannten *slugs*, zu finden waren, wurden auch *Dictyostelium-slugs* für die Proteomanalyse vorbereitet. Es wurden axenisch kultivierte *Dictyostelium*-Zellen in einem nährstoffarmen Entwicklungspuffer

aufgenommen und im Dunkeln mit einer schwachen punktuellen Lichtquelle auf Phosphatagar ausplattiert. Der Entwicklungszyklus wurde eingeleitet und die phototaktisch aktiven *slugs* wanderten zum Licht hin (**Abb. 17 A**). Nach 24 h wurden die *slugs* geerntet, die Proteine extrahiert, über SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie angefärbt (**Abb. 17 B**). Die Analyse der Gelstücke 1 – 4 erfolgte über NanoHPLC-ESI-MS/MS (Flüssigchromatographie gekoppelt mit Massenspektrometrie) und wurde in der AG Tholey durchgeführt. Die massenspektrometrische Analyse der über RP-Chromatographie separierten Peptide wurde von Dr. Thorsten Overath übernommen. Die für die Proteinidentifizierung verwendete Datenbank wurde über www.uniprot.org bezogen. Es wurden alle Proteinsequenz-Einträge (Swissprot) der *protein knowledgebase* (UniProtKB) für die Taxonomie *Dictyostelium discoideum* (*reviewed*) verwendet plus 47 Einträge aus einer selbst zusammengestellten Datenbank aller Apls und Lysozyme. Insgesamt hatte die Datenbank 4128 Einträge.

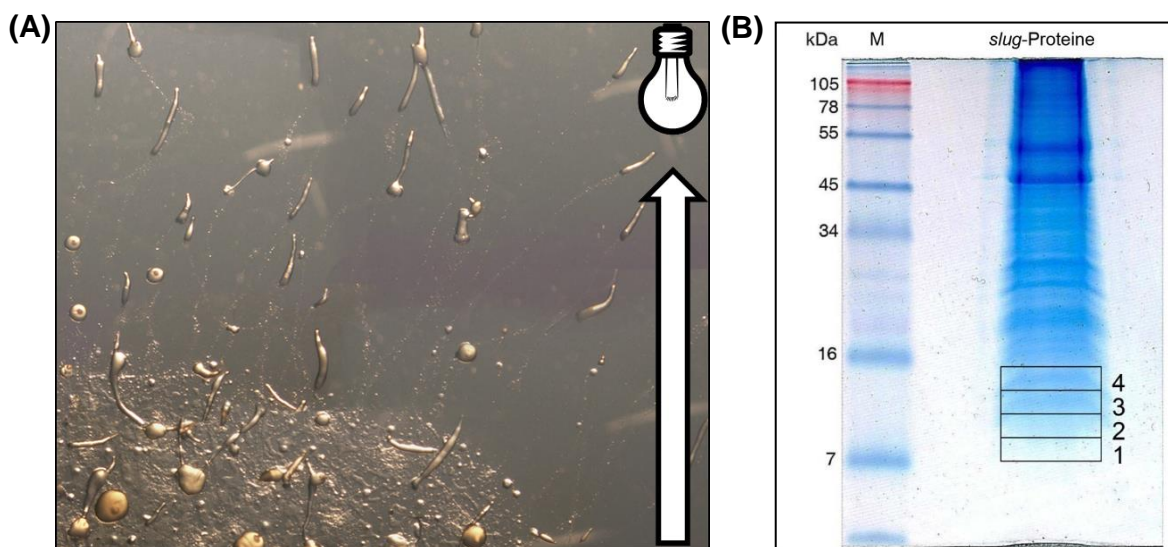


Abb. 17: Anreicherung von *slugs* für Proteomics. (A) *Dictyostelium*-Zellen wurden auf Phosphat-Agar ausplattiert und in einer dunklen Box mit einer Lichtquelle auf der gegenüberliegenden Seite inkubiert. Die phototaktisch aktiven *slugs* wanderten auf die Lichtquelle zu und wurden von den restlichen Zellen getrennt. (B) Die Proteine der *slugs* wurden extrahiert und die Proteinmenge mittels BCA-Test bestimmt. Nach der Auftrennung der *slug*-Proteine wurden die Gelstücke 1 – 4 massenspektrometrisch analysiert. Die Eichproteine sind links im Gel dargestellt.

Die Analyse des Proteinextrakts der phototaktisch aktiven *slugs* führte zur erstmaligen Identifikation von natürlichem Apl D in *D. discoideum*. Es wurden ebenfalls die potenziellen Effektorproteine Apl E1 und E2 sowie das Amöbenlysozym Aly C identifiziert. In der ersten Spalte der Tabelle ist angegeben, in welchem Gelstück das jeweilige Fragment gefunden wurde.

Gelstück 1, 3 und 4

Tab. 10: Identifikation von Apl D

>DDB0216216|DDB_G0293010 |Protein|gene: aplD on chromosome: 6 position
2590611 to 2591140

MYKINIYLLIFTIILASLFATSKSLVVQKNVGEIDNNQCQICELLVKDIIIEGLTANQSVEVIEHGLNLICDHIPL
HVRVCKQFVDSNFKIVQFIENHDDPQEICEKCGVCGSSDEYNKIDTRYFPQHNQHKRHLKQNSIKN*

DDB_G0293010		Masse: 16498 Da	Treffer: 5	
Massen in Da				
Gelstück	aufgezeichnet	m/z x Ladung	Abweichung [ppm]	Fragment
4	1057,4979	2113,9886	1,26	(K) IVQFIENHDDPQ EICEK
1	750,3714	1499,7356	2,97	(R) VCKQFVDSNFKQK
3	556,7728	1112,5385	1,22	(K) QFVDSNFKQK
1	556,7730	1112,5387	1,44	(K) QFVDSNFKQK
4	556,7725	1112,5378	0,67	(K) QFVDSNFKQK
Protein: Apl D (Sequenzabdeckung: 42,5 %)				

Gelstück 1, 2, 3 und 4

Tab. 11: Identifikation von Apl E1 und Apl E2

>DDB0306922|DDB_G0279705 |Protein|gene: aplE on chromosome: 3 position
2469013 to 2469762

MFRFLFVIIIVILIAISGNSIVSSNEVAQCDCVNYLVTMVEVFVEQNRSETYISNSLEKVCEIIPREDYKSTCRS
IVLAYTKDIIQLIINREPSEKICQEIKACPIPTSPSPSPKQVKPKRNEDDALQCTICKLVATKLEEYIQSNKTIE
EIENELDDFCKIAFEKDPTQCGFVQOYVPMILSFIKSKEDPTQACIKLKFCTSSRVTKAILSHHVLINKNY*

DDB_G0279705		Masse: 25215 Da	Treffer: 7	
Massen in Da				
Gelstück	aufgezeichnet	m/z x Ladung	Abweichung [ppm]	Fragment
2	877,8939	1754,7806	0,93	(K) TIEEIENELDDF CK
3	877,8933	1754,7793	0,19	(K) TIEEIENELDDF CK

2	638,8157	1276,6242	3,11	(K) SKEDPTQACIK
1	638,8153	1276,6234	2,49	(K) SKEDPTQACIK
3	638,8156	1276,6240	3,00	(K) SKEDPTQACIK
4	443,7443	886,4814	-0,13	(K) VCEIIPR
4	447,7685	894,5298	0,35	(R) SIVLAYTK
Protein: Apl E1 (Sequenzabdeckung:18,8 %) und E2 (Sequenzabdeckung:31,7 %)				

Gelstück 3 und 4

Tab. 12: Identifikation von AlyC

>DDB0231279|DDB_G0275121 |Protein|gene: alyC on chromosome: 2 position 5004280 to 5005342

MRIAFFLLILSIIVGLAYGYSCPCKPCYGNMCCSTSPDHKYYLTDFCGSTSACGPKPSCSGK**LYFTADSQR**FGCGK
HLNLCRGKKCVKAKVYDAGPAEWVEKDAGKMIIDASPTICHELTGGSSCGWSDKFEITATVTSLTDSRPLGPFNV
 TEEEMDQLFIDHEIAMAQCEAEKTCNGFDLE*

DDB_G0275121		Masse: 19751 Da		Treffer: 3
Massen in Da				
Gelstück	aufgezeichnet	m/z x Ladung	Abweichung [ppm]	Fragment
4	550,7724	1100,5376	0,47	(K) LYFTADSQR
3	406,7140	812,4207	1,44	(K) HLNLCR
4	406,7143	812,4213	2,19	(K) HLNLCR
Protein: AlyC (Sequenzabdeckung: 8,3 %)				

4.1.4 Zusammenfassung der Ergebnisse der proteomischen Analysen

Die 17 *apl*-Gene kodieren potenziell für 33 einzelne Apls, die dann jeweils eine einzelne SAPLIP-Domäne tragen würden. In verschiedenen proteomischen Analysen wurden bislang 15 Apls als Protein identifiziert. In der Veröffentlichung von Journet *et al.* (2012) wurden nach der hier benutzten Nomenklatur die Apls A2 und A3, B1 und B2, Apl G, Apl H1 und H2 sowie die Apls M3, N1 und N2 in Makropinosomen nachgewiesen. Boulais *et al.* (2010) identifizierte die Apls A3 und A5, B1 und B2, Apl G, Apl H2 und die Apls N1 und N2 in Phagolysosomen. Des Weiteren wurde in der Veröffentlichung von Bakthavatsalam und Gomer (2010) Apl B3 im Sekretom von *Dictyostelium*-Zellen gefunden. Es wurden damit von 33 möglichen Apls 15 als Protein in *Dictyostelium* identifiziert (**Abb. 18**). In dieser Arbeit wurden Apl B2, Apl D und Apl E1 und E2 nachgewiesen, wobei dies für die letzten drei eine erstmalige proteomische Identifikation bedeutete.

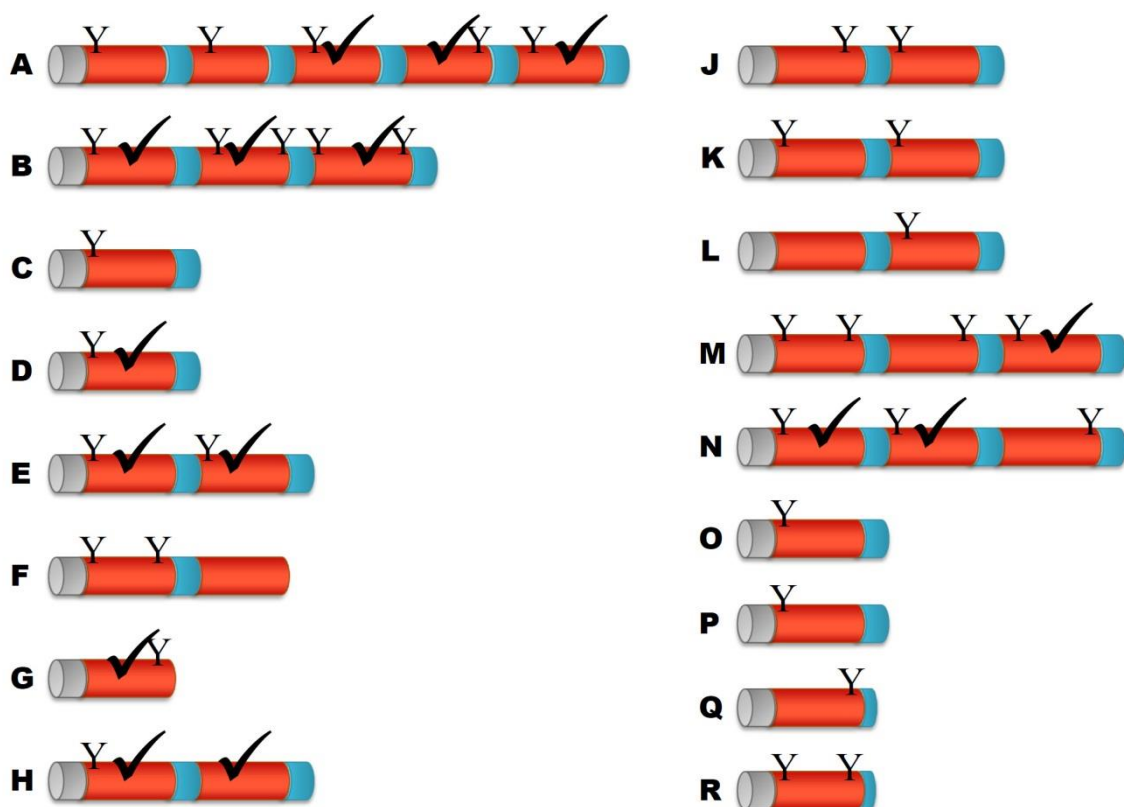


Abb. 18: Proteomisch nachgewiesene Apls in *Dictyostelium discoideum*. Von 33 potenziellen SAPLIPs wurden 15 Apls auf Proteinebene identifiziert (mit ✓ markiert). Y = potenzielle N-Glykosylierung, grau = Signalpeptid (Bendtsen *et al.*, 2004), rot = SAPLIP-Domäne, blau = potenzielle Linker- oder Endregion (Abbildung verändert nach Prof. Dr. Matthias Leippe und Dr. Rosa Herbst, unpubliziert).

4.2 Reinigung und rekombinante Expression ausgewählter Apls

4.2.1 Reinigung antimikrobieller Effektormoleküle aus *D. discoideum*

Für die Analyse des Wirkspektrums und Wirkmechanismus der potenziell antimikrobiellen Proteine sollten abundante Vertreter der Apls und Lysozyme aus natürlichen Proteinextrakten von axenisch gewachsenen *D. discoideum* gereinigt werden. Die Analyse der vorhergesagten Aminosäuresequenzen zeigte, dass die Apls ein molekulares Gewicht zwischen 8 und 9 kDa und mindestens sechs Cysteinreste in ihrer Aminosäurezusammensetzung hatten. Der theoretische isoelektrische Punkt der Apls lag mit wenigen Ausnahmen zwischen pI 4 und pI 5 (**Tab. 1**). Die Proteine sollten also entsprechend stabil und widerstandsfähig gegenüber einem niedrigen pH sein. Gleiches galt für die in *Dictyostelium* vertretenen Lysozyme, die ebenfalls eine hohe Anzahl an Cysteinresten aufwiesen und so mit 10 %iger Essigsäure extrahiert werden könnten. Es wurde daher versucht, die Proteine mit Essigsäure oder einem sauren Extraktionsmedium (1 M HCl, 5 % Ameisensäure, 1 % TFA, 1 % NaCl) zu isolieren. Dabei sollten alle instabilen Proteine präzipitieren und nur die kleinen und stabilen Proteine und Peptide in Lösung bleiben. Nachfolgend wurde der Proteinextrakt über Umkehrphasenchromatographie aufgetrennt und über Polyacrylamid-Gelelektrophorese analysiert.

Des Weiteren wurde versucht, die Proteine über einen von Prof. Pierre Cosson in Genf etablierten Sekretions-Assay zu reinigen. Dabei wurden die Zellen durch osmotischen Stress dazu gebracht, den Inhalt der Lysosomen ins Medium zu sezernieren (Froquet *et al.*, 2008). Die Zellen wurden anschließend sedimentiert und die Proteine im Überstand über eine Anionenaustausch-Chromatographie angereichert und separiert.

Keiner der Ansätze führte zur Identifikation eines Lysozyms oder Apls. Deshalb wurde entschieden, ausgewählte Vertreter der Apls rekombinant zu exprimieren.

4.2.2 Rekombinante Expression von Apls

4.2.2.1 Herstellung der Genkonstrukte

Für die rekombinante Expression von ausgewählten Apls aus *D. discoideum* wurden bei der Firma GeneArt (Regensburg) DNA-Konstrukte für die Herstellung von rApl B2, rApl B3, rApl C und rApl D bestellt, die jeweils über eine SAPLIP-Domäne verfügten. Die

Synthese der Proteine sollte in einem prokaryotischen System stattfinden, daher wurde die Nukleotidsequenz der Konstrukte für eine Expression in *E. coli* optimiert. Um die Gene in verschiedene Vektoren einzubringen, wurden am 5'-Ende des Konstrukts die Restriktionsschnittstellen KpnI und NdeI und am 3'-Ende die Schnittstellen XhoI und SacI angefügt (**Abb. 19**). Zusätzlich wurde zwischen die Schnittstelle NdeI und dem jeweiligen Apl-Gen die Nukleotidsequenz für die TEV-Proteaseschnittstelle (ENLYFQG) eingefügt, wobei die Protease zwischen dem Glutaminrest (Q) und dem Glycinrest (G) schneiden sollte. Dadurch würde am N-Terminus des geschnittenen Proteins ein Glycinrest stehenbleiben. Die antimikrobiellen Peptide *Amoebapore* A und B (Leippe, 1997), *Disparpore* A und B (Nickel *et al.*, 1999), NK-Lysin (Andersson, Gunne, *et al.*, 1995) und Granulysin (Peña und Krensky, 1997) beginnen übrigens ebenfalls mit einem Glycinrest am N-Terminus. Die TEV-Protease wurde als modifiziertes Enzym mit einer hohen Schnittstellenspezifität und einem Histidin/Glutamin(HQ)-Rest (Tropea *et al.*, 2009) bezogen. Durch den HQ-Rest würde die Protease bei einer Reinigung über eine Talon-Agarose-Säule zusammen mit dem abgeschnitten Histidin-Rest entfernt werden.

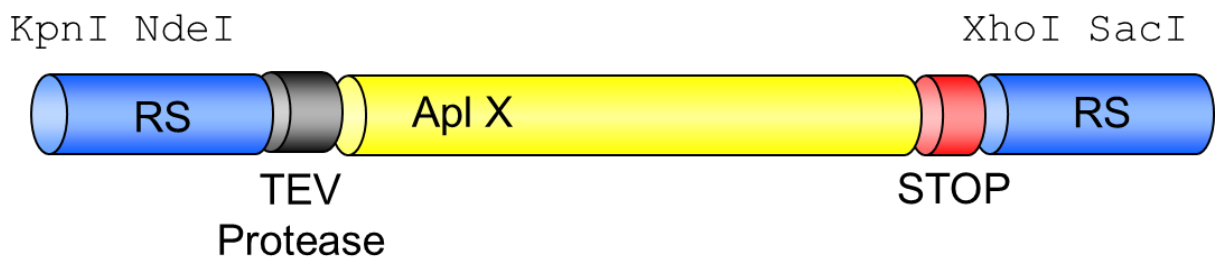


Abb. 19: Schematische Darstellung des Genkonstrukts für ein ausgewähltes Apl. Die kodierende Sequenz des Genes ist in **gelb**, das Stopkodon in **rot**, die Proteaseschnittstelle in **grau** und die Restriktionsschnittstellen (RS) sind in **blau** dargestellt. Das schematische Darstellung der einzelnen Bereiche ist nicht proportional.

Am N-Terminus der Proteine sind dem ersten Cysteinrest mindestens vier Aminosäureresten vorangestellt. Da im N-terminalen Bereich der SAPLIP-Domäne von Apl C kein Glycinrest vorhanden war, wurde statt der TEV-Proteaseschnittstelle die Nukleotidsequenz kodierend für die Schnittstelle der Protease Enterokinase (DDDDK) eingebracht (**Abb. 20**).

AplB2

ENLYFQ | GILECDI CQFIVKQVNKYISGNATEAQILKFLDTC EVFGKGGSVTC QNIVNNYAPQIINLIIN
 NASPSQVCGLVGLC StopStop

AplB3

ENLYFQ | GELECGVCEVIAQQCSNYIKANKTESEIVGLLDQFCSTLSIFESACDTIVASSAPKIINLLLQN
 QSATVVCTEIGFC StopStop

AplC

DDDDK | DDAECMLCNVIVDEAEAYVAQNFNSTEISSILSEN CQLLPSFQDVCIGIVDEYTPTIIKYIIAKE
 SPTTICEQINCC StopStop

AplD

ENLYFQ | GEIDNNQCQICELLVKDIEGLTANQSVEVIEHGLNLI CDHIPLHVRVC KQFVDSNFQKIVQFI
 ENHDDPQEICEKCGVC StopStop

Abb. 20: Aminosäuresequenzen der bei *GeneArt* hergestellten *Apl*-Konstrukte. Die Proteaseschnittstelle ist in grün, das Stopkodon in rot und die Cysteinreste in gelb hervorgehoben. | markiert die Schnittstelle der jeweiligen Protease.

4.2.2.2 Rekombinante Expression

Die rekombinante Expression wurde nach Standardbedingungen (siehe 3.2.13) durchgeführt und die *E. coli* C43-Bakterien wurden nach 6 h post Induktion geerntet. Die löslichen Proteine wurden in 1 x TBS pH 7,0 und die unlöslichen Proteine aus den Einschlusskörperchen in 1 x TBS pH 7,0 und 8 M Harnstoff aufgenommen. Der Extrakt der löslichen Proteine wurde auf eine Talon-Agarose-Säule gegeben und der Großteil der Bakterienproteine vom Fusionsprotein getrennt. Mittels Anionenaustausch-Chromatographie wurden mit einer Resource Q 1ml-Säule weitere Proteinkontaminationen entfernt. Das Fusionsprotein wurde mit der TEV-Protease geschnitten und der Histidin-Rest sowie die TEV-Protease über eine zweite IMAC entfernt. Weitere Proteinkontaminationen wurden über eine Anionenaustausch-Chromatographie mit einer Mini Q 4.6/50 PE-Säule beseitigt. Das gereinigte Protein wurde in einem weiteren Schritt gegen 10 mM Natriumphosphatpuffer pH 6,8 dialysiert. Mit diesem Protokoll wurden die rekombinanten Proteine rApl B2 und rApl D hergestellt (**Abb. 21**). Für rApl B2 wurde allerdings statt einer Mini Q 4.6/50 PE-Säule eine Vydac Protein C4-Säule für den letzten Reinigungsschritt verwendet. Die einzelnen Reinigungsschritte für rApl B2 sind im Anhang zu finden (**Abb. 38**, **Abb. 39**, **Abb. 40**, **Abb. 41**).

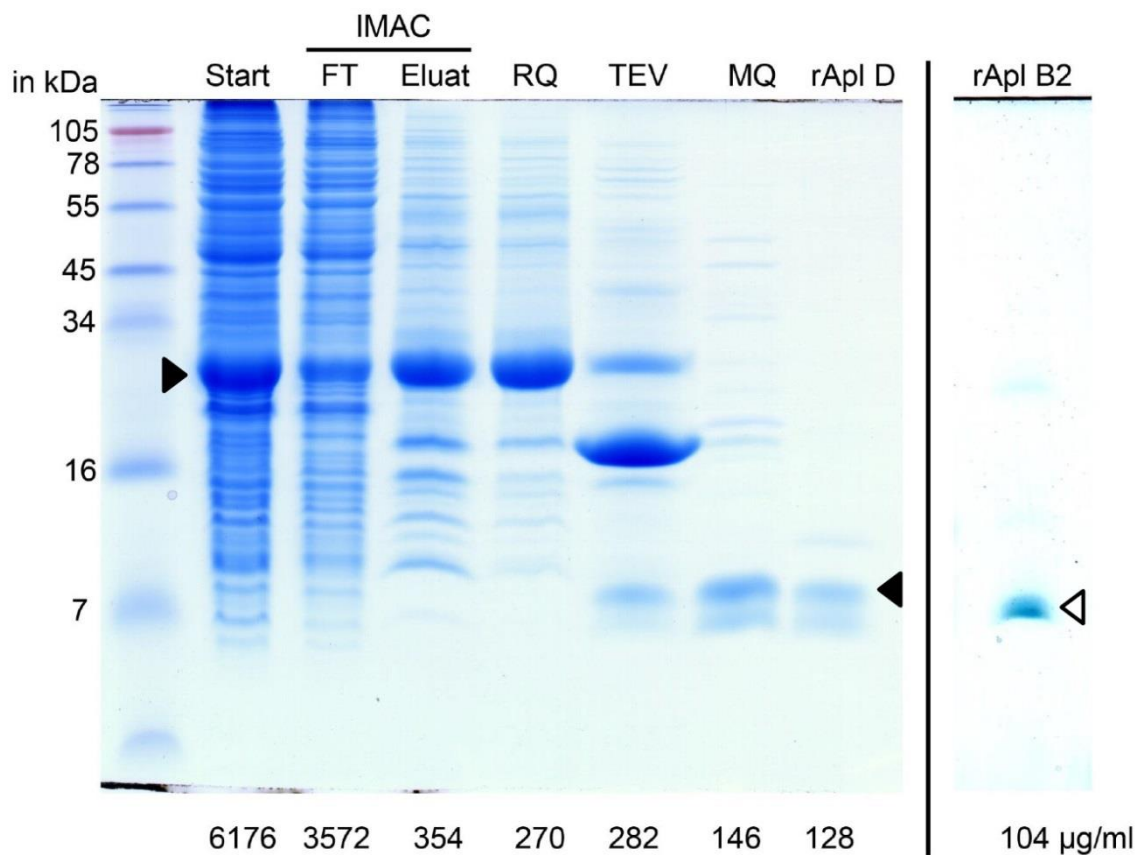


Abb. 21: Reinigung von rekombinant hergestelltem Apl D und Apl B2. Das Startmaterial (**Start**) wurde mittels Affinitätschromatographie in Bakterienproteine (**IMAC FT**) und Fusionsprotein (**►**) (**IMAC Eluat**) getrennt und über Anionenaustausch-Chromatographie weiter gereinigt (**RQ**). Das Fusionsprotein wurde proteolytisch in den Thioeredoxin/Histidin-Rest und das Zielprotein rApl D (**◄**) (**TEV**) und über eine Mini Q-Säule von Proteinkontaminationen getrennt (**MQ**). Das gereinigte Protein wurden gegen 10 mM Natriumphosphatpuffer pH 6,8 dialysiert (**rApl D**). Ebenso wurde rekombinantes rApl B2 (**rApl B2**) (**◄**) hergestellt. Der Proteingehalt der jeweiligen Probe ist unter dem Gel in µg/ml angegeben.

Das gereinigte rApl D war als Doppelbande im SDS-Gel zu erkennen. Beide Banden wurden aus dem Gel ausgestanzt und in der massenspektrometrischen Analyse als rApl D identifiziert. Die Sequenzabdeckung betrug 95,0 % (**Abb. 22**).

1 **GEIDNNQCQI** **CELLVKDIIE** **GLTANQSVEV** **IEHGLNLICD** **HIPLHVRVCK**
 51 **QFVDSNFQKI** **VQFIENHDDP** **QEICEKCGVC**

Abb. 22: Massenspektrometrisch identifizierte Proteinsequenz von rApl D. Identifizierte Peptide sind in **rot**, nicht identifizierte Peptide sind in **schwarz** dargestellt. Die Trypsinschnittstellen sind unterstrichen.

In jeweils 0,01 % TFA gelöste Proteine von rApl B2 und rApl D wurden Massenspektren mittels MALDI-TOF MS des jeweils geschnittenen und gereinigten Proteins von Dr. Christoph Gelhaus aufgenommen, um die tatsächliche molekulare Masse der beiden Proteine zu bestimmen. Dabei wurde die sogenannte *average mass* bestimmt. Die auf der Abszisse angezeigten Werte stellen die Masse m pro Ladung z dar. Da die Ladung gleich eins gesetzt werden kann, entsprechen die angegebenen Werte den Massen der einfach protonierten Proteine in Dalton.

Die Analyse von rApl B2 zeigte zwei Maxima bei 8635 m/z und 8800 m/z sowie ein schwächeres Signal bei 17425 m/z (**Abb. 23**). Die monoisotopische Masse von korrekt geschnittenem rApl B2 beträgt 8365 m/z mit vier Aminosäureresten vor dem ersten Cysteinrest. Die beiden ersten Maxima stellen rApl B2 mit den zusätzlichen Aminosäureresten Phenylalanin (F) und Glutamin (Q) (8635 m/z) sowie einem weiteren Tyrosinrest (Y) (8800,5 m/z) dar. Die TEV-Protease hat folglich nicht genau an der vorhergesagten Proteaseschnittstelle geschnitten, sondern zwei bzw. drei zusätzliche Aminosäurereste am N-Terminus belassen (**Abb. 20**).

Zu einem geringen Teil ist auch der abgeschnittene Teil des Fusionspartners bestehend aus Thioredoxin und dem 6xHistidin-Rest in der gereinigten Fraktion vorhanden (17428,0 m/z).

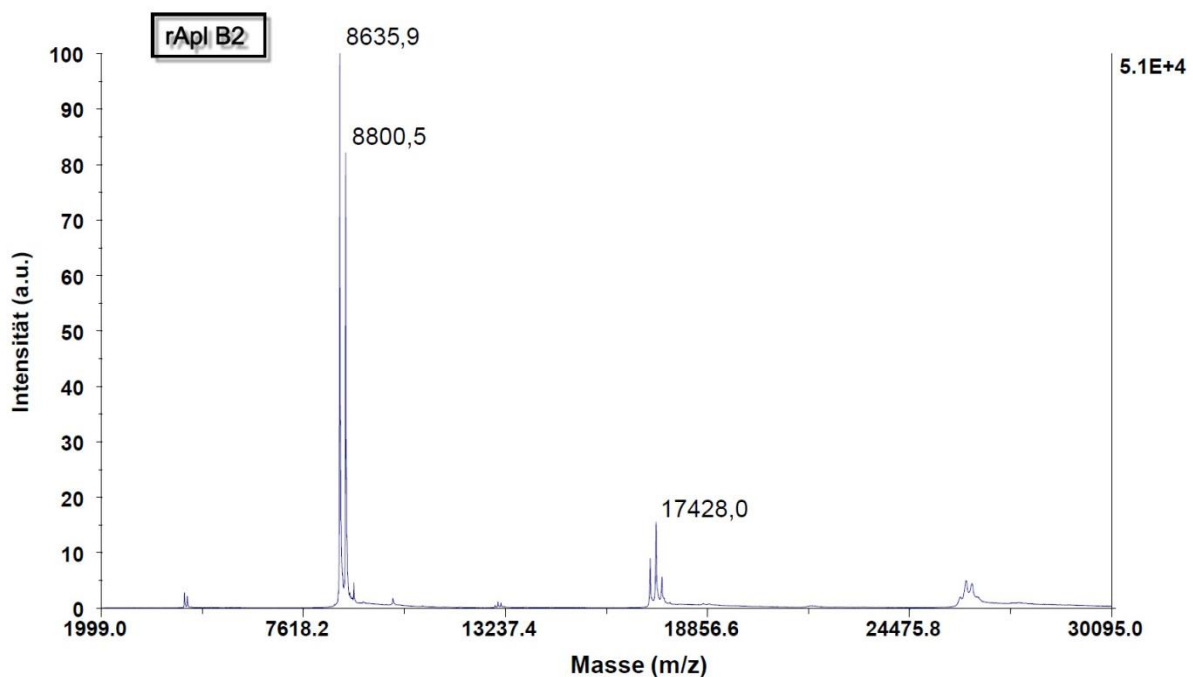


Abb. 23: Massenspektrum von gereinigtem rApl B2. Die Maxima stellen geschnittenes rApl B2 plus FQ (8635,9 m/z) bzw. rApl B2 plus YFQ (8800,5 m/z) dar. Der abgeschnittene Fusionspartner hat eine Masse von 17428,0 m/z .

Das Massenspektrum der Analyse von gereinigtem rApl D zeigte die Masse des korrekt geschnittenen Proteins mit einem Glycinrest als N-Terminus. Zu einem kleinen Teil lag das Protein als Dimer vor (18136 m/z).

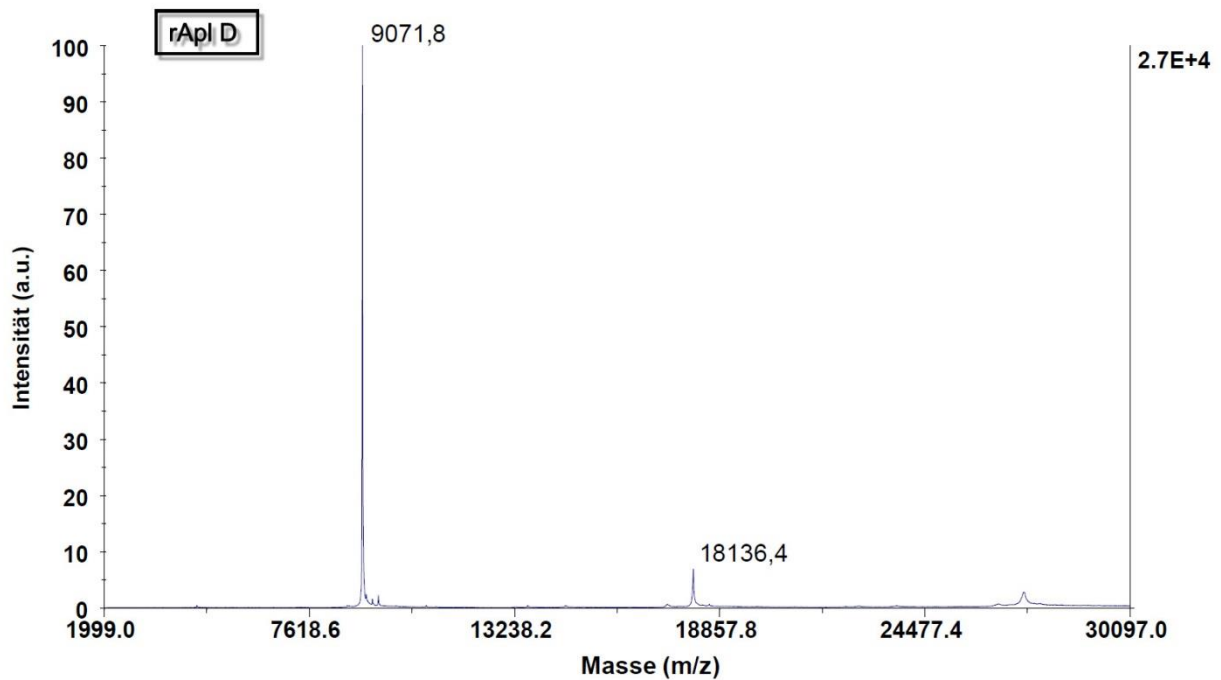


Abb. 24: Massenspektrum von gereinigtem rApl D. Die Massen stellen geschnittenes rApl D als Monomer (9071,8 m/z) und als Dimer (18136,4 m/z) dar.

4.2.2.3 Aminosäurezusammensetzung von rApl D und rApl B2

Die geschnittenen Proteine zeigten eine unterschiedliche Aminosäurezusammensetzung, wobei rApl D eine deutlich negativere Nettoladung verglichen mit rApl B2 besaß.

Tab. 13: Aminosäurezusammensetzung von rApl B2 und rApl D

	rApl B2		rApl D	
Anzahl der Aminosäurereste:	80		80	
Molekulargewicht:	8640,9 Da		9076,3 Da	
Theoretischer pI:	4,59		4,54	
Nettoladung bei pH 7,0:	- 2,3		- 8,3	
Aminosäurerest	Anzahl	Prozent	Anzahl	Prozent
Alanin (A)	4	5,0 %	1	1,2 %
Arginin (R)	0	0,0 %	1	1,2 %
Asparagin (N)	8	10,0 %	6	7,5 %
Aspartat (D)	3	3,8 %	6	7,5 %
Cystein (C)	6	7,5 %	7	8,8 %
Glutamin (Q)	7	8,8 %	7	8,8 %
Glutamat (E)	3	3,8 %	8	10,0 %
Glycin (G)	7	8,8 %	4	5,0 %
Histidin (H)	0	0,0 %	4	5,0 %
Isoleucin (I)	10	12,5 %	10	12,5 %
Leucin (L)	6	7,5 %	6	7,5 %
Lysin (K)	4	5,0 %	4	5,0 %
Methionin (M)	0	0,0 %	0	0,0 %
Phenylalanin (F)	4	5,0 %	3	3,8 %
Prolin (P)	2	2,5 %	2	2,5 %
Serin (S)	4	5,0 %	2	2,5 %
Threonin (T)	3	3,8 %	1	1,2 %
Tryptophan (W)	0	0,0 %	0	0,0 %
Tyrosin (Y)	2	2,5 %	0	0,0 %
Valin (V)	7	8,8 %	8	10,0 %
Aspartat + Glutamat:	7	8,8 %	14	17,5 %
Arginin + Lysin:	4	5,0 %	5	6,3 %

Unten hervorgehoben ist die Anzahl an negativ geladenen Aminosäuren Aspartat und Glutamat und an positiv geladenen Aminosäuren Arginin und Lysin. Die Prozentwerte wurden mit dem Programm *ProtParam* von *expasy.org* berechnet.

4.2.2.4 Faltung von rApl D

Die Sekundärstrukturelemente des gereinigten Proteins wurden von Dr. Matthias Michalek mittels Zirkulardichroismus-Spektroskopie (CD-Spektroskopie) in der AG „Strukturbiologie“ an der Universität Kiel untersucht. Das Protein hatte eine überwiegend α -helikale Faltung (**Abb. 25**), welche üblicherweise für SAPLIP-Domänen beobachtet wird (Leippe *et al.*, 1992; Andersson *et al.*, 1995; Michalek *et al.*, 2009).

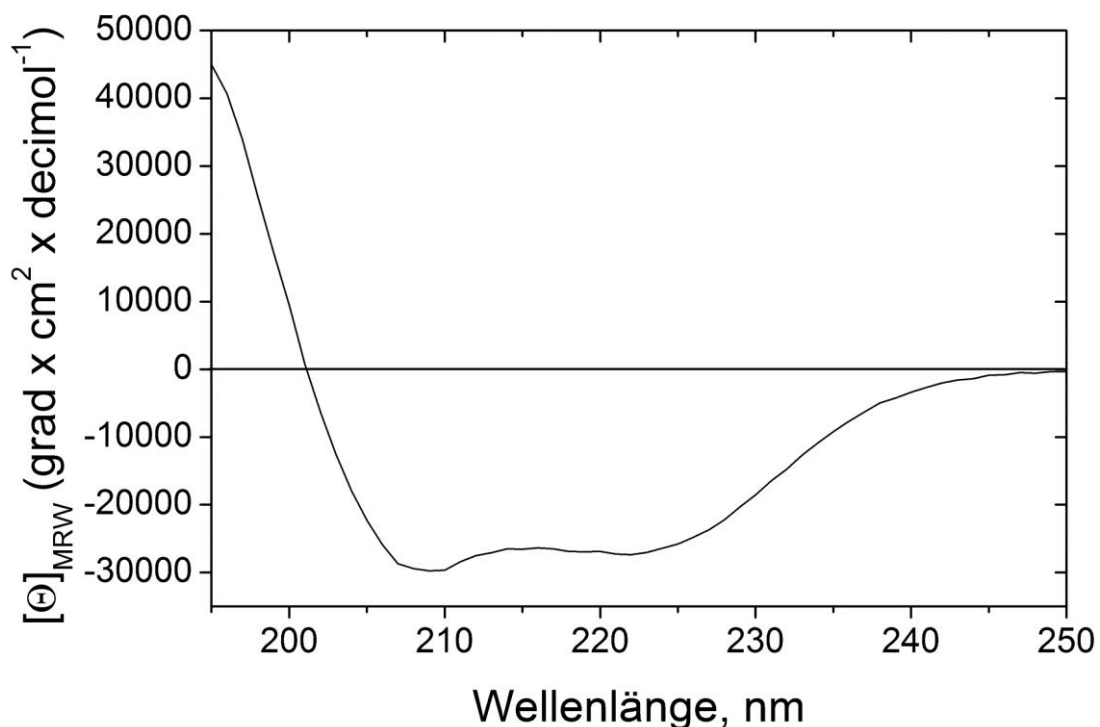


Abb. 25: CD-Spektrum von rekombinant hergestelltem Apl D. Die Abbildung zeigt ein charakteristisches Spektrum für ein α -helikal gefaltetes Protein mit den Absorptionsminima bei 208 und 222 nm. Das Spektrum wurde bei pH 6,8 und RT aufgenommen. Die Absorption des Puffers (10 mM Natriumphosphat) wurde vorher abgezogen.

Der Anteil α -helikal gefalteter Sekundärstrukturelemente im Protein wurde mit dem Programm CONTIN II (Provencher und Glöckner, 1981) berechnet. Dem zufolge besteht die Sekundärstruktur von rApl D zu 78,7 % aus α -Helices, zu 0,8 % aus β -Faltblattstrukturen, zu 3,2 % aus Schleifen und zu 17,4 % aus nicht definierten Bereichen.

4.2.2.5 Tertiärstruktur von rApl D

Die Analyse der Tertiärstruktur erfolgte *in silico* über die Programme *SWISS Model workspace* und *UCSF Chimera*. Das Protein rApl D wurde anhand der Tertiärstruktur von menschlichem Saposin A (Proteindatenbanknummer: 2dobA) modelliert. Für die Modellierung wurden die Aminosäurereste 4 – 80 verwendet. Die Sequenzähnlichkeit der Primärstruktur zwischen rApl D und Saposin A betrug 28,8 %. Das Vorhersagemodell zeigt für rApl D eine globuläre Struktur mit vier α -Helices und drei Disulfidbrücken (**Abb. 26**). Der Kern des Modells ist durch hydrophobe Reste ausgefüllt, wohingegen die polaren Seitenketten der hydrophilen Reste in die wässrige Umgebung zeigen.

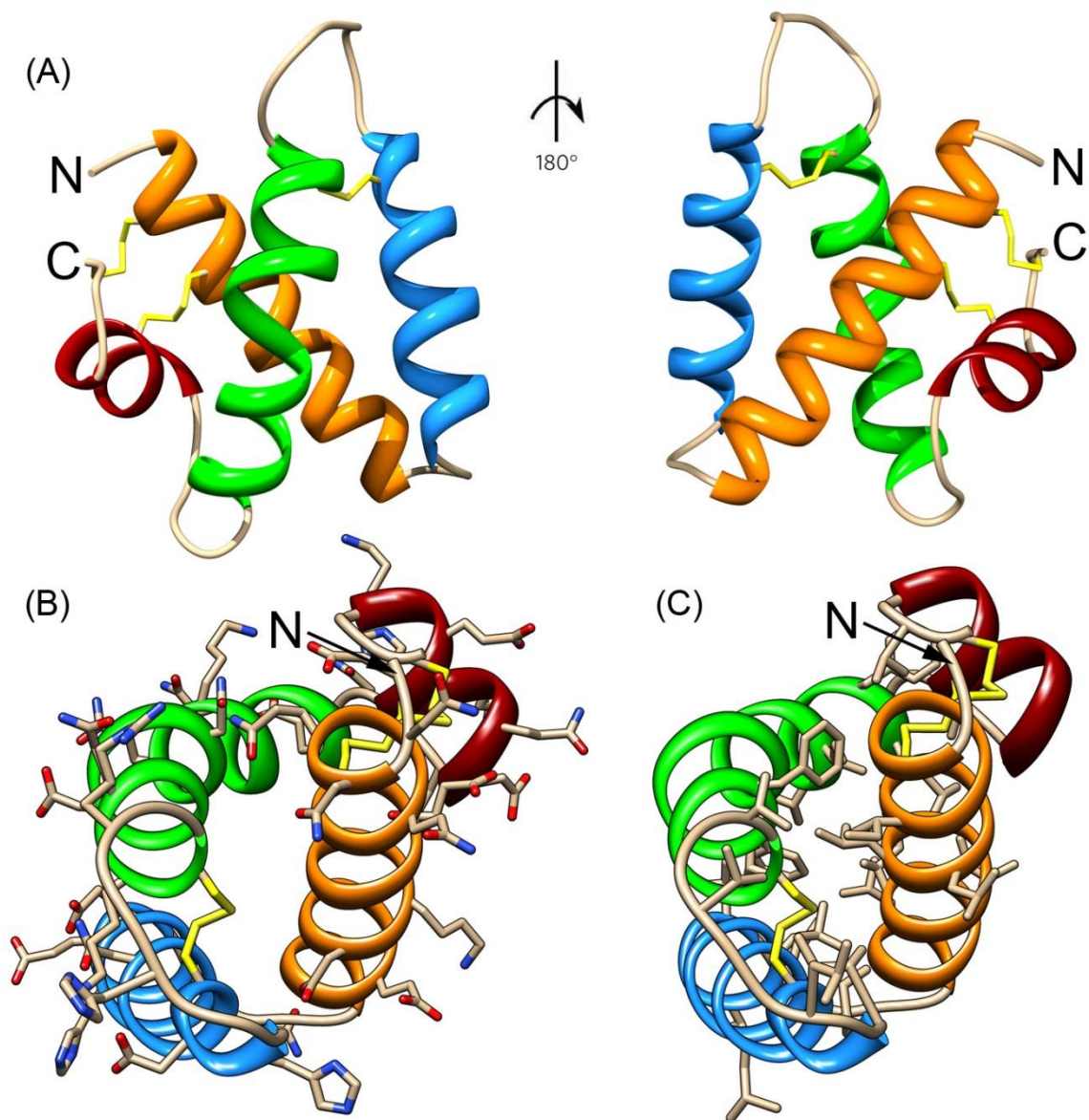


Abb. 26: Modellierung der Tertiärstruktur von rApl D. (A) Die beiden Ansichten zeigen das Protein jeweils um 180° gedreht. Das Modell für rApl D verfügt über vier α -Helices. Die drei Disulfidbrücken sind in gelb dargestellt. Der N- und C-Terminus ist mit N bzw. C gekennzeichnet. (B) Anordnung der Seitenketten hydrophiler Aminosäuren (D, E, K, R, H, Q, N) im Bändermodell. Stickstoffe sind in blau, Sauerstoffe in rot dargestellt. (C) Anordnung der Seitenketten hydrophober Aminosäuren (F, V, I, L).

4.3 Funktionsanalysen der rekombinant hergestellten Proteine

4.3.1 Aktivitäten von rApl B2 und rApl D im Mikrosuszeptibilitätstest

Zur Analyse der antimikrobiellen Aktivität von rApl B2 und rApl D wurden die Proteine im Mikrosuszeptibilitätstest gegen die gram-negativen Bakterien *E. coli* D31 und die gram-positiven Bakterien *B. megaterium* getestet. Das Protein rApl B2 wurde mit einer maximalen Konzentration von 5 µM bei pH 5,2 und pH 7,4 eingesetzt. Für rApl D wurden die Versuche mit einer Maximalkonzentration von 50 µM bei pH 5,2 und 5 µM bei pH 7,4 durchgeführt. Alle Werte stellen den Median aus drei unabhängigen Versuchen dar (n = 3).

Weder rApl B2 noch rApl D zeigten im Mikrosuszeptibilitätstest antimikrobielle Aktivität bei den eingesetzten Proteinkonzentrationen.

Die Verwendung von Kaliumphosphatpuffer statt Natriumphosphatpuffer brachte keine Veränderung der Ergebnisse.

Tab. 14: Antimikrobielle Aktivität von rApl B2 und rApl D gegen *E. coli* und *B. megaterium* bei pH 5,2 und pH 7,4

	<i>E. coli</i> D31 MIC (MLC)		<i>B. megaterium</i> MIC (MLC)	
	pH 5,2	pH 7,4	pH 5,2	pH 7,4
Melittin	0,031 µM (0,031 µM)	0,031 µM (0,031 µM)	0,016 µM (0,016 µM)	0,062 µM (0,062 µM)
Cecropin P1	0,0005 µM (0,0005 µM)	0,0005 µM (0,0005 µM)	0,062 µM (0,062 µM)	0,25 µM (0,25 µM)
rApl B2	> 5 µM (> 5 µM)	> 5 µM (> 5 µM)	> 5 µM (> 5 µM)	> 5 µM (> 5 µM)
rApl D	> 50 µM (> 50 µM)	> 5 µM (> 5 µM)	> 50 µM (> 50 µM)	> 5 µM (> 5 µM)

4.3.2 Hämolytische Aktivität von rApl D

Für das Protein rApl D wurde die hämolytische Aktivität gegen Hammel-Erythrozyten untersucht. Die ovinen Erythrozyten zeichnen sich durch einen hohen Anteil an Sphingomyelinen und einen geringen Anteil an Phosphatidylcholin aus (Kasárov, 1970). Das hämolytische Kontrollpeptid Melittin wurde mit einer Konzentration von final 10 μM in der ersten Vertiefung eingesetzt. Das Protein rApl D wurde mit einer Konzentration von 50 μM in der ersten Vertiefung eingesetzt und seriell durch zwei Reihen der Mikrotiterplatte verdünnt. Als Solvens wurde das entsprechende Volumen 0,01 % TFA in die Mikrotiterplatte pipettiert. Als Standard wurden Erythrozyten in ddH₂O lysiert und als 100 % Lyse definiert. Die Platte wurde für 1 h bei 37 C inkubiert und mit dem Auge ausgewertet.

Melittin zeigte eine hämolytische Aktivität bis zu einer Konzentration von 0,3125 μM (Median aus drei Experimenten). Das Protein rApl D zeigte keine hämolytische Aktivität gegen Hammel-Erythrozyten bis zu einer Konzentration von 50 μM (**Abb. 27**).

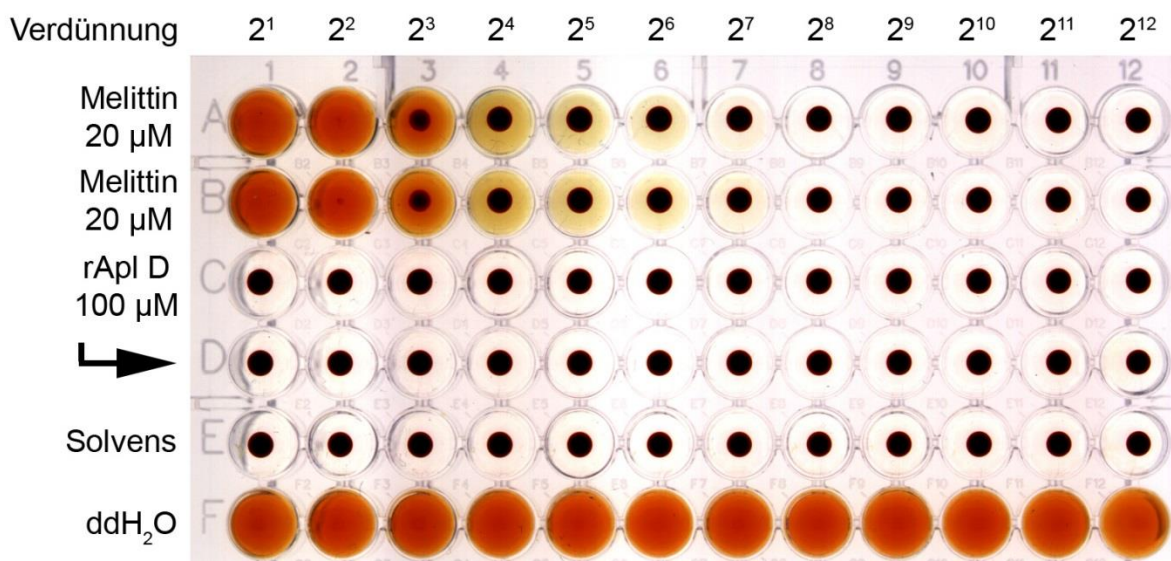


Abb. 27: Beispielhafte Darstellung der hämolytischen Aktivität von rApl D. Die Abbildung zeigt ein repräsentatives Ergebnis aus 3 Versuchen. Es wurden 50 μM des rekombinanten Proteins in der ersten Vertiefung eingesetzt und durch 2 Reihen verdünnt (**Pfeil**). Das Kontrollpeptid Melittin wurde mit final 10 μM in der ersten Vertiefung eingesetzt. In der letzten Reihe der Platte wurden Erythrozyten in 80 μl ddH₂O resuspendiert.

4.3.3 Membranpermeabilisierende Aktivität gegen Bakterien

Für die Untersuchung des antimikrobiellen Wirkspektrums wurde der sensitive *SYTOX Green*-Assay verwendet. Dabei wurden Bakterien zusammen mit einem potenziell antimikrobiellen Peptid und dem fluoreszierenden DNA-Farbstoff *SYTOX Green* inkubiert. Durch Permeabilisierung der bakteriellen Membran interkaliert der Farbstoff mit der zugänglich gewordenen bakteriellen DNA und führt zu einem Anstieg der Fluoreszenzintensität, die in einen prozentualen Wert für permeabilisierte Bakterien umgerechnet wurde. Die *SYTOX Green*-Assays wurden zu einem großen Anteil von Heidrun Ließegang durchgeführt.

4.3.3.1 Membranpermeabilisierende Aktivität von rApl B2

Rekombinant hergestelltes rApl B2 wurde gegen *B. megaterium* und *E. coli* K12 D31 getestet. Als Positivkontrolle wurde das membranpermeabilisierende Protein Cecropin P1 verwendet, welches eine bekannte antimikrobielle Aktivität gegen gram-positive und gram-negative Bakterien besitzt (Boman *et al.*, 1993). Die Ergebnisse wurden mit SigmaPlot 10.0 ausgewertet und sigmoidal mit vier Parametern gefittet.

Das Protein zeigte keine membranpermeabilisierende Aktivität gegenüber *E. coli* D31 bis zu einer Konzentration von 5 μM (**Abb. 28 B**). Allerdings zerstörte rApl B2 die Membranintegrität von *B. megaterium* bei pH 5,2 (**Abb. 28 A**).

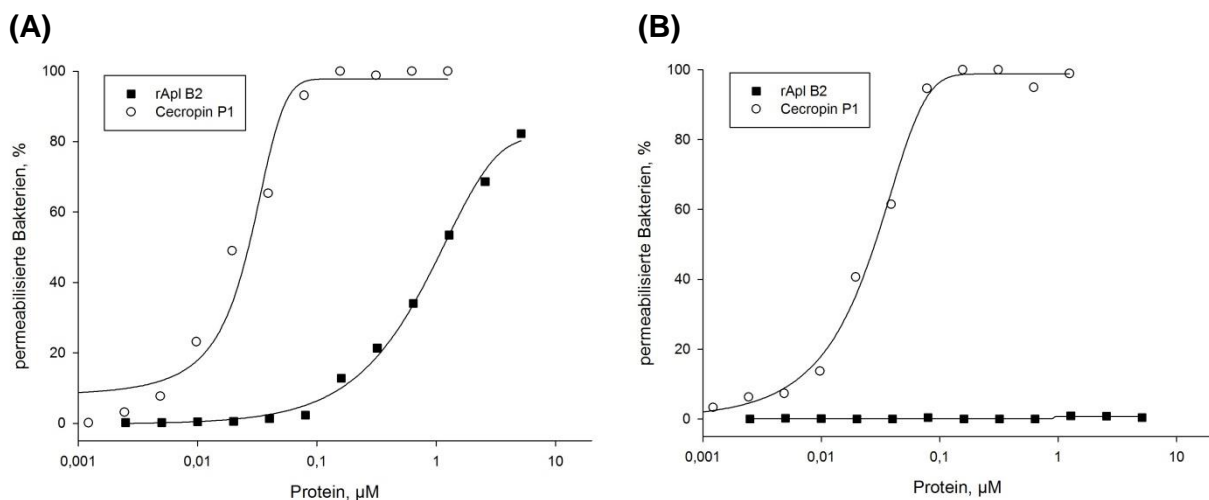


Abb. 28: Membranpermeabilisierende Aktivität von rApl B2 gegen *B. megaterium* (A) und *E. coli* (B). Die Datenpunkte repräsentieren den Mittelwert aus 3 unabhängigen Experimenten bei pH 5,2 (n = 3).

4.3.3.2 Membranpermeabilisierende Aktivität von rApl D

Es wurde auch das antimikrobielle Wirkspektrum von rApl D analysiert. Dazu wurde rApl D gegen *E. coli* D31 und die Futterbakterien *Klebsiella pneumoniae aerogenes* getestet. Zusätzlich wurden noch die Stämme *K. pneumoniae* KP21 und K⁻ verwendet, da die phänotypische Analyse einer *Knock-out*-Mutante für *aplD* eine verminderte Wachstumsfähigkeit auf diesen ebenfalls gram-negativen Bakterien zeigte.

Für das Protein rApl D wurde keine membranpermeabilisierende Aktivität gegen *E. coli* D31 und die verschiedenen *Klebsiella pneumoniae*-Stämme bis zu einer Konzentration von 5 μM nachgewiesen (**Abb. 29**). Das Kontrollpeptid Cecropin P1 wurde mit maximal 1,25 μM eingesetzt und zeigte bei allen Bakterien antimikrobielle Aktivität, wobei die Aktivität gegen *Klebsiella pneumoniae* (**Abb. 29 B,C,D**) vergleichsweise schwächer als gegen *E. coli* D31 war (**Abb. 29 A**).

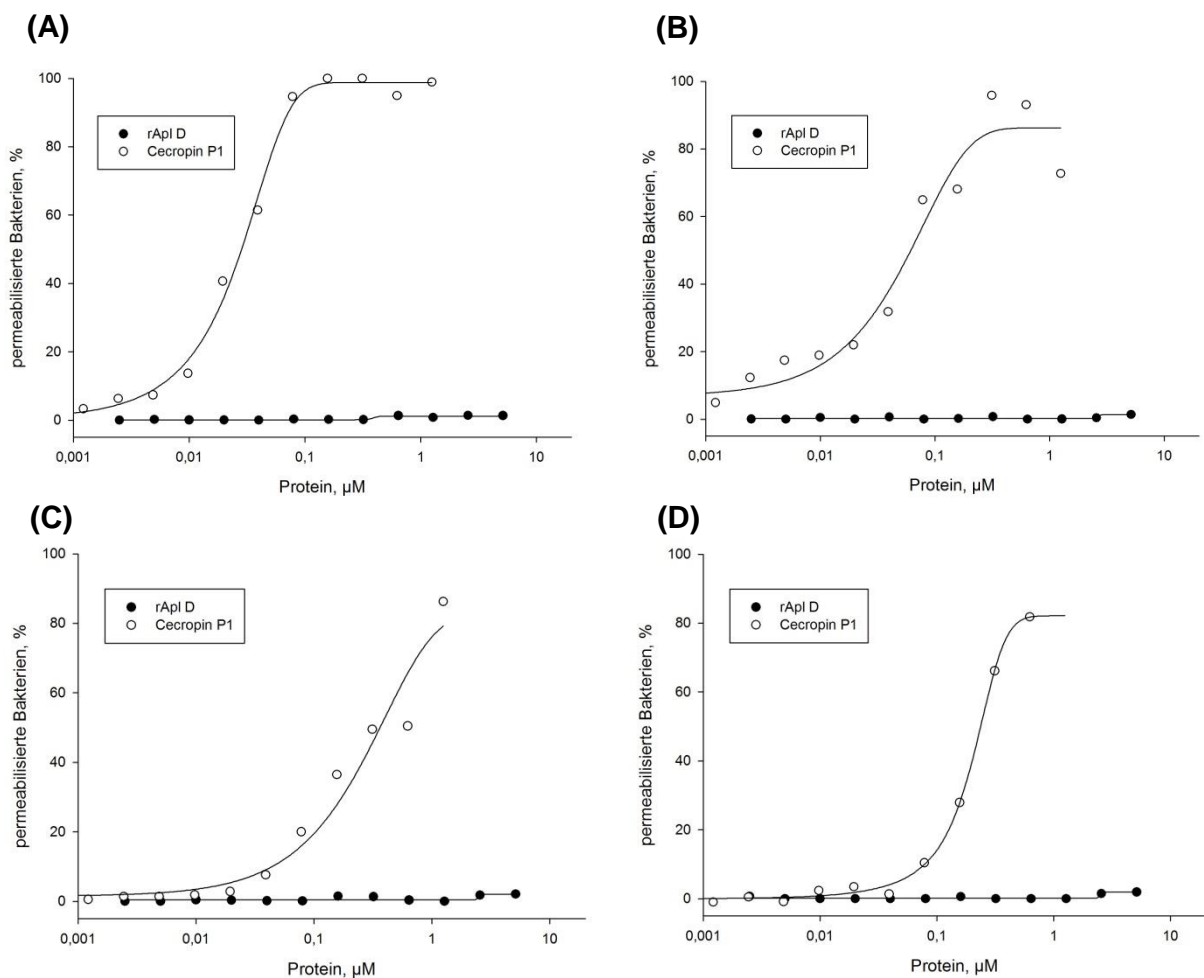


Abb. 29: Membranpermeabilisierende Aktivität von rApl D. Die Abbildungen zeigen die Aktivität von rApl D und dem Kontrollpeptid Cecropin P1 gegen *E. coli* D31 (**A**) nach 30 min Inkubation bei pH 5,2. Zusätzlich wurde gegen *Klebsiella pneumoniae aerogenes* (**B**), KP21 (**C**) und K⁻ (**D**) getestet. Die Datenpunkte repräsentieren den Mittelwert aus jeweils 3 unabhängigen Experimenten bei pH 5,2 nach 60 min Inkubationszeit (n = 3).

Um eine eventuelle pH-abhängige Aktivität von rApl D zu untersuchen, wurde das Protein auf Aktivität gegen *Klebsiella pneumoniae* KP21 bei den pH-Werten pH 4,4 und pH 7,4 getestet.

Das Protein rApl D zeigte auch bei sauren bzw. neutralen pH-Werten keine membranpermeabilisierende Aktivität gegen die Bakterien *Klebsiella pneumoniae* KP21 (**Abb. 30**). Die Anwesenheit von final 10 μM Zn^{2+} oder 1 mM Mg^{2+} im MES-Puffer führte zu keiner nachweisbaren membranpermeabilisierenden Aktivität bis zu einer Konzentration von 5 μM .

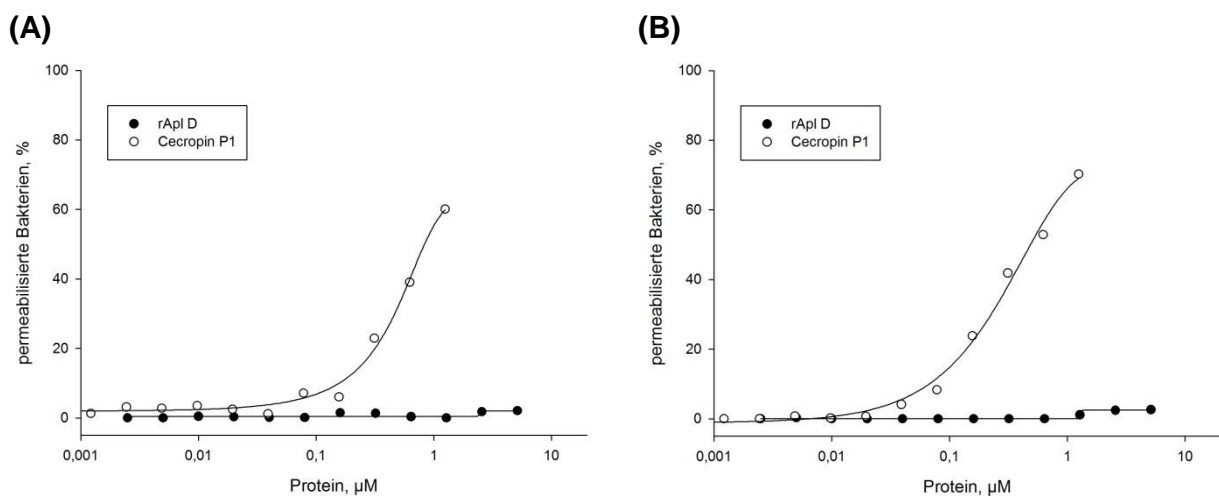


Abb. 30: Membranpermeabilisierende Aktivität von rApl D gegen *K. pneumoniae* KP21 bei unterschiedlichen pH-Werten. Aktivität von rApl D und dem Kontrollpeptid Cecropin P1 bei pH 4,4 (**A**) und pH 7,4 (**B**) nach 60 Minuten Inkubationszeit. Die Datenpunkte repräsentieren den Mittelwert aus jeweils 3 unabhängigen Experimenten nach 60 min Inkubationszeit ($n = 3$).

Der in den Analysen zur membranpermeabilisierenden Aktivität verwendete Farbstoff *SYTOX Green* interkaliert mit DNA, die negativ geladen ist. Es wurde daher überprüft, ob der Farbstoff auch an das negativ geladene Protein rApl D bindet und eine mögliche Aktivität unterbindet (**Abb. 42**). Der Farbstoff hatte keine negativen Effekte auf die Aktivität von rApl D.

Das Protein rApl D zeigte keine membranpermeabilisierende Aktivität gegen gram-negative Bakterien, daher wurde rApl D gegen *B. megaterium* getestet. Es wurde die Aktivität von rApl D bei pH 5,2 und pH 7,4 untersucht.

In den Experimenten wurde die antimikrobielle Aktivität von rApl D bei pH 5,2 bewiesen. Das gereinigte Protein rApl D zeigte eine mit der Konzentration graduell ansteigende Aktivität gegen *B. megaterium* (**Abb. 31 A**). Verglichen mit der Aktivität bei pH 5,2 war die Aktivität von rApl D bei pH 7,4 reduziert (**Abb. 31 B**). Eine Messung bei pH 4,4 war nicht möglich, da die Bakterien in dem sauren Puffer nicht lang genug lebensfähig waren.

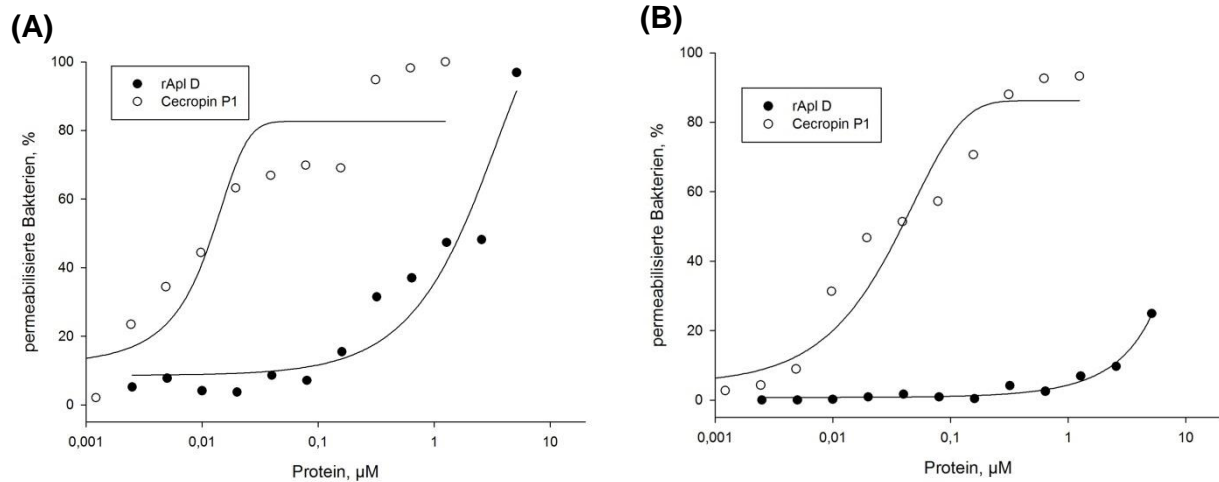


Abb. 31: Membranpermeabilisierende Aktivität von rApl D gegen *Bacillus megaterium*. Aktivität von rApl D und dem Kontrollpeptid Cecropin P1 bei pH 5,2 (**A**) und pH 7,4 (**B**) nach 30 Minuten Inkubationszeit. Die Datenpunkte repräsentieren den Mittelwert aus 3 unabhängigen Experimenten.

Für die membranpermeabilisierende Aktivität von rApl D gegen *B. megaterium* bei pH 5,2 wurde eine Zeitkinetik angefertigt (**Abb. 32**). Die Aktivität von rApl D ist zu Beginn der Messung sehr niedrig und steigt mit der Dauer der Inkubationszeit stetig an.

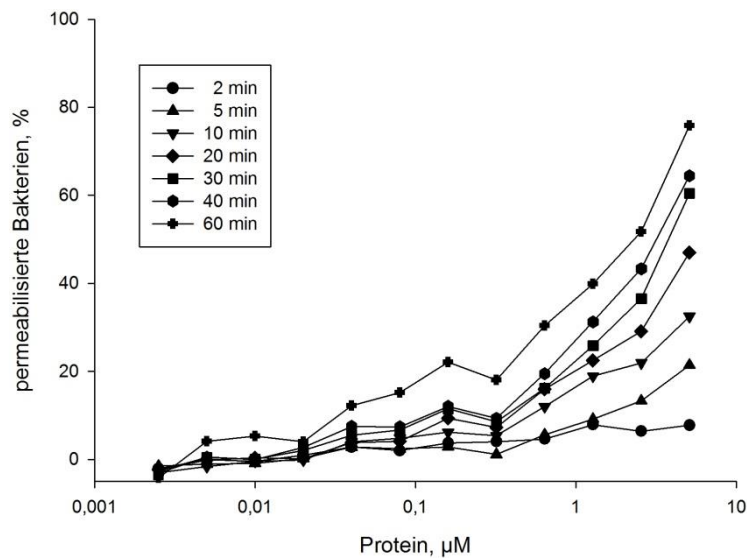


Abb. 32: Zeitkinetik der Membranpermeabilisation von *B. megaterium* durch rApl D. Der Prozentsatz der permeabilisierten Bakterien wurde nach 2, 5, 10, 20, 30, 40 und 60 min gemessen. Es ist ein repräsentatives Experiment von vier Versuchen mit ähnlichen Resultaten dargestellt.

Jenseits von 60 min Inkubationszeit wiesen die Bakterien zunehmend Membranschäden auch in der Negativkontrolle (Solvens und SYTOX Green) auf, sodass keine zuverlässigen Daten mehr erhoben werden konnten.

4.3.4 Membranpermeabilisierende Aktivität von rApl D gegen Eukaryoten

Die zytotoxische Aktivität von rApl D gegen *Dictyostelium*-Amöben wurde im modifizierten SYTOX Green-Assay ermittelt. Es wurden 5×10^4 Zellen mit einer maximalen Konzentration von $5 \mu\text{M}$ rApl D bei pH 5,2 inkubiert. Als Positivkontrolle wurde Cecropin P1 und Melittin eingesetzt, die beide zytotoxische Aktivität zeigten. Das Protein rApl D zeigte bis zu einer Konzentration von $5 \mu\text{M}$ nach 60 min (**Abb. 33 A**) und selbst nach einer Inkubationszeit von 18 h (**Abb. 33 B**) keine Aktivität.

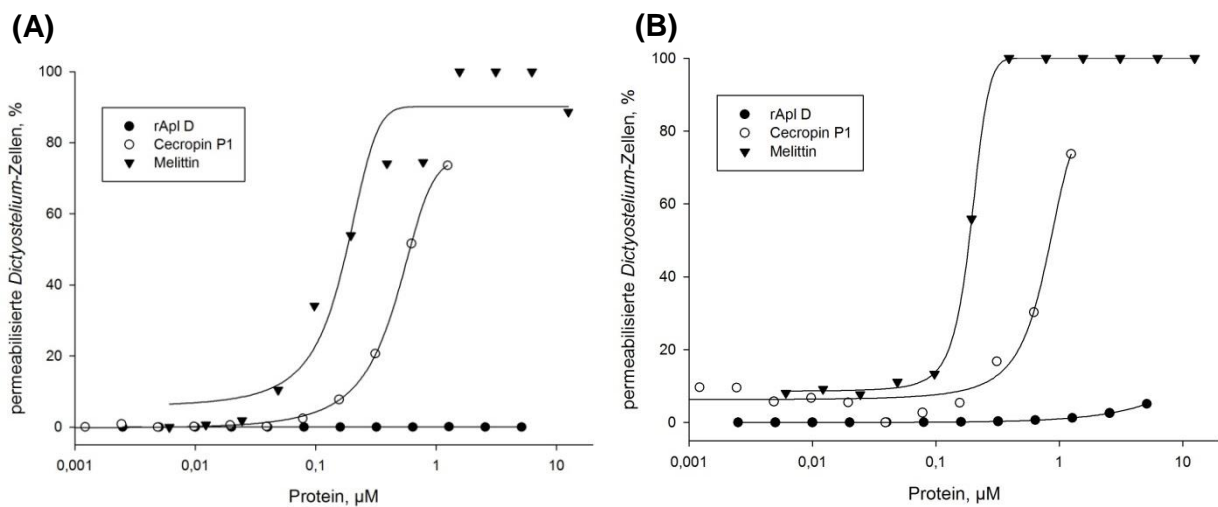


Abb. 33: Membranpermeabilisierende Aktivität von rApl D gegen *Dictyostelium*-Zellen. *Dictyostelium*-Amöben wurden in 20 mM MES, 150 mM NaCl pH 5,2 für 60 min (**A**) und für 18 h (**B**) zusammen mit rApl D inkubiert. Die Werte stellen den Mittelwert von 3 unabhängigen Experimenten dar.

Ebenso wurde auf fungizide Aktivität von rApl D gegen *Saccharomyces cerevisiae* getestet. Das Protein zeigte keine antifungale Aktivität (**Abb. 34**).

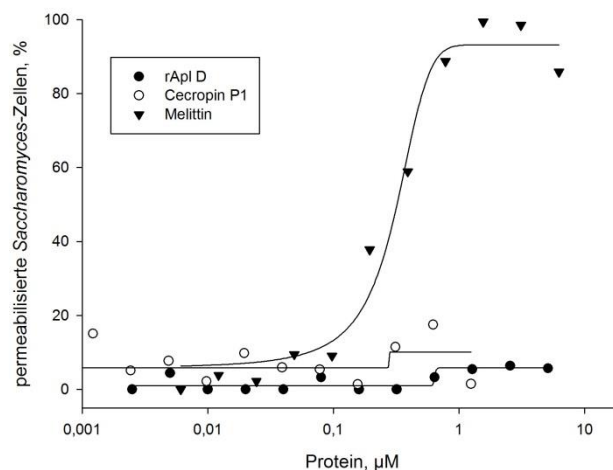


Abb. 34: Membranpermeabilisierende Aktivität von rApl D gegen *S. cerevisiae*. Hefezellen wurden in 20 mM MES, 25 mM NaCl pH 5,2 für 3 h zusammen mit rApl D inkubiert. Die Werte stellen den Mittelwert von drei unabhängigen Experimenten dar.

4.3.5 Porenbildende Aktivität von rApl B2 und rApl D

Zur Bestimmung des Wirkmechanismus wurden die Proteine rApl B2 und rApl D auf porenbildende Aktivität in einem minimalistischen Membransystem untersucht. Aus L- α -Phosphatidylcholin wurden multilamellare Liposomen hergestellt, an die ein potentialsensitiver Fluoreszenzfarbstoff gebunden wurde. Durch die Zugabe eines porenbildenden Proteins brach das Membranpotential zusammen und der Farbstoff wurde freigesetzt. Die pH-Abhängigkeit des Proteins wurde in dem sogenannten Liposomendepolarisationstest untersucht. Dafür wurde der Küvettenpuffer (50 mM Tris-Maleat; 50 mM Na₂SO₄; 0,5 mM EDTA-Na₂; 0,02 % Natriumazid) mit einem AusgangspH von pH 4,25 mit entsprechenden Mengen 1 M NaOH titriert, um Puffer mit den pH-Werten pH 4,4, pH 4,8, pH 5,2, pH 5,6, pH 6,0, pH 6,4 und pH 7,4 zu erhalten. Anschließend wurde die Aktivität von rApl D und rApl B2 im Vergleich zu dem bekanntermaßen porenbildenden Protein Alamethicin bestimmt und in Einheiten (*Units*) pro nmol umgerechnet. Die Proteine zeigten in Abhängigkeit des pH-Wertes teilweise deutliche porenbildende Aktivität (**Abb. 35**).

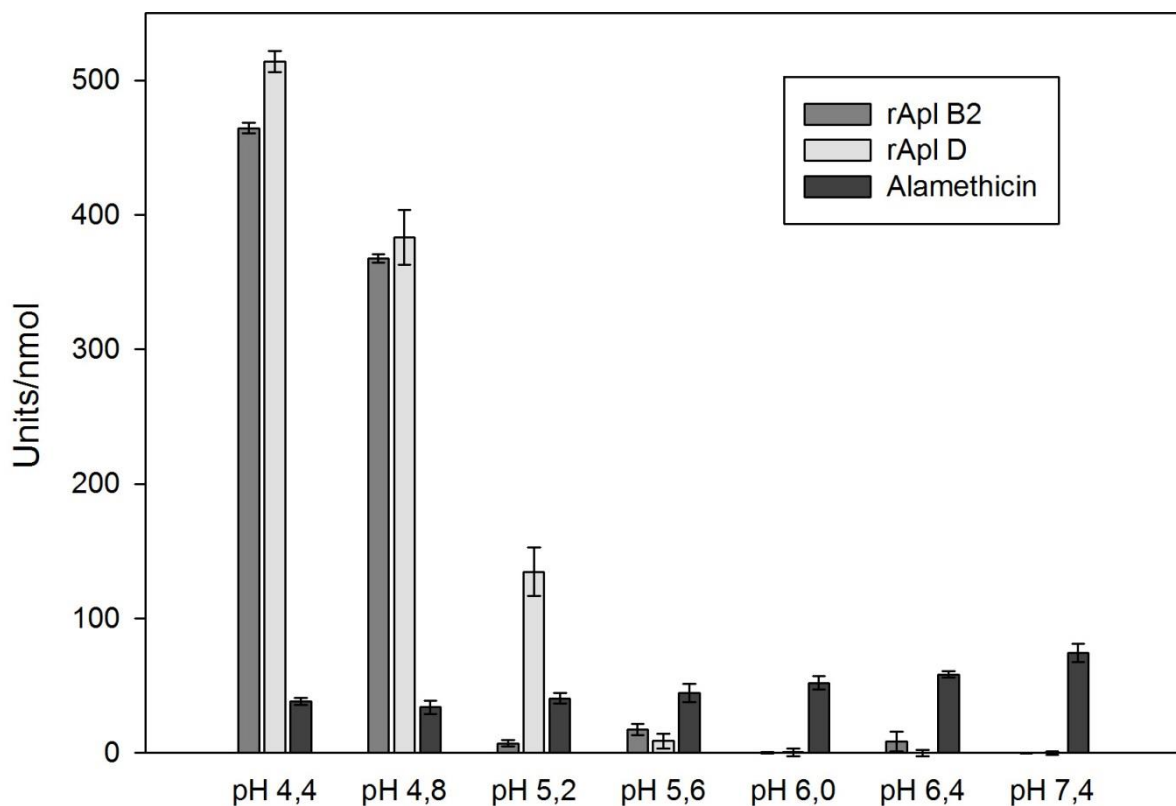


Abb. 35: pH-Abhängigkeit der porenbildenden Aktivität von rApl D und rApl B2 im Liposomendepolarisationstest. Dargestellt ist der Mittelwert und die Standardabweichung von sechs unabhängigen Experimenten. Die Werte der Pufferkontrolle (rApl B2 und rApl D in 10 mM Natriumphosphatpuffer pH 6,8) oder des Solvens (Alamethicin in 0,01 % TFA) wurden abgezogen.

Das Protein rApl D zeigte eine deutliche porenbildende Aktivität gegen Liposomen unterhalb von pH 5,6. Für die pH-Werte pH 4,8 und pH 4,4 beträgt die Aktivität von rApl D das 11fach bzw. 13fache der Aktivität von Alamethicin.

Für rApl B2 wurde nur geringe Aktivität bei pH 5,2 gemessen, jedoch war die Aktivität bei den beiden niedrigen pH-Werten im Bereich der Aktivität von rApl D. Ferner zeigte rApl B2 auch bei den pH-Werten pH 5,6 und pH 6,4 eine geringe, wenn auch porenbildende Aktivität.

Die Ergebnisse sind in der **Tab. 15** zusammengefasst.

Tab. 15: Porenbildenden Aktivität von rApl B2, rApl D und Alamethicin.

	rApl B2	rApl D	Alamethicin
pH 4,4	464,4	513,9	38,1
pH 4,8	367,2	383,1	33,9
pH 5,2	7,08	134,7	40,5
pH 5,6	17,2	8,8	44,6
pH 6,0	0	0,5	52,1
pH 6,4	8,3	0,0	58,3
pH 7,4	0	0,0	74,5

Alle Werte sind in Einheiten pro nmol angegeben.

4.3.6 Aktivität von rApl D in Abhängigkeit der Faltung

Des Weiteren wurde untersucht, wie sich die Denaturierung des Proteins auf die Aktivität im Liposomendepolarisationstest auswirkt. Dazu wurde rApl D bzw. der Puffer (10 mM Natriumphosphatpuffer, pH 6,8) wie in 3.3.6 beschrieben mit Dithiothreitol (DTT) und Iodacetamid (IAA) behandelt und erhitzt. Anschließend wurde die Aktivität bei pH 5,2 (**Abb. 36 A**) und pH 7,4 bestimmt (**Abb. 36 B**).

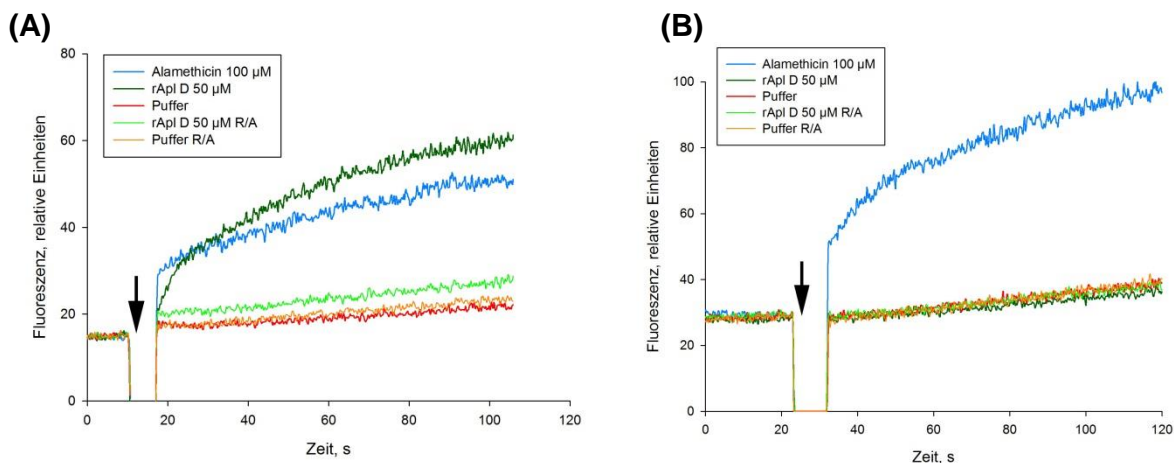


Abb. 36: Porenbildende Aktivität nach Zugabe von rApl D und Alamethicin. Die Abbildung zeigt die Freisetzung des Fluoreszenzfarbstoffs nach Zugabe des porenbildenden Proteins (Pfeil) bei pH 5,2 (**A**) und pH 7,4 (**B**). Das Kontrollpeptid Alamethicin (blau) wurde mit 200 nmol in der Küvette eingesetzt. Vom Protein rApl D wurden jeweils 100 nmol unbehandeltes Protein (dunkelgrün) und reduziert und alkyliertes Protein (hellgrün) eingesetzt. Als Negativkontrolle wurde der Puffer von rApl D (10 mM Natriumphosphatpuffer pH 6,8) in unbehandelter (rot) und in reduziert/alkylierter Form (orange) eingesetzt.

Die Aktivität der unbehandelten und der behandelten Proben in U/nmol sind in **Tab. 16** angegeben. Zusätzlich ist die Stoffmenge des Proteins in der Küvette angegeben.

Tab. 16: Porenbildende Aktivität der Proteine in Abhängigkeit der Stoffmenge. Die Werte sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten.

	pH 5,2		pH 7,4	
	Stoffmenge	Units pro nmol	Stoffmenge	Units pro nmol
Alamethicin	200 pmol	52 U/nmol	200 pmol	115 U/nmol
rApl D	100 pmol	109 U/nmol	100 pmol	1 U/nmol
rApl D red/alk	100 pmol	7,2 U/nmol	100 pmol	3 U/nmol

Es zeigte sich eine eindeutige porenbildende Aktivität von rApl D bei pH 5,2. Die Aktivität ist an die korrekte Faltung des Proteins gekoppelt. Die internen Disulfidbrücken verleihen dem Protein eine enorme Hitzestabilität, sodass für eine effektive Denaturierung vorher die Disulfidbrücken mit Dithiothreitol (DTT) aufgespalten und durch Alkylierung mit Iodacetamid (IAA) am Wiederausammenschluss gehindert werden müssen. Die Effekte der einzelnen Behandlungsschritte sind in **Tab. 17** aufgeführt.

Das Protein zeigte im Vergleich zur unbehandelten Probe einen geringen Aktivitätsverlust bzw. eine hohe Toleranz gegenüber Hitze, IAA und DTT. Lediglich die Kombination der beiden Chemikalien hintereinander führte zur Öffnung der Disulfidbrücken und verhinderte einen Rückschluss durch die Carboxymethylierung der offenen Thiolgruppen der Cysteinreste. Das destabilisierte Protein wurde anschließend durch Hitze denaturiert und verlor die porenbildende Aktivität.

Tab. 17: Porenbildende Aktivität von rApl D in Abhängigkeit der Behandlung mit Hitze, IAA und DTT. Die Aktivität der unbehandelten Probe wurde auf 100 % gesetzt.

Behandlung:	Aktivität
Unbehandelt	100 %
100 °C, 20 min	80 %
100 °C, 20 min, 50 mM DTT	80 %
RT, 30 min, 150 mM IAA	75 %
Reduziert und alkyliert	7 %

5 Diskussion

Seitdem Ilja Iljitsch Metschnikow im Winter 1882 einen Stachel in durchsichtige Seesternlarven steckte, ist bekannt, dass phagozytotisch aktive Zellen ein wichtiger Bestandteil des Immunsystems sind (Desjardins *et al.*, 2005). Er beobachtete, wie sich einzelne amöboide Zellen in der Larve zu dem eingedrungenen Fremdkörper bewegten, denselben umlagerten und schließlich auflösten. Er taufte diese Zellen Phagozyten.

Im Menschen heißen sie Makrophagen, neutrophilen Granulozyten oder dendritischen Zellen, die für die Beseitigung von abgestorbenen Zellen oder eingedrungene Mikroben sorgen. In basaleren Organismen ist der Prozess der Phagozytose primär eine Möglichkeit zur Nahrungsaufnahme. *D. discoideum* phagozytiert pro Stunde bis zu 300 Bakterien (Bozzaro *et al.*, 2008) und zählt zu den professionellen Phagozyten. Im Normalfall wird das internalisierte Partikel ins Phagolysosom aufgenommen, im sauren Milieu degradiert und die unverdaulichen Bestandteile wieder exozytiert.

Aufgrund der morphologischen und genetischen Ähnlichkeiten zwischen der sozialen Amöbe und den phagozytotischen Immunzellen eignet sich *Dictyostelium* als Modellorganismus zur Erforschung der intrazellulären Prozesse bei der Aufnahme und Verwertung von Mikroorganismen.

Phagozytose ist ein komplexer und evolutionär stark konservierter Mechanismus und wurde eingehend in *Dictyostelium* untersucht (Bozzaro *et al.*, 2008; Le Coadic *et al.*, 2013). Insbesondere sind der endozytotische Transit (Maniak, 2003), die Ansäuerung des Phagolysosoms (Marchetti *et al.*, 2009) und die Rolle von Aktin bei der Abschnürung eines phagozytotischen Vesikels (Clarke und Maddera, 2006) der Gegenstand einer Vielzahl von Publikationen (Bozzaro *et al.*, 2008). Umso erstaunlicher ist es, dass nur wenig über die eigentlichen antimikrobiellen Prozesse im Inneren des Phagolysosoms bekannt ist. Als antimikrobielle Effektorproteine sind einige uncharakterisierte Enzyme mit saurem pH-Optimum zu nennen, die beim Abbau von Lipopolysacchariden beteiligt sind (Braun *et al.*, 1972). Des Weiteren sind die Proteine Cathepsin G und Elastase (Cosson und Soldati, 2008) an der Verwertung von Bakterien beteiligt. Das einzige bisher eingehend charakterisierte antimikrobielle Protein ist das Amöbenlysozym AlyA (Müller *et al.*, 2005). Bei der Inkubation von *Dictyostelium*-Zellen mit *E. coli*-Bakterien wurden die Transkripte von *alyA*, *B*, *C* und *D* dreifach herunterreguliert (Sillo *et al.*, 2008). Dementsprechend erscheinen die Lysozyme für das Abtöten von gram-negativen Bakterien entbehrlich, jedoch werden die Gene von *alyA*, *B* und *C* bei der Infektion von

Amöben mit *P. aeruginosa* hochreguliert (bis zu 1,8fach bei AlyC auf *P. aeruginosa* im Vergleich zu AlyC auf *K. aerogenes*) (Carilla-Latorre *et al.*, 2008).

Es wurden von Sillo *et al.* (2008) die Transkription einiger Apl-Gene bezüglich einer möglichen Funktion beim Abtöten von Bakterien untersucht. Die Inkubation der Amöben mit *E. coli*-Bakterien führte zu unterschiedlich regulierten Transkripten für verschiedene Apls. Während die Transkripte der Gene *aplB* und *aplN* herunterreguliert wurden, wurde die mRNA-Synthese der Gene *aplJ* und *aplP* verstärkt (persönliche Mitteilung von Prof. Dr. Bozzaro). Für *aplP* wurde dieses Ergebnis bei der Infektion von *Dictyostelium*-Zellen mit den *Pseudomonas*-Stämmen PA01 und PA14 bestätigt (Carilla-Latorre *et al.*, 2008). Es sind allerdings auch andere Funktionen für die Apls möglich. *AplK* könnte bei der Differenzierung von Pro-Sporezellen und Pro-Stielzellen involviert sein (Maeda *et al.*, 2003).

Um ein besseres Verständnis über die Expression der *apls* zu erhalten, sollte im ersten Teil dieser Dissertation das Vorhandensein der Apls auf proteomischer Ebene untersucht werden. Dazu wurden drei verschiedene Ansätze durchgeführt.

Die Anreicherung von Phagolysosomen mittels *Latex-Beads* wurde erstmals mit *Acanthamoeba castellanii* durchgeführt (Wetzel und Korn, 1969) und später auf Makrophagen übertragen (Desjardins *et al.*, 1994). In *Dictyostelium* wurde diese Methode zur genauen proteomischen Charakterisierung von Phagolysosomen zu unterschiedlichen Zeitpunkten eingesetzt (Gotthardt *et al.*, 2006) und von Dr. Régis Dieckmann optimiert (Dieckmann *et al.*, 2008). Nach der Analyse der Daten wurden 179 phagolysosomale Proteine in *D. discoideum* identifiziert (Gotthardt *et al.*, 2006), wobei durch den Einsatz des Gelsystems nach Laemmli (Laemmli, 1970) nur wenige Proteine unterhalb von ~10 kDa untersucht wurden. Konkret waren zu diesem Zeitpunkt (Stand 2009) in den extensiven Experimenten keine Apls oder Lysozyme identifiziert worden.

In dieser Arbeit wurden im ersten proteomischen Versuchsansatz *Dictyostelium*-Phagolysosomen mit Hilfe von *Latex-Beads* angereichert und analysiert, wobei ein besonderes Augenmerk auf Proteine zwischen 5 kDa und 25 kDa gelegt wurde. In dem verwendeten Protokoll wurde die Aufnahme der *Latex-Beads* als *Pulse/Chase*-Experiment durchgeführt. Es standen sechs verschiedene Zeitpunkte zur Auswahl.

Tab. 18: Zeitpunkte für die Phagolysosomenisolation aus *Dictyostelium discoideum*.

	<i>Pulse</i>	<i>Chase</i>
P1	5 min	-
P2	15 min	-
P3	15 min	15 min
P4	15 min	45 min
P5	15 min	105 min
P6	15 min	165 min

Nach persönlicher Rücksprache mit Dr. Régis Dieckmann wurde P4 als Zeitpunkt für die Isolierung von Phagolysosomen verwendet, da die Phagosomenreifung bei der Internalisierung von *Latex-Beads* verlangsamt ist (Bozzaro *et al.*, 2008) und nach 45 min Inkubation der mittlere Verdauungsschritt bei der Bakterienverwertung erreicht ist. Zusätzlich wurde in einer anderen Veröffentlichung gezeigt, dass beim Abbau von *DsRed*-Bakterien das Signal des Proteins mit einer Halbwertszeit von 45 min verschwindet (Maselli *et al.*, 2002).

Die Analyse der Massenspektrometriedaten führte zur Identifikation von 71 phagolysosomalen Proteinen (**Tab. 19**), wobei nur die Proteinpunkte bis zu einer Größe von 30 kDa ausgestochen wurden. In dem Proteinextrakt wurde das bis dato unbekannte potenzielle Lysozym DdLysEh3 identifiziert (**Tab. 6**), welches eine Aminosäuresequenzähnlichkeit von 55,6 % mit den anderen beiden Eh-Typ-Lysozymen DdLysEh1 und DdLysEh2 hat (**Abb. 15**). In zeitlich nachfolgenden Veröffentlichungen wurde das Lysozym DdLysEh3 auch in anderen Versuchsansätzen identifiziert (Bakthavatsalam und Gomer, 2010; Journet *et al.*, 2012).

Leider wurden in der Phagolysosomenpräparation keine anderen Lysozyme oder Apls identifiziert. Allgemein war der Anteil an kleinen Proteinen mit einer molekularen Masse zwischen 5 und 15 kDa sehr gering. Bedingt durch die Methode der 2D-Gel-basierten Analytik kann in der ersten Dimension nur eine begrenzte Menge an Protein (~250 µg) aufgetrennt werden, wenn eine befriedigende Auflösung erreicht werden soll. Die kleine Größe der Proteine bedingt eine entsprechend schlechtere Anfärbbarkeit, sodass bei gleicher Molarität ein großes Protein noch nachweisbar ist, während ein kleines Protein nicht mehr auf dem Gel erscheint. Hinzu kommt, dass die Apls sich nur schlecht mit Coomassie anfärben lassen, da die dafür benötigten basischen Aminosäuren in sauren

Proteinen nur wenig vorhanden sind. Der deswegen verwendete Fluoreszenzfarbstoff Flamingo Pink färbt Proteine bis zu der Nachweisgrenze von 0,25 ng Protein pro Bande/Spot an, wobei die Färbung unabhängig von der Primärstruktur ist. Der Farbstoff färbt die Peptidbindungen in den Proteinen an, folglich erscheinen kleine Proteine weniger stark.

Die Reinigung von Phagolysosomen aus *Dictyostelium discoideum* führte nicht zu der erhofften Identifikation von Apls, wobei nicht ausgeschlossen ist, dass die gesuchten Proteine zu einem anderen Zeitpunkt des endozytotischen Transits zu finden gewesen wären. Aber anhand der vorhandenen Literatur und aufgrund der persönlichen Kommunikation mit Mitgliedern der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Thierry Soldati hatte der Zeitpunkt P4 die größten Aussichten auf Erfolg. Es besteht zusätzlich die Möglichkeit, dass zu dem gewählten Zeitpunkt die Apls durchaus vorhanden waren, durch die geringe Abundanz und die kleine Größe jedoch unterhalb der Nachweisgrenze lagen. In einer 2010 veröffentlichten Studie des Proteoms von Phagosomen unterschiedlicher Organismen wurden insgesamt 818 phagosomale Proteine in *Dictyostelium* identifiziert (Boulais *et al.*, 2010), darunter die Apls A3 und A5, B1 und B2, Apl G, Apl H2 und die Apls N1 und N2 (**Abb. 18**). Des Weiteren wurde das Lysozym DdLysEh2 gefunden. Die Veröffentlichung zeigt, dass einige Apls tatsächlich im Phagosom von axenisch kultivierten Ax2-Amöben vorhanden sind, allerdings sind die Funktionen noch unbekannt.

Im zweiten Ansatz zur Identifikation von Apls als Proteine im Amöbenstadium wurde ein Proteinextrakt auf einem eindimensionalen Tricingel getrennt (**Abb. 16**), die Proteine zwischen 2 und 20 kDa über NanoHPLC aufgetrennt und massenspektroskopisch analysiert (LC-MS/MS). Die Verwendung eines neueren und sensitiveren Massenspektrometers zusammen mit der vorgeschalteten Peptidanalytik über HPLC sollte die Sensitivität der Analyse erhöhen.

Die Analyse der Daten führte zur Identifikation von DdLysEh1 (**Tab. 7**) und DdLysEh2 (**Tab. 8**), wobei die vorausgesagte molekulare Masse von 21,07 bzw. 21,06 kDa (*Dictybase.org*) bestätigt wurde. Allerdings wurden beide Lysozyme schon vorher in anderen Arbeiten proteomisch identifiziert. Im Zuge meiner Diplomarbeit in der Abteilung Zoophysiologie der CAU Kiel wurde das Lysozyme DdLysEh1 aus einem Zellextrakt axenisch kultivierter Zellen isoliert (Bitzhenner, 2008). Des Weiteren wurden beide Lysozyme bei der proteomischen Charakterisierung des Makropinosoms (Journet *et al.*, 2012) und des Sekretoms (Bakthavatsalam und Gomer, 2010) gefunden. Für die Analyse des Makropinosoms wurden K-Ax3-*Dictyostelium*-Zellen in Flüssigkultur mit 1 mg/ml Eisen-Dextran inkubiert und die Zellen nach 2 h in einem Kugel-Homogenisator

aufgeschlossen. Die Makropinosomen wurden mit Hilfe eines Magneten gereinigt und die enthaltenen Proteine über LC-MS/MS analysiert. Insgesamt wurden 2108 nicht-redundante Proteine identifiziert (Journet *et al.*, 2012).

Als Sekretom wurde die Gesamtheit der Proteine definiert, die bei der Aggregation und Entwicklung von Amöbenzellen über 24 h ins Milieu abgegeben wurde. Dazu wurden 1×10^7 Zellen auf eine Membran in einer 6-well-Zellkulturplatte pipettiert und mit Entwicklungspuffer dünn überschichtet. Die Zellen begannen den Entwicklungszyklus und der Überstand wurde nach 4, 8, 12, 16, 20 oder 24 h abgenommen und proteomisch analysiert (Bakthavatsalam und Gomer, 2010). Während DdLysEh1 zu allen Zeitpunkten identifiziert wurde, war DdLysEh2 nur zum Zeitpunkt 20 h als Proteine vorhanden. Das Lysozym DdLysEh3 wurde in den Zeitpunkten 12, 16 und 20 h identifiziert. Dies ist ein Hinweis auf eine mögliche Funktion der Lysozyme während der Entwicklung der *Dictyostelium*-Amöben.

Bei der Kultivierung von Amöbenzellen auf *E. coli*-Bakterien wurden die Transkripte von *DdLysEh1* 2,6fach herunterreguliert (Sillo *et al.*, 2008). Gleiches gilt für die Regulation bei einer Infektion mit *Legionella*-Bakterien, wobei die Regulierung mit -1,5fach weniger stark ausfällt (Farbrother *et al.*, 2006). Auch hier ist wenig über die eigentlichen Funktionen der Lysozyme bekannt, die Proteine sind aber anscheinend im Phagosom/Makropinosom lokalisiert. Die Transkriptionsanalysen suggerieren eine weniger bedeutende Rolle der Lysozyme bei der Lyse von Bakterien. Sollten die Lysozyme allerdings konstitutiv exprimiert werden, wären sie im *Microarray* als „nicht reguliert“ annotiert. Auch eine Funktion während des Entwicklungszyklus ist denkbar. Die Funktionsvorhersagen anhand von *gene ontology*-Modellen (*GO terms*) der Datenbank *Dictybase.org* sagen für DdLysEh 1 – 3 eine katalytische Aktivität bei der Abwehr von Mikroorganismen voraus.

Das *Amoebapore-like peptide* Apl B (**Tab. 9**) wurde ebenfalls in dem zweiten Versuchsansatz zur Analyse des antimikrobiellen Arsenal identifiziert. Das Gen *aplB* kodiert ein 35,16 kDa großes Protein. Die Peptide zu Apl B wurden allerdings in den Gelstücken für Proteine der Größe 8 – 9 kDa identifiziert. Die Analyse der vorhergesagten Aminosäuresequenz mit SignalP (Bendtsen *et al.*, 2004) ließ ein N-terminales Signalpeptid erkennen. Ähnlich den *Naegleriapores* (Herbst *et al.*, 2004), wurde von Prof. Dr. Leippe die Synthese der Apls als Vorläuferproteine, aus denen sekundär proteolytisch einzelne aktive Domänen prozessiert werden, postuliert. Die

eingehende Analyse der massenspektrometrischen Daten zeigte, dass es sich bei dem identifizierten Protein um Apl B2 handelte, welches auf eben diesem Wege aus dem Vorläuferprotein herausgeschnitten worden sein muss. Durch die Identifikation des vorausgesagten N-Terminus des maturen Proteins wurde die Hypothese bestätigt, dass Apl B2 genau wie die *Amoebapores* A und B (Leippe, 1997) vier Aminosäurereste vor dem ersten Cystein mit einem Glycinrest beginnt. Diese Daten bestätigten zudem die Ergebnisse aus meiner Diplomarbeit (Bitzhenner, 2008), in der Apl B2 in Proteinextrakten von axenischen und xenischen kultivierten Amöben identifiziert wurde. Im Makropinosom von *Dictyostelium* wurden Peptide der Apls B1 und B2 nachgewiesen, Peptide von Apl B3 wurden im Sekretom sich entwickelnder Amöben erkannt (Bakthavatsalam und Gomer, 2010). Peptidfragmente von Apl B1 wurden auch in Proteinen des Phagosoms gefunden (Boulais *et al.*, 2010), was als Hinweis auf eine antimikrobielle Funktion gesehen werden kann.

In einem dritten Experiment wurden Proteine aus *slugs*, dem mobilen Wegschnecken-ähnlichen Entwicklungsstadium von *Dictyostelium discoideum*, analysiert. Die phototaktisch aktiven *slugs* wurden auf einem nährstofffreien Phosphatagar angereichert und geerntet. Nach 24 h Inkubation befanden sich die *slugs* in der Mitte der Phosphatagarplatte und damit 2 – 3 cm vom Startpunkt und den noch aggregierenden Zellen oder beginnenden Fruchtkörpern entfernt (**Abb. 17 A**). Dadurch wurde sichergestellt, dass in der proteomischen Analyse ausschließlich *Dictyostelium-slugs* verwendet wurden. Die *slugs* wurden in Extraktionspuffer lysiert und die Proteine in einem 1D-Gel aufgetrennt (**Abb. 17 B**). Die Proteine zwischen 7 und 16 kDa wurden aus dem Gel ausgeschnitten und in vier Banden getrennt. Die Analyse der durch Trypsinisierung entstandenen Peptide erfolgte über LC-MS/MS und führte unter anderen zur Identifikation des Amöbenlysozym AlyC (**Tab. 12**).

AlyC wird als Lysozym eine Rolle bei der Degradierung von Bakterien als Futter oder der Abwehr von Pathogenen zugesprochen. Die Infektion von Amöben mit *P. aeruginosa* führte zu einer 1,5fachen Hochregulierung der Transkripte (Carilla-Latorre *et al.*, 2008), während die Inkubation mit *E. coli*-Bakterien eine 3,5fache Herunterregulierung bewirkte (Sillo *et al.*, 2008). Untersuchungen zur Regulation der Transkription im Entwicklungszyklus zeigten eine circa siebenfache Herunterregulierung von *alyC* (Galardi-Castilla *et al.*, 2008). Die Analyse des Makropinosoms führte zur Identifikation des Proteins (Journet *et al.*, 2012).

Zudem wurden in dem Versuchsansatz die *Amoebapore like peptides* Apl E (**Tab. 11**) und Apl D (**Tab. 10**) identifiziert. Das Gen für *apIE* kodiert ein Protein mit zwei SAPLIP-

Domänen und einer molekularen Masse von 22,7 kDa ohne Signalpeptid. Das Protein wäre damit außerhalb des analysierten Proteinbereichs gewesen. Die postulierte proteolytische Prozessierung des Proteins ergibt zwei einzelne mature Proteine mit 9,3 und 9,9 kDa. Alle identifizierten Peptide lagen innerhalb der beiden vorausgesagten SAPLIP-Domänen mit dem postulierten N-Terminus vier Aminosäurereste vor dem ersten Cysteinrest und dem letzten von sechs Cysteinresten als C-Terminus. Die Ergebnisse unterstützen damit die Hypothese, dass die Apls E1 und E2 aus einem größeren Präproprotein herausgeschnitten werden. Die proteolytische Prozessierung maturer Proteine aus einem Vorläuferprotein ist auch von anderen amöboiden Organismen bekannt. In dem fakultativen Parasiten *Naegleria fowleri* werden die *Amoebapore*-ähnlichen Proteine *Naegleriapore* B1, B2 und B5 aus einem Vorläuferprotein mit fünf SAPLIP-Domänen prozessiert (Herbst *et al.*, 2004).

Von besonderem Interesse war die Identifikation von Apl D. In der parallel angefertigten Dissertation von M. Sc. Dhakshinamoorthy zeigte die Nullmutante für *aplD* Wachstumsdefekte auf den Bakterien *K. pneumoniae* KP21 und K'. Ebenfalls war das Abtöten von intrazellulären *K. pneumoniae*-Bakterien beeinträchtigt (Dhakshinamoorthy, 2012). Apl D ist folglich bei der Abtötung von Bakterien involviert. Des Weiteren wurde mittels qRT-PCR die Transkription im Amöbenstadium und im Verlauf des Entwicklungszyklus bestimmt. *AplD* wird in Amöben mäßig transkribiert und zu Beginn des Entwicklungszyklus stark hochreguliert, wobei das Maximum während des *slug*-Stadiums erreicht wurde (**Abb. 9**). Die proteomische Identifikation von Apl D in *slugs* bestätigt die Ergebnisse der Transkriptionsanalyse und lässt eine Funktion des Proteins während der Entwicklung vermuten. Um die Chancen einer Identifikation von Apls in *Dictyostelium*-Extrakten zu erhöhen, wurde die maximale Proteinmenge auf ein 1D-Gel geladen. Dadurch leidet die Auftrennung der Proteine anhand ihrer molekularen Größe, sodass die identifizierten Proteine in mehreren der ausgeschnittenen Banden zu finden waren. Daher sind genaue Aussagen über die tatsächliche molekulare Größe der Proteine nicht möglich.

Die Ergebnisse der drei unterschiedlichen Experimente zur Identifikation von potenziell antimikrobiellen Proteinen in *Dictyostelium discoideum* führte zur erhofften eingehenden Bestandsaufnahme des antimikrobiellen Arsenal. Insgesamt wurden aus den 14 potenziell vorhandenen Lysozymen die Gruppe der *Entamoeba histolytica*-Typ Lysozyme DdLysEh1, DdLysEh2 und DdLysEh3 und das Amöben-Lysozym AlyC entdeckt. Die Analyse der *Amoebapore like peptides* führte zur Identifikation von Apl B2

und dem erstmaligen Nachweis der Proteine Apl E1, Apl E2 und Apl D in *Dictyostelium*. Insgesamt wurden in den bisherigen Arbeiten 15 von 33 möglichen Apls als Protein gefunden (**Abb. 18**). Dabei ist die große Mehrzahl der Proteine in Arbeiten gefunden worden, die sich direkt (Gotthardt *et al.*, 2006; Boulais *et al.*, 2010; Dieckmann *et al.*, 2012) und indirekt (Urwyler *et al.*, 2009) mit dem Phagolysosom beschäftigt haben bzw. das Makropinosom charakterisiert haben (Journet *et al.*, 2012). Offensichtlich haben die Proteine eine niedrige Abundanz in axenisch kultivierten Amöben, wobei nach wie vor unklar ist, in wieweit *D. discoideum* zwischen verschiedenen Bakterien unterscheiden und sein antimikrobielles Arsenal dementsprechend einstellen kann. *Microarray*-Analysen einer Amöbenkultur auf *E. coli*-Bakterien zeigten eine Herunterregulierung der Lysozyme AlyA – D und des Apls N (Sillo *et al.*, 2008), während bei der Infektion der Amöben mit *P. aeruginosa* die Alys A – C und Apl N 1,5fach hochreguliert werden (Carilla-Latorre *et al.*, 2008). Zur Diskussion steht die Aussagekraft einer 1,5fachen Transkriptionsregulierung. In der entsprechenden Veröffentlichung wurde der allgemein verwendete Schwellenwert einer zweifachen Regulierung auf eine 1,4fache Regulierung herabgesetzt, da andernfalls eine Vielzahl der Gene nicht reguliert worden wären. Vergleichende Experimente zur antimikrobiellen Aktivität von Proteinextrakten aus xenisch und axenisch kultivierten Amöben zeigten keine Unterschiede (Bitzhenner, 2008).

Zusätzlich könnten einige der Proteine eine Funktion während des Entwicklungszyklus innehaben. Die Transkripte des Gens *aplK* werden während der Differenzierung von Pro-Stielzellen und Pro-Sporenzellen 4,5fach hochreguliert (Maeda *et al.*, 2003), während die Transkripte der Gene für *alyA – C* siebenfach herunterreguliert werden (Galardi-Castilla *et al.*, 2008). Die Transkription von *aplD* hat ein Maximum während des *slug*-Stadiums und das entsprechende Protein ist bisher nur in *slugs* identifiziert worden.

Eine mögliche Funktion könnten die Proteine bei dem von Prof. Dr. Strassmann als *Farming* beschriebenen Phänomen übernehmen (Brock *et al.*, 2011). Etwa ein Drittel verschiedener Wildtypisolate von *D. discoideum* aus den Gebieten Minnesota und Virginia sind in der Lage den Entwicklungszyklus zu starten, bevor ihre bakteriellen Nahrungsquellen vollkommen erschöpft sind. Die verbliebenen Bakterien werden während der Aggregation in den *slug* eingegliedert und sind auch im Fruchtkörper vorhanden. Diese *Farmer*-Stämme können im Gegensatz zu den *Non-Farmer*-Stämmen eine sterile Agarplatte besiedeln, in dem die Bakterien wieder „ausgesät“ werden und anschließend als Nahrung dienen. Dieses Phänomen ist als eine rudimentäre Form des Ackerbaus beschrieben. Die *Farmer* haben jedoch nur dann einen Selektionsvorteil,

wenn in dem neuen Habitat keine oder nur unbrauchbare Bakterien vorzufinden sind, ansonsten kann der Nachteil durch den verfrühten Entwicklungsbeginn nicht kompensiert werden. Interessanter Weise nehmen nach einer Antibiotika-Behandlung nur diejenigen Stämme wieder Bakterien auf, die vorher auch schon *Farmer*-Stämme waren (Brock *et al.*, 2011). Es stellt sich die Frage, wie die *Farmer* die enthaltenen Bakterien vor dem „angeborenen Immunsystem“ und den phagozytotisch aktiven *s-cells* (Chen *et al.*, 2007) schützen (Vortrag von Prof. Dr. Kuspa, *Abstract-Buch zur Dictyostelium-Konferenz 2012* in Madrid). Offenbar ist die Fähigkeit der *Farmer*, Bakterien zu transportieren, umgekehrt proportional zur Anzahl an *s-cells*. Zusätzlich ist die Funktionalität des Gens *tirA*, welches für die effiziente Abtötung von Bakterien in den *s-cells* verantwortlich ist, in *Farmer*-Stämmen eingeschränkt, da die Mutation des Gens in Ax4-Amöben aus *Non-Farmer*-Stämmen *Farmer*-Stämme macht.

Anhand der Ergebnisse aus der proteomischen Analyse wurden einige Apls für eine rekombinante Expression ausgewählt. Es wurden Konstrukte für die Apls B2, B3, C und D hergestellt. Die Apls B2 und D wurden in dieser Arbeit als Protein in *Dictyostelium* identifiziert. Die Apls C und D wurden 2006 im Zuge einer Diplomarbeit an der Universität Bochum rekombinant hergestellt und zeigten antimikrobielle Aktivität im radialen Diffusionstest nach Lehrer *et al.* (1991) gegen *Bacillus subtilis* und *Escherichia coli* (Michaelis, 2006). Da die entsprechenden manipulierten *E. coli*-Stämme nicht mehr existierten, wurden für die vier oben genannten Apls neue Konstrukte bei der Firma *GeneArt* bestellt (**Abb. 20**). Die Nukleotidsequenz der Konstrukte wurde für eine Expression in *E. coli* optimiert. In dieser Arbeit wurden die Expression von rApl B2 und rApl D realisiert (**Abb. 21**). Die Expression der Proteine sollte in dem Vektor pET-28a(+) durchgeführt werden, der neben einem 6xHistidin-Rest lediglich für eine Thrombinschnittstelle kodiert. Das jeweilige Fusionsprotein wäre also nur 21 Aminosäurereste größer als das geschnittene Apl. Die Expression der Proteine rApl B2 und rApl D unter unterschiedlichen Expressionsbedingungen und mit verschiedenen *E. coli*-Stämmen ergab keine zufriedenstellenden Ergebnisse. Daher wurde der Vektor pET-32a(+) verwendet, bei dem in Kombination mit dem *E. coli*-Stamm C 43 die Fusionsproteine rApl B2 und rApl D in ausreichenden Mengen sowohl in der löslichen Fraktion als auch in den Einschlusskörperchen (*inclusion bodies*) hergestellt werden konnte. Die Expression der Apls B3 und C konnte in dieser Arbeit nicht realisiert werden. Die Fusionsproteine für rApl B2 und rApl D sollten mittels immobilisierter Metallionenaffinitätschromatographie von den bakteriellen Proteinen getrennt werden.

Bei der Verwendung von Nickel-NTA-Agarose enthielten die Fraktionen mit den Fusionsproteinen zahlreiche unspezifisch gebundene Bakterienproteine. Dieser Anteil wurde durch die Verwendung von TALON® *Metal Affinity Resin* verringert, jedoch waren weiterhin einige Proteinkontaminationen in den Fraktionen der Fusionsproteine vorhanden (**Abb. 21**). Das Hinzufügen weiterer Waschschriffe mit niedrigen Imidazolkonzentrationen oder einem stringenten Waschpuffer mit 1 M NaCl führte zu keiner Verringerung der Proteinkontaminationen. Deshalb wurden die Fusionsproteine über Anionenaustausch-Chromatographie weiter gereinigt. Dabei wurden die stark anionischen Eigenschaften der Proteine ausgenutzt und der Anteil der Fusionsproteine in der Fraktion deutlich erhöht.

Die gereinigten Fusionsproteine rApl B2 und rApl D wurden mit der TEV-Protease gespalten. Während die proteolytische Spaltung bei rApl D problemlos verlief, wurde das Fusionsprotein rApl B2 auch bei langen Inkubationszeiten und hohen Konzentrationen der Cysteinprotease nur unzureichend gespalten. Ein möglicher Grund für die ungleiche Suszeptibilität gegenüber der TEV-Protease könnte der unterschiedliche N-Terminus der geschnittenen Proteine sein (**Abb. 37**).

```

rApl_B2      MSDKI IHLTDDSFDTDVLKADGAILVDFWAEWCGPCKMIAPILDEIADEYQGKLTVAKLN 60
rApl_D      MSDKI IHLTDDSFDTDVLKADGAILVDFWAEWCGPCKMIAPILDEIADEYQGKLTVAKLN 60
*****

rApl_B2      IDQNPGTAPKYGIRGIPTLLLFKNGEVAATKVGALSQQLKEFLDANLAGSGSGHMH 120
rApl_D      IDQNPGTAPKYGIRGIPTLLLFKNGEVAATKVGALSQQLKEFLDANLAGSGSGHMH 120
*****

rApl_B2      HHS SGLVPR GS GMKETAAAKFERQHMDSPDLGTHMENLYFQ GIL---ECDI CQFIVKQVN 177
rApl_D      HHS SGLVPR GS GMKETAAAKFERQHMDSPDLGTHMENLYFQ GEI DNNQCQI CELLVKDII 180
*****

rApl_B2      KYISGNATEAQILKFLDTC E VFGKGGSVT C QNIVNNYAPQI INLI INNASPSQV C GLVG 237
rApl_D      EGLTANQSVEVIEHGLNLI C DHIPLHVRV- C KQFVDSNFQKIVQFIENHDDPQEI C EKCG 239
:  .:. .*  :  *  :  *  :  *  :  :  *  *  :  :  *  :  *  :  *  :  *

rApl_B2      LC-- 239
rApl_D      VC-- 241
: *

```

Abb. 37: Sequenzalignment der rekombinant hergestellten Fusionsproteine von Apl B2 und Apl D.

Legende: **Thioredoxin-tag**, **His-tag**, **Thrombin-Schnittstelle**, **TEV-Protease-Schnittstelle**, **N-Terminus des geschnittenen Zielproteins**, **C** = Cysteinrest, - = Stop-Codon. Die Spaltstellen der Proteasen sind mit **|** dargestellt. Die TEV-Protease sollte zwischen dem Glutaminrest (Q) und dem Glycinrest (G) schneiden. Die Fusionsproteine unterscheiden sich in der Aminosäuresequenz vor allem im Bereich C-terminal von der TEV-Protease-Schnittstelle. Während bei rApl B2 nur 4 Aminosäurereste vor dem ersten Cystein zu finden sind, zeigt die Sequenz von rApl D drei zusätzliche Aminosäurereste (**DNN**) vor dem ersten Cystein.

Verglichen mit rApl B2 verfügt das Fusionsprotein von rApl D über drei zusätzliche Aminosäurereste (DNN) C-terminal von der TEV-Protease-Schnittstelle. Diese Aminosäurereste liegen zwischen der Protease-Schnittstelle und dem ersten Cysteinrest des Zielproteins. Das könnte zu einer sterischen Hinderung der TEV-Protease an der Schnittstelle von rApl B2 führen. Es wurde versucht, rApl B2 durch Reduktion und Alkylierung zu linearisieren und das Schneiden der Protease zu erleichtern. Alternativ wurde das Fusionsprotein rApl B2 in einem vorgeschalteten Schritt mit Thrombin behandelt, um den Thioredoxin- und den 6xHistidin-Rest des Fusionsproteins abzuspalten. Das verkleinerte Fusionsprotein sollte die Zugänglichkeit der Protease-Schnittstelle für die TEV-Protease verbessern. Beide Ansätze verliefen erfolglos. Daher konnten nur geringe Mengen des gespaltenen rApl B2 hergestellt werden.

Die gespaltenen und gereinigten Apls wurden vor den funktionalen Experimenten massenspektrometrisch verifiziert. Die Analysen zeigten für rApl D exakt die erwarteten theoretischen Massen des korrekt geschnittenen Proteins (**Abb. 22**, **Abb. 24**). Bei rApl B2 enthielt das geschnittene Protein zwei bzw. drei zusätzliche Aminosäurereste am N-Terminus (**Abb. 23**). Die TEV-Protease hat offensichtlich nicht an der vorhergesagten Position geschnitten, sondern hat einen Teil der Protease-Schnittstelle ($ENLYFQ$) am N-Terminus belassen. So enthielt das geschnittene rApl B2 die Aminosäurereste Phenylalanin und Glutamin (FQ) bzw. Tyrosin, Phenylalanin und Glutamin (YFQ). Es ist unwahrscheinlich, dass diese zusätzlichen Aminosäurereste die Funktionalität des Proteins verringert oder verändert haben, da sie am N-Terminus nicht mit der Faltung des Proteins interferieren.

Für die geschnittenen maturen Proteine wurde die Aminosäurezusammensetzung analysiert (**Tab. 13**). Beide Proteine sind 80 Aminosäurereste lang und haben einen ähnlich niedrigen isoelektrischen Punkt. Allerdings enthält die Primärstruktur von rApl D doppelt so viele negativ geladene Aminosäurereste (Aspartat und Glutamat) als die Aminosäuresequenz von rApl B2. Dementsprechend ist die Nettoladung von rApl D bei pH 7,0 deutlich negativer als bei rApl B2, sodass das Protein auch bei niedrigen pH-Werten noch negative Ladungen trägt. Des Weiteren enthält rApl D vier Histidinreste, welche in rApl B2 gänzlich fehlen. Histidinreste fungieren bei Proteinen häufig als pH-Schalter, da sich der isoelektrische Punkt von Histidin im neutralen pH-Bereich befindet ($pK_{\text{Seitenkette}}: 6,00$). Histidin ist demnach je nach pH entweder Protonendonator oder Protonenakzeptor. Bei *Amoebapore A* ist die porenbildende Aktivität an die Dimerisierung über das C-terminale Histidin gebunden (Hecht *et al.*, 2004). Bei Apl D sind die Histidinreste weder N- noch C-terminal positioniert, sondern gleichmäßig an der hydrophilen Oberfläche des Proteins verteilt.

Als Vorbereitung für die funktionale Analyse von rApl B2 und rApl D musste der Proteingehalt der Proben bestimmt werden. Dafür standen die photometrischen Proteinbestimmungsmethoden bei 280 nm sowie die Ermittlung des Proteingehalts über die BCA-Methode und der anschließenden Messung bei 562 nm zur Verfügung. Durch die Abwesenheit von Aromaten und insbesondere Tryptophanresten in der Aminosäurezusammensetzung der Proteine ist die Berechnung des Extinktionskoeffizienten zur Proteinbestimmung bei 280 nm fehlerbehaftet. Insgesamt ist der Anteil an aromatischen Aminosäureresten, die für die photometrische Proteinbestimmung bei 280 nm erforderlich sind, in den Proteinen rApl B2 und rApl D sehr gering (**Tab. 13**). Bei der BCA-Methode, die auf der Biuret-Reaktion beruht, werden zweiwertige Kupferionen quantitativ durch die Peptidbindung der Proteine zu einwertigen Kupferionen reduziert. Diese bilden zusammen mit der Bicinchoninsäure einen violetten Farbstoff, dessen Absorption bei einer Wellenlänge von 562 nm photometrisch ausgewertet wird. Anschließend wird die Absorption unterschiedlicher Konzentrationen eines Standardproteins (BSA) mit der Absorption der unbekannt Probe korreliert. Da die Farbreaktion primär auf der Anzahl der Peptidbindungen beruht, weist diese Methode die geringsten Schwankungen bei der Proteinquantifizierung auf und wurde für die Funktionsanalyse der Proteine rApl D und rApl B2 verwendet.

Da die Aktivität rekombinanter Proteine häufig an eine korrekte Faltung gebunden ist, wurde mittels Zirkulardichroismus (CD-Spektroskopie) die Sekundärstruktur von rApl D überprüft (**Abb. 25**). Das CD-Spektrum zeigte das für α -helikale Proteine charakteristische Spektrum mit einem Maximum bei 192 nm und den beiden Minima bei 208 nm und 222 nm. Die Berechnungen mit dem Programm CONTIN II ergaben, dass das Protein hohe Anteile α -helikaler Strukturelemente enthält (78,7 %) und damit anderen SAPLIPs wie NK-Lysin, *Amoebapore A* oder Saposin A ähnelt. Allerdings sind diese Werte an eine 100 % reine Probe und eine sehr genaue Proteinbestimmung geknüpft.

Um weitere Informationen über die mögliche Struktur von rApl D zu bekommen, wurde die Aminosäuresequenz in das Programm SWISS-MODEL Workspace eingegeben. Das Programm analysiert die Primärstruktur des Proteins und sucht aus einer Datenbank bekannter Tertiärstrukturen denjenigen Vertreter mit den größten Übereinstimmungen. Das Protein rApl D wurde anhand der Struktur von Saposin A (Ahn *et al.*, 2006) modelliert (**Abb. 26**), obwohl die Sequenzidentität der beiden Proteine bei nur 28,8 % lag. Das Modell zeigt die charakteristische Saposin-Faltung mit einem hohen Anteil α -helikaler Elemente, drei intramolekularen Disulfidbrücken und einem hydrophoben Kern (Bruhn, 2005). Wie bei den meisten SAPLIPs sind die erste und die letzte Helix mit zwei

Disulfidbrücken, die mittleren Helices mit einer Disulfidbrücke verbunden. Anders als viele antimikrobielle SAPLIPs (*Amoebapore A*, NK-Lysin, *Caenopore 5*) besitzt das Modell für rApl D nur vier statt der üblichen fünf α -Helices. Häufig wird die dritte Helix an dem Aminosäurerest Tyrosin 54 (Olmeda *et al.*, 2013) unterbrochen oder enthält die Helixbrecher Glycin oder Prolin. Die Primärstruktur von rApl D (**Abb. 26**) enthält in der Mitte der zweiten Helix (blau) einen Glycinrest, der potenziell als Helixbrecher fungieren kann. Die dritte Helix (grün) des Modells von rApl D ist in der Mitte gebogen, um die Disulfidbrücke zwischen Helix zwei und drei zu ermöglichen. Auch hier ist die Teilung in zwei Sub-Helices analog der Struktur von NK-Lysin und Granulysin denkbar. Allerdings enthält die Helix drei weder Glycin- noch Prolinreste oder einen Tyrosinrest an Position 54.

Um die Eignung des Modells zu überprüfen, wurden die Positionen der hydrophoben und hydrophilen Seitenketten analysiert (**Abb. 26**). Es zeigte sich, dass die aromatischen Seitenketten der drei Phenylalaninreste zusammen mit der Mehrzahl der Seitenketten der hydrophoben Aminosäuren Valin, Leucin und Isoleucin ins Innere des Proteins gerichtet waren. Lediglich einige Seitenketten von Aminosäuren in den Schleifenbereichen sowie das Leucin 13 von Helix eins und Valin 30 und Leucin 37 der Helix zwei zeigten nach außen. Ebenso wurden die Positionen der Seitenketten der hydrophilen Aminosäuren Glutamat, Aspartat, Lysin, Arginin, Histidin, Glutamin und Asparagin analysiert. Diese polaren Seitenketten der Aminosäuren zeigten alle zur wässrigen Umgebung, was einem energetisch günstigen Zustand entspricht. Als Beispiel ist die Position der Histidin-Seitenketten hervorzuheben: Wäre der Imidazolring des Histidins in den Proteinkern orientiert, würde das Proteinmodell als unwahrscheinlich gelten. Demnach ist das Proteinmodell für rApl D durchaus schlüssig und als Vorhersage der Tertiärstruktur brauchbar. Die entsprechenden Analysen für rApl B2 ergab keine Ähnlichkeit mit einer bekannten Tertiärstruktur.

Zusammenfassend wurden bei der rekombinanten Expression von rApl D genügend Mengen Protein hergestellt, allerdings war die Reinigung des Fusionsproteins und des geschnittenen rApl D sehr aufwendig. Bei rApl B2 funktionierte die proteolytische Spaltung des Proteins nur eingeschränkt, sodass bei beiden Proteinen die Proteinmenge der limitierende Faktor war. Die Analyse der Aminosäuresequenz zeigte den anionischen Charakter der Zielproteine, wobei rApl D im Vergleich mit rApl B2 durch die doppelt so große Anzahl an sauren Aminosäureresten und eine bedeutend negativere Nettoladung auffällt. Für rApl D wurde der α -helikale Charakter des Proteins im CD-Spektrum nachgewiesen. Die Modellierung der Tertiärstruktur ließ die charakteristische Saposin-

Faltung erkennen, wobei die Struktur eher dem Lipid-interagierenden Saposin A und weniger den primär antimikrobiellen Proteinen *Amoebapore* A (Hecht *et al.*, 2004) oder NK-Lysin (Liepinsh *et al.*, 1997) ähnelte. Die herausgearbeiteten Unterschiede geben Hinweise auf eine andersartige Funktion von rApl D im Vergleich zu rein porenbildenden Proteinen.

Um konkrete Aussagen über die biologische Aufgabe der Proteine zu machen, wurde die *In-vitro*-Aktivität von rApl B2 und rApl D in verschiedenen Aktivitätstests analysiert. Einer der Standardtests zur Analyse antimikrobieller Proteine ist der Mikrosuszeptibilitätstest. Dabei wird die minimale bakteriostatische (MIC) und die minimale bakterizide Konzentration (MBC) eines Effektormoleküls bestimmt. Weder rApl B2 noch rApl D zeigten bei den eingesetzten Konzentrationen antimikrobielle Aktivität. Bei rApl B2 betrug der MIC und der MBC jeweils $> 5 \mu\text{M}$ bei pH 5,2 und pH 7,4 gegen *B. megaterium* und *E. coli*. Die gleichen Bakterien wurden gegen rApl D getestet. Der MIC und MBC betrug für pH 7,4 $> 5 \mu\text{M}$ und für pH 5,2 $> 50 \mu\text{M}$ (Tab. 14). Das Fruchtwasserprotein β_2 -Microglobulin zeigte bei gleichbleibendem pH stark unterschiedliche Aktivitäten bei verschiedenen Puffersystemen. So war das Protein bei 10 mM HEPES-Puffer und 10 mM Natriumphosphatpuffer pH 7,2 inaktiv, die Verwendung von 10 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,2 brachte antimikrobielle Aktivität gegen verschiedene Bakterien im mikromolaren Bereich (Kim *et al.*, 2012). Um ähnliche Effekte bei rApl D auszuschließen, wurde der Versuch mit Kaliumphosphatpuffer wiederholt, allerdings zeigten die Proteine keine veränderte Aktivität. Durch die begrenzte Verfügbarkeit der Proteine wurden keine höheren Proteinkonzentrationen getestet.

Die Kontrollpeptide Melittin und Cecropin P1 zeigten antimikrobielle Aktivität im nanomolaren Bereich (Tab. 14). Die meisten der bekannten kationischen antimikrobielle Peptide (AMPs) besitzen einen MIC unterhalb von $1 \mu\text{M}$, z. B. NK-Lysin (Andersson *et al.*, 1995), Arenicin (Andrä *et al.*, 2008), Acanthaporin (Michalek *et al.*, 2013), DEFA1 (Bruhn *et al.*, 2007), die *Caenopores* SPP-1, SPP-3, SPP-12 (Hoeckendorf *et al.*, 2012; Hoeckendorf und Leippe, 2012) sowie die AMPs CiMAM-A24 und CiPAP-A22 (Fedders *et al.*, 2008). Zumeist ist der MIC gegen gram-positive Bakterien deutlich niedriger als bei gram-negativen Bakterien, wobei die Cecropine dabei eine Ausnahme darstellen (Tab. 14) (Steiner *et al.*, 1981).

Auch bekannte anionische AMPs (AAMPs) zeigen potente antimikrobielle Aktivität unterhalb von $1 \mu\text{M}$, z. B. das Dermcidin (Schitteck *et al.*, 2001) oder das Theromyzin (Tasiemski *et al.*, 2004). Allerdings benötigt die Mehrheit der AAMPs höhere

Proteinkonzentrationen für die antimikrobielle Aktivität. Das ovine AAMP Enkelytin hat einen MIC von $> 600 \mu\text{M}$ (Goumon *et al.*, 1996), Insekten-AAMPs aus *Galleria mellonella* (Cytryńska *et al.*, 2007) und *Musca domestica* (Tang *et al.*, 2008) haben einen MIC von $90 \mu\text{M}$ bzw. $55 \mu\text{M}$ und für antimikrobielle Aktivität in *Xenopus laevis* werden $> 250 \mu\text{M}$ (Brogden *et al.*, 1997) eines Propetidfragments des Hormons PYL benötigt. Daher wird in unterschiedlichen Organismen eine alternative Funktion der AAMPs diskutiert. So wird eine synergistische oder ergänzende Funktion der AAMPs zusammen mit den kationischen AMPs oder eine spezielle Rolle bei der Abwehr von potenziellen Pathogenen an mukösen Epithelien für möglich gehalten (Harris *et al.*, 2009). Für rApl B2 und rApl D ist solche eine Funktion denkbar, da der die Proteine im Mikrosuszeptibilitätstest keine Aktivität zeigten. In *Dictyostelium* sind bis dato jedoch keine kationischen AMPs beschrieben worden. Allerdings liegt der isoelektrische Punkt von Apl F2 mit pI 8,2 im kationischen Bereich.

Zur Analyse des antimikrobiellen Wirkspektrums wurden die Proteine rApl B2 und rApl D gegen verschiedene Bakterien im sensitiven SYTOX Green-Assay getestet. Die Proteine permeabilisierten die Membran von *B. megaterium*-Bakterien (**Abb. 28 A**, **Abb. 31**). Die Membran von *E. coli* oder *K. pneumoniae* wurde bis zu einer Konzentration von $5 \mu\text{M}$ nicht permeabilisierte (**Abb. 28 B**, **Abb. 29**, **Abb. 30**), ebenso wie die Membran der Hefe *S. cerevisiae* (**Abb. 34**) oder die Membran von *D. discoideum* (**Abb. 33**) selbst. Die Analyse des Wirkmechanismus zeigte für rApl B2 und rApl D jeweils porenbildende Aktivität gegen Liposomen (**Abb. 35**). Die Aktivität war an einen sauren pH und zumindest bei rApl D an die korrekte Faltung des Proteins gebunden (**Abb. 36**).

Als Bodenbewohner nordamerikanischer Laubwälder muss sich *D. discoideum* mit einer großen Anzahl verschiedener Bakterien auseinandersetzen, unter anderen mit Bakterien der Gattung *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Pseudomonas* und *Flavobacterium* (Brock *et al.*, 2011). Manche werden einfach als Futterquelle genutzt, andere Bakterien haben pathogenes Potenzial (*Klebsiella*, *Legionella*, *Mycobacteria*). Wenn man einer solchen Vielfalt unterschiedlicher Bedrohungen ausgesetzt ist, sollte man entweder ein antimikrobielles System parat haben, das gleich gut gegen verschiedene Bakterien wirkt, oder man besitzt ein Arsenal unterschiedlicher Proteine, die speziell gegen einzelne Mikroorganismen eingesetzt werden können. In *Dictyostelium* existieren potenziell 33 verschiedene Apls und 14 Lysozyme, die für eine spezifische Antwort auf verschiedene Bakterien eingesetzt werden könnten. Die einzelnen Apls könnten sich in ihrem Wirkspektrum überlappen und komplementär ergänzen. Ebenso könnten die Apls

mit den Lysozymen einen synergistischen Effekte bewirken, wie er auch für *Entamoeba histolytica* postuliert wurde (Jacobs und Leippe, 1995).

Bei der *Dictyostelium*-Konferenz 2008 wurde von Mitarbeitern der Arbeitsgruppen um Prof. Gad Shaulsky und Prof. Adam Kuspa ein Poster präsentiert, das erste Hinweise darauf gibt, dass die Amöben zwischen unterschiedlichen Bakterien unterscheiden können (Nasser *et al.*, 2008). So wächst die Mutante für *nagB1*, eine Glukosamin-6-Phosphat-Isomerase, nicht auf gram-positiven Bakterien, während bei der Mutante für *alyL* das Wachstum auf gram-negativen Bakterien eingeschränkt ist. Ebenso wächst die Mutante für *tirA* zwar auf *Bacillus subtilis*-Bakterien, jedoch nicht auf *Klebsiella aerogenes*. Es existieren folglich Proteine, die für das Wachstum auf bestimmten Bakterien unverzichtbar sind. Außerdem wurde das Transkriptom von Amöben, die auf *B. subtilis* bzw. auf *K. aerogenes* kultiviert wurden, miteinander verglichen. Dabei wurden zwischen 250 und 300 Gene mehr als 4fach hoch- oder herunterreguliert (Nasser *et al.*, 2008), was als Hinweis auf spezifische Antwortmöglichkeiten der Amöbe gewertet werden kann. Bis dato (April 2013) fehlt eine offizielle Veröffentlichung, die diese These mit entsprechenden Ergebnisse unterstützt. Die Theorie könnte die große Anzahl verschiedener Apls und Lysozyme in *Dictyostelium* erklären. Dann wären die einzelnen Apls nur gegen bestimmte Bakterien aktiv.

Für den Laborstamm *Dictyostelium discoideum* Ax2 sind die gram-negativen Bakterien *Escherichia coli* und *Klebsiella pneumoniae aerogenes* sowie die gram-positiven Bakterien *Bacillus megaterium* als Futterbakterien etabliert. Gram-positive unterscheiden sich von gram-negativen Bakterien durch einen unterschiedlichen Zellwandaufbau. Während gram-positive Bakterien eine dicke Mureinhülle aus Peptidoglykan über der zytoplasmatischen Membran besitzen, ist die Mureinhülle bei gram-negativen Bakterien sehr dünn. Dafür sind diese Bakterien von einer weiteren Lipiddoppelschicht, der äußeren Membran, umhüllt. Die innen liegende Lipidschicht der äußeren Membran besteht zum Großteil aus Phospholipiden. Die äußere Schicht ist aus Lipopolysacchariden (LPS) zusammengesetzt, welche aus einer membrangebundenen Lipid A-Region, einer Kernregion und einer Reihe endständiger Zucker aufgebaut sind (Burton und Carter, 1964). Beim Abbau der Bakterien wird LPS als Endotoxin freigesetzt und bewirkt eine entsprechende Immunantwort, z. B. die Freisetzung antimikrobieller Peptide. Ein weiterer Unterschied ist die Zusammensetzung der inneren bakteriellen Membranen. In *E. coli* besteht die Membran zu 80 % aus Phosphatidylethanolamin, zu 15 % aus Phosphatidylglycerin und zu 2 % aus Cardiolipin (Diphosphatidylglycerin) (Ingram, 1977), während in *B. megaterium* die Membran zur Hälfte aus Cardiolipin, zu

34 % aus Phosphatidylethanolamin und zu 11 % aus Phosphatidylglycerin besteht (Demant *et al.*, 1979). Beim Cardiolipin, einem Dimer aus zwei Phosphatidylglycerinen, sorgen die beiden Phosphatgruppen für eine negative Ladung, während beim Phosphatidylethanolamin durch eine endständige Aminogruppe eine positive Teilladung entsteht. Insgesamt wird die Ladung der Membran dennoch negativ ausfallen, was wichtig für die Bindung kationischer Proteine ist.

Die getesteten anionischen Proteine rApl B2 und rApl D zeigten in allen Tests eine Präferenz für niedrige pH-Werte. Dies könnte auf eine partielle Protonierung der Membran im sauren Milieu zurückzuführen sein, da die entstandenen positiven Teilladungen der Lipidkopfgruppen die Bindung der anionischen Proteine ermöglicht.

Im Liposomendepolarisationstest werden zur Herstellung der Liposomen Lipide aus der Sojabohne verwendet. Das relativ unreine Ausgangsmaterial enthält neben Phosphatidylcholin auch Phosphatidylethanolamin und Phosphatidylinositol, welches sich durch einen sechswertigen zyklischen Alkoholring auszeichnet. Die Lipidzusammensetzung ähnelt damit eher der Membran von *E. coli* als von *B. megaterium*. Auch im Liposomendepolarisationstest zeigen die Proteine rApl B2 und rApl D eine deutliche Präferenz für niedrige pH-Werte. Oberhalb von pH 5,6 haben die Proteine rApl B2 und rApl D keine nennenswerte porenbildende Aktivität, bei den pH-Werten pH 4,8 und pH 4,4 entspricht die Aktivität einem Vielfachen der Aktivität von Alamethicin, dem Peptid für die Positivkontrolle. Unterschiedlich ist die Aktivität von rApl B2 und rApl D bei pH 5,2. Der starken Aktivität von rApl D (135 U/nmol) steht eine geringe Aktivität von rApl B2 (7 U/nmol) gegenüber. Ein entscheidender Unterschied zwischen den Proteinen ist die erheblich negativere Ladung von rApl D (Nettoladung bei pH 7,0: - 8,3) gegenüber rApl B2 (Nettoladung: - 2,3). Die weniger negative Ladung von rApl B2 würde jedoch eher Aktivität bei höheren pH-Werten erklären, z.B. die leichte Aktivität bei den pH-Werten pH 5,6 und pH 6,4. Alamethicin hat eine Nettoladung von -1 bei pH 7,0 und zeigt eine leichte Präferenz für höhere pH-Werte. Offensichtlich spielen bei dem Test auf porenbildende Aktivität noch andere Faktoren außer der Ladung eine Rolle.

Zusätzlich wurde untersucht, ob rApl D mit Lipiden, die weder bei Bakterien noch in der Sojabohne vorkommen, interagiert. Dafür wurde das Protein auf hämolytische Aktivität gegen Hammel-Erythrozyten getestet. Die Membran der Blutzellen besitzt einen großen Anteil an Sphingomyelin und wenig Phosphatidylcholin (Kasárov, 1970), während die Bakterienmembran zum Großteil aus Phosphatidylethanolamin und Phosphatidylglycerin besteht. Das Protein rApl D zeigte jedoch keine hämolytische Aktivität.

Ebenso wurde rApl D auf membranpermeabilisierende Aktivität gegen *Saccharomyces cerevisiae* und *Dictyostelium discoideum* getestet. Die Membran der Hefen besteht zu ähnlich großen Anteilen aus Phosphatidylcholin, Phosphatidylethanolamin, Phosphatidylinositol, Phosphatidylserin und Sphingomyelin (Van der Rest *et al.*, 1995). Die Membran der Amöben enthält zur Hälfte Phosphatidylethanolamin, ~ 30 % Phosphatidylcholin und 7 % Phosphatidylinositol (Weeks und Herring, 1980). Im SYTOX Green-Assay zeigte rApl D keine Aktivität gegen die beiden Eukaryoten nach 180 min bzw. 60 min Inkubation.

Für verschiedene AAMPs ist bekannt, dass sie erst nach der Zugabe von bestimmten Ionen ihre antimikrobielle Aktivität entfalten (Harris *et al.*, 2009). Für humanes Dermcidin ist bekannt, dass Zinkionen an der Ausbildung von Salzbrücken und eines Membrankanals benötigt werden (Song *et al.*, 2013). Daher wurde der SYTOX Green-Assay mit der Zugabe von 10 μM Zn^{2+} bzw. 1 mM Mg^{2+} komplementiert und die Aktivität gegen *Klebsiella pneumoniae* KP21 getestet, allerdings zeigte sich keine veränderte Aktivität.

Zusammenfassend konnte den Proteinen rApl B2 und rApl D keine eindeutige Präferenz für bestimmte Phospholipide zugewiesen werden. Dafür müsste die einzelnen Lipide im *Calcein-release Assay* mit reinen Liposomen bestehend aus unterschiedlichen Lipiden getestet werden, wie es bei Hoeckendorf *et al.* (2012) durchgeführt wurde. Die Aktivität gegen Liposomen müsste eine Aktivität gegen die eukaryotischen Zellen oder *E. coli*-Bakterien nach sich ziehen, jedoch zeigten die Proteine im Membranpermeabilisationstest lediglich Aktivität gegen *B. megaterium*-Bakterien mit einem hohen Anteil an Cardiolipin. Die porenbildende Aktivität der Proteine war bei niedrigen pH-Werten deutlich erhöht, wobei das anionischere rApl D im Gegensatz zu rApl B2 auch noch bei pH 5,2 aktiv war.

Eine alternative Funktion von Apl D könnte man während des Entwicklungszyklus vermuten, da die Transkriptionsanalyse für *aplD* eine stark erhöhte Expression des Gens während der Entwicklung, insbesondere in der *slug*-Phase und im Fruchtkörper, zeigte. Auch das natürliche Protein Apl D wurde bisher nur bei der proteomischen Analyse von *slugs* identifiziert. Da das Protein eine Präferenz für niedrige pH-Werte besitzt und mit Lipiden interagiert, habe ich vermutet, dass das Protein eventuell eine Rolle während des programmierten Zelltodes und der Autophagie spielt. Allerdings sind die Effekte von Autophagie erst nach verlängerter Inkubationszeit zu sehen (Tresse *et al.*, 2008). Deshalb wurde das Protein gegen *Dictyostelium*-Zellen mit einer Inkubationszeit von

18 h getestet, jedoch zeigten die Zellen bis zu einer Konzentration von 5 μM keine morphologischen Veränderungen (**Abb. 33 B**).

Die geringe antimikrobielle Aktivität der Proteine könnte auf das Fehlen von posttranslationalen Modifikationen zurückzuführen sein. Für Apl B2 und Apl D ist eine N-Glykosylierung in der Mitte der SAPLIP-Domäne vorhergesagt, die bei den in einem prokaryotischen System hergestellten rekombinanten Proteinen fehlen würde. Allerdings konnte für die *Naegleriapores* A und B gezeigt werden, dass eine Deglykosylierung keinen Einfluss auf die Aktivität der Proteine hat (Herbst *et al.*, 2002). Hingegen konnte die Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Pierre Cosson zeigen, dass sulfatierte Proteine für die effiziente Verwertung von *Klebsiella*-Bakterien benötigt werden (Le Coadic *et al.*, 2013). Eine *Knock-out*-Mutante für *kil1*, einer Sulfotransferase, zeigte eine verringerte Phagozytoserate der Bakterien (Benghezal *et al.*, 2006). Für Apl B2 und Apl D ist unbekannt, ob die Proteine in *Dictyostelium* sulfatiert vorliegen oder nicht. In *E. coli* ist die Herstellung sulfatierter Proteine möglich (Liu und Schultz, 2006), jedoch für die in dieser Arbeit hergestellten Proteine unwahrscheinlich.

Theoretisch ist auch eine alternative Funktion für Apl B2 oder Apl D denkbar. Das Protein SAPLIP 3 aus *Entamoeba histolytica* ähnelt in Größen und Aminosäuresequenz dem antimikrobiellen Protein *Amoebapore* A (Winkelman *et al.*, 2006). Daher wurde dem Protein auch eine Funktion bei der Abwehr und Verwertung von Bakterien zugeschrieben. Allerdings zeigte rekombinant hergestelltes SAPLIP 3 weder antimikrobielle noch membranpermeabilisierende oder porenbildende Aktivität. Das Protein zerstört nicht die Liposomenstruktur wie z. B. *Amoebapore* A, sondern vermittelt die Fusion von multilamellaren Liposomen unter teilweiser Freisetzung des Liposomeninhalts. Es ähnelt dabei mehr dem humanen Saposin C, welches ebenso wie SAPLIP 3 eine sehr niedrige Nettoladung besitzt (SAPLIP 3: -7 und Saposin C: -8). SAPLIP 3 könnte daher eine Rolle bei der Organisation von endo- und exozytotischen Transportprozessen spielen. Auch für Apl B2 und Apl D ist eine solche Funktion möglich.

In dieser Arbeit wurde die antimikrobielle Aktivität der Apls aus *Dictyostelium discoideum* nachgewiesen. Die beiden Proteine rApl B2 und rApl D zeigen membranpermeabilisierende Aktivität gegen *B. megaterium*. Des Weiteren bilden die Proteine in künstlichen Liposomen Poren. Jedoch zeigten die Proteine keine membranpermeabilisierende Aktivität gegen die gram-negativen Bakterien

Klebsiella pneumoniae oder *E. coli* noch inhibierten rApl B2 und rApl D das Wachstum von *B. megaterium* oder *E. coli* im Mikrosuszeptibilitätstest bis zu einer Konzentration von 5 μM für rApl B2 und 50 μM für rApl D.

In weiterführenden Experimenten könnten die Proteine gegen weitere Bakterienspezies getestet werden, um das antimikrobielle Wirkspektrum eingehender zu charakterisieren. Für *Dictyostelium* wird seit längerem eine Theorie diskutiert, die besagt, dass die Amöben genau zwischen verschiedenen Bakterien differenzieren können und eine Reihe unterschiedlicher Effektormoleküle besitzen, die spezifisch gegen bestimmte Bakterien wirken. Es besteht folglich die Möglichkeit, dass die Apls sehr potente antimikrobielle Peptide darstellen, lediglich in dieser Arbeit nicht die richtigen Bakterien für die Analyse der *In-vitro*-Aktivität ausgewählt wurden.

Des Weiteren sind diverse AAMPs erst bei sehr hohen Konzentrationen aktiv, wobei zu diskutieren wäre, ob ein Protein als antimikrobiell gilt, wenn Konzentrationen jenseits von 600 μM zur Inhibition des Bakterienwachstums benötigt werden. Für die Proteine rApl B2 und rApl D wurden aufgrund der schwierigen rekombinanten Expression maximale Proteinkonzentrationen von 5 μM bzw. 50 μM eingesetzt. Es wäre dem entsprechend interessant, das antimikrobielle Spektrum der Proteine bei z. B. 600 μM zu testen.

6 Literaturverzeichnis

- Adl, S. M., Simpson, A. G. B., Farmer, M. a, Andersen, R. a, Anderson, O. R., Barta, J. R., Bowser, S. S., Brugerolle, G., Fensome, R. a, Fredericq, S., James, T. Y., Karpov, S., Kugrens, P., Krug, J., Lane, C. E., Lewis, L. a, Lodge, J., Lynn, D. H., Mann, D. G., McCourt, R. M., Mendoza, L., Moestrup, O., Mozley-Standridge, S. E., Nerad, T. a, Shearer, C. a, Smirnov, A. V, Spiegel, F. W., & Taylor, M. F. J. R. (2005). The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists. *The Journal of eukaryotic microbiology*, 52, 399–451.
- Aerts, a M., François, I. E. J. a, Cammue, B. P. a, & Thevissen, K. (2008). The mode of antifungal action of plant, insect and human defensins. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 65, 2069–79.
- Ahn, V. E., Faull, K. F., Whitelegge, J. P., Fluharty, A. L., & Privé, G. G. (2003). Crystal structure of saposin B reveals a dimeric shell for lipid binding. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100, 38–43.
- Ahn, V. E., Leyko, P., Alattia, J.-R., Chen, L., & Privé, G. G. (2006). Crystal structures of saposins A and C. *Protein science : a publication of the Protein Society*, 15, 1849–57.
- Akira, S., Uematsu, S., & Takeuchi, O. (2006). Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*, 124, 783–801.
- De Alba, E., Weiler, S., & Tjandra, N. (2003). Solution structure of human saposin C: pH-dependent interaction with phospholipid vesicles. *Biochemistry*, 42, 14729–40.
- Anderson, D. H., Sawaya, M. R., Cascio, D., Ernst, W., Modlin, R., Krensky, A., & Eisenberg, D. (2003). Granulysin crystal structure and a structure-derived lytic mechanism. *Journal of molecular biology*, 325, 355–65.
- Andersson, M., Curstedt, T., Jörnvall, H., & Johansson, J. (1995). An amphipathic helical motif common to tumourolytic polypeptide NK-lysin and pulmonary surfactant polypeptide SP-B. *FEBS letters*, 362, 328–32.
- Andersson, M., Gunne, H., Agerberth, B., Boman, A., Bergman, T., Sillard, R., Jörnvall, H., Mutt, V., Olsson, B., & Wigzell, H. (1995). NK-lysin, a novel effector peptide of cytotoxic T and NK cells. Structure and cDNA cloning of the porcine form, induction by interleukin 2, antibacterial and antitumour activity. *The EMBO journal*, 14, 1615–25.
- Andrä, J., Berninghausen, O., & Leippe, M. (2004). Membrane lipid composition protects *Entamoeba histolytica* from self-destruction by its pore-forming toxins. *FEBS letters*, 564, 109–15.

-
- Andrä, J., Jakovkin, I., Grötzinger, J., Hecht, O., Krasnosdembkaya, A. D., Goldmann, T., Gutschmann, T., & Leippe, M. (2008). Structure and mode of action of the antimicrobial peptide arenicin. *The Biochemical journal*, *410*, 113–22.
- Appelt, C., Schrey, A. K., Söderhäll, J. A., & Schmieder, P. (2007). Design of antimicrobial compounds based on peptide structures. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, *17*, 2334–7.
- Arnold, K., Bordoli, L., Kopp, J., & Schwede, T. (2006). The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics (Oxford, England)*, *22*, 195–201.
- Aubert, D. F., Flannagan, R. S., & Valvano, M. a. (2008). A novel sensor kinase-response regulator hybrid controls biofilm formation and type VI secretion system activity in *Burkholderia cenocepacia*. *Infection and immunity*, *76*, 1979–91.
- Aubry, L., Klein, G., Martiel, J. L., & Satre, M. (1993). Kinetics of endosomal pH evolution in *Dictyostelium discoideum* amoebae. Study by fluorescence spectroscopy. *Journal of cell science*, *105 (Pt 3)*, 861–6.
- Bakthavatsalam, D., & Gomer, R. H. (2010). The secreted proteome profile of developing *Dictyostelium discoideum* cells. *Proteomics*, *10*, 2556–9.
- Bellamy, R. (2003). Susceptibility to mycobacterial infections: the importance of host genetics. *Genes and immunity*, *4*, 4–11.
- Bendtsen, J. D., Nielsen, H., Von Heijne, G., & Brunak, S. (2004). Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *Journal of molecular biology*, *340*, 783–95.
- Benghezal, M., Fauvarque, M.-O., Tournebize, R., Froquet, R., Marchetti, A., Bergeret, E., Lardy, B., Klein, G., Sansonetti, P., Charette, S. J., & Cosson, P. (2006). Specific host genes required for the killing of *Klebsiella* bacteria by phagocytes. *Cellular microbiology*, *8*, 139–48.
- Bergeret, E., Perrin, J., Williams, M., Grunwald, D., Engel, E., Thevenon, D., Taillebourg, E., Bruckert, F., Cosson, P., & Fauvarque, M.-O. (2008). TM9SF4 is required for *Drosophila* cellular immunity via cell adhesion and phagocytosis. *Journal of cell science*, *121*, 3325–34.
- Berks, M., & Kay, R. R. (1990). Combinatorial control of cell differentiation by cAMP and DIF-1 during development of *Dictyostelium discoideum*. *Development (Cambridge, England)*, *110*, 977–84.
- Bitzhenner, M. (2008). Molekulare Charakterisierung antimikrobieller Polypeptide von *Dictyostelium discoideum*. 101.
- Blackwell, J. M., Searle, S., Mohamed, H., & White, J. K. (2003). Divalent cation transport and susceptibility to infectious and autoimmune disease: continuation of the *Ity/Lsh/Bcg/Nramp1/Slc11a1* gene story. *Immunology letters*, *85*, 197–203.

-
- Boman, H. G., Agerberth, B., & Boman, A. (1993). Mechanisms of action on *Escherichia coli* of cecropin P1 and PR-39, two antibacterial peptides from pig intestine. *Infection and immunity*, *61*, 2978–84.
- Boman, H. G., Nilsson-Faye, I., Paul, K., & Rasmuson, T. (1974). Insect immunity. I. Characteristics of an inducible cell-free antibacterial reaction in hemolymph of *Samia cynthia* pupae. *Infection and immunity*, *10*, 136–45.
- Bonifait, L., Charette, S. J., Filion, G., Gottschalk, M., & Grenier, D. (2011). Amoeba host model for evaluation of *Streptococcus suis* virulence. *Applied and environmental microbiology*, *77*, 6271–3.
- Bonner, J. T. (1993). Proteolysis and orientation in *Dictyostelium* slugs. *Journal of general microbiology*, *139*, 2319–22.
- Bonner, J. T., Hay, A., John, D. G., & Suthers, H. B. (1985). pH affects fruiting and slug orientation in *Dictyostelium discoideum*. *Journal of embryology and experimental morphology*, *87*, 207–13.
- Boulais, J., Trost, M., Landry, C. R., Dieckmann, R., Levy, E. D., Soldati, T., Michnick, S. W., Thibault, P., & Desjardins, M. (2010). Molecular characterization of the evolution of phagosomes. *Molecular systems biology*, *6*, 423.
- Bozzaro, S., Bucci, C., & Steinert, M. (2008). Phagocytosis and host-pathogen interactions in *Dictyostelium* with a look at macrophages. *International review of cell and molecular biology*, *271*, 253–300.
- Bradová, V., Smíd, F., Ulrich-Bott, B., Roggendorf, W., Paton, B. C., & Harzer, K. (1993). Prosaposin deficiency: further characterization of the sphingolipid activator protein-deficient sibs. Multiple glycolipid elevations (including lactosylceramidosis), partial enzyme deficiencies and ultrastructure of the skin in this generalized sphingolip. *Human genetics*, *92*, 143–52.
- Braun, V., Hantke, K., Wolff, H., & Gerisch, G. (1972). Degradation of the murein-lipoprotein complex of *Escherichia coli* cell walls by *Dictyostelium amoebae*. *European journal of biochemistry / FEBS*, *27*, 116–25.
- Brefeld, O. (1869). *Dictyostelium mucoroides*. Ein neuer Organismus aus der Verwandtschaft der Myxomyceten. *Abhandlungen der senckenbergischen naturforschenden Gesellschaft*, *7*, 85 – 107.
- Brock, D. A., Douglas, T. E., Queller, D. C., & Strassmann, J. E. (2011). Primitive agriculture in a social amoeba. *Nature*, *469*, 393–6.
- Brock, D. A., Van Egmond, W. N., Shamo, Y., Hatton, R. D., & Gomer, R. H. (2006). A 60-kilodalton protein component of the counting factor complex regulates group size in *Dictyostelium discoideum*. *Eukaryotic cell*, *5*, 1532–8.
- Brock, D. a, & Gomer, R. H. (1999). A cell-counting factor regulating structure size in *Dictyostelium*. *Genes & development*, *13*, 1960–9.

-
- Brock, D. A., Hatton, R. D., Giurgiutiu, D.-V., Scott, B., Ammann, R., & Gomer, R. H. (2002). The different components of a multisubunit cell number-counting factor have both unique and overlapping functions. *Development (Cambridge, England)*, *129*, 3657–68.
- Brock, D. A., Hatton, R. D., Giurgiutiu, D., Scott, B., Jang, W., Ammann, R., & Gomer, R. H. (2003). CF45-1, a secreted protein which participates in Dictyostelium group size regulation. *Eukaryotic cell*, *2*, 788–97.
- Brogden, K. A. (2005). Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nature reviews. Microbiology*, *3*, 238–50.
- Brogden, K. a, Ackermann, M., & Huttner, K. M. (1997). Small, anionic, and charge-neutralizing propeptide fragments of zymogens are antimicrobial. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, *41*, 1615–7.
- Brogden, K. a, De Lucca, a J., Bland, J., & Elliott, S. (1996). Isolation of an ovine pulmonary surfactant-associated anionic peptide bactericidal for *Pasteurella haemolytica*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *93*, 412–6.
- Bruhn, H. (2005). A short guided tour through functional and structural features of saposin-like proteins. *The Biochemical journal*, *389*, 249–57.
- Bruhn, O., Regenhard, P., Michalek, M., Paul, S., Gelhaus, C., Jung, S., Thaller, G., Podschun, R., Leippe, M., Grötzinger, J., & Kalm, E. (2007). A novel horse alpha-defensin: gene transcription, recombinant expression and characterization of the structure and function. *The Biochemical journal*, *407*, 267–76.
- Bruhn, H., Riekens, B., Berninghausen, O., & Leippe, M. (2003). Amoebapores and NK-lysin, members of a class of structurally distinct antimicrobial and cytolytic peptides from protozoa and mammals: a comparative functional analysis. *The Biochemical journal*, *375*, 737–44.
- Burton, A. J., & Carter, H. E. (1964). Purification and characterization of the Lipid A component of the lipopolysaccharides from *Escherichia coli*. *Biochemistry*, *3*, 411–8.
- Calvo-Garrido, J., Carilla-Latorre, S., Kubohara, Y., Santos-Rodrigo, N., Mesquita, A., Soldati, T., Golstein, P., & Escalante, R. (2010). Autophagy in Dictyostelium: genes and pathways, cell death and infection. *Autophagy*, *6*, 686–701.
- Calvo-Garrido, J., Carilla-Latorre, S., Lázaro-Diéguez, F., Egea, G., & Escalante, R. (2008). Vacuole membrane protein 1 is an endoplasmic reticulum protein required for organelle biogenesis, protein secretion, and development. *Molecular biology of the cell*, *19*, 3442–53.
- Carilla-Latorre, S., Calvo-Garrido, J., Bloomfield, G., Skelton, J., Kay, R. R., Ivens, A., Martinez, J. L., & Escalante, R. (2008). Dictyostelium transcriptional responses to *Pseudomonas aeruginosa*: common and specific effects from PAO1 and PA14 strains. *BMC microbiology*, *8*, 109.

-
- Chen, G. C., & Yang, J. T. (1977). Two-point calibration of circular dichroism with D-10-camphorsulfonic acid. *Analytical Letters*, *10*, 1195–1207.
- Chen, G., Zhuchenko, O., & Kuspa, A. (2007). Immune-like phagocyte activity in the social amoeba. *Science (New York, N.Y.)*, *317*, 678–81.
- Ciaffoni, F., Salvioli, R., Tatti, M., Arancia, G., Crateri, P., & Vaccaro, M. (2001). Saposin D solubilizes anionic phospholipid-containing membranes. *The Journal of biological chemistry*, *276*, 31583–9.
- Clarke, M., & Madder, L. (2006). Phagocyte meets prey: uptake, internalization, and killing of bacteria by *Dictyostelium amoebae*. *European journal of cell biology*, *85*, 1001–10.
- Le Coadic, M., Froquet, R., Lima, W. C., Dias, M., Marchetti, A., & Cosson, P. (2013). Phg1/TM9 proteins control intracellular killing of bacteria by determining cellular levels of the Kil1 sulfotransferase in *Dictyostelium*. *PloS one*, *8*, e53259.
- Colucci, A. M. R., Peracino, B., Tala, A., Bozzaro, S., Alifano, P., & Bucci, C. (2008). *Dictyostelium discoideum* as a model host for meningococcal pathogenesis. *Medical science monitor: international medical journal of experimental and clinical research*, *14*, BR134–40.
- Cornillon, S., Foa, C., Davoust, J., Buonavista, N., Gross, J. D., & Golstein, P. (1994). Programmed cell death in *Dictyostelium*. *Journal of cell science*, *107* (Pt 1), 2691–704.
- Cornillon, S., Gebbie, L., Benghezal, M., Nair, P., Keller, S., Wehrle-Haller, B., Charette, S. J., Brückert, F., Letourneur, F., & Cosson, P. (2006). An adhesion molecule in free-living *Dictyostelium amoebae* with integrin beta features. *EMBO reports*, *7*, 617–21.
- Cornillon, S., Pech, E., Benghezal, M., Ravanel, K., Gaynor, E., Letourneur, F., Brückert, F., & Cosson, P. (2000). Phg1p is a nine-transmembrane protein superfamily member involved in *dictyostelium* adhesion and phagocytosis. *The Journal of biological chemistry*, *275*, 34287–92.
- Cosson, P., & Soldati, T. (2008). Eat, kill or die: when amoeba meets bacteria. *Current opinion in microbiology*, *11*, 271–6.
- Cosson, P., Zulianello, L., Join-Lambert, O., Faurisson, F., Gebbie, L., Benghezal, M., Van Delden, C., Curty, L. K., & Köhler, T. (2002). *Pseudomonas aeruginosa* virulence analyzed in a *Dictyostelium discoideum* host system. *Journal of bacteriology*, *184*, 3027–33.
- Cotter, D. A., & Raper, K. B. (1966). Spore germination in *Dictyostelium discoideum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *56*, 880–7.
- Critchley, D. R. (2005). Genetic, biochemical and structural approaches to talin function. *Biochemical Society transactions*, *33*, 1308–12.

-
- Cudic, M., & Otvos, L. (2002). Intracellular targets of antibacterial peptides. *Current drug targets*, 3, 101–6.
- Cytryńska, M., Mak, P., Zdybicka-Barabas, A., Suder, P., & Jakubowicz, T. (2007). Purification and characterization of eight peptides from *Galleria mellonella* immune hemolymph. *Peptides*, 28, 533–46.
- Darmoise, A., Maschmeyer, P., & Winau, F. (2010). The immunological functions of saposins. *Advances in immunology*, 105, 25–62.
- Demant, E. J., Op den Kamp, J. a, & Van Deenen, L. L. (1979). Localization of phospholipids in the membrane of *Bacillus megaterium*. *European journal of biochemistry / FEBS*, 95, 613–9.
- Derman, a I., Prinz, W. a, Belin, D., & Beckwith, J. (1993). Mutations that allow disulfide bond formation in the cytoplasm of *Escherichia coli*. *Science (New York, N.Y.)*, 262, 1744–7.
- Desjardins, M., Houde, M., & Gagnon, E. (2005). Phagocytosis: the convoluted way from nutrition to adaptive immunity. *Immunological reviews*, 207, 158–65.
- Desjardins, M., Huber, L. a, Parton, R. G., & Griffiths, G. (1994). Biogenesis of phagolysosomes proceeds through a sequential series of interactions with the endocytic apparatus. *The Journal of cell biology*, 124, 677–88.
- Destoumieux-Garzón, D., Saulnier, D., Garnier, J., Jouffrey, C., Bulet, P., & Bachère, E. (2001). Crustacean immunity. Antifungal peptides are generated from the C terminus of shrimp hemocyanin in response to microbial challenge. *The Journal of biological chemistry*, 276, 47070–7.
- Dhakshinamoorthy, R. (2012). Molecular Characterisation of Antimicrobial Arsenal of *Dictyostelium discoideum*. 141.
- Dieckmann, R., Gopaldass, N., Escalera, C., & Soldati, T. (2008). Monitoring time-dependent maturation changes in purified phagosomes from *Dictyostelium discoideum*. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 445, 327–37.
- Dieckmann, R., Guého, A., Monroy, R., Ruppert, T., Bloomfield, G., & Soldati, T. (2012). The balance in the delivery of ER components and the vacuolar proton pump to the phagosome depends on myosin IK in *Dictyostelium*. *Molecular & cellular proteomics : MCP*, 11, 886–900.
- Dormann, D., Siegert, F., & Weijer, C. J. (1996). Analysis of cell movement during the culmination phase of *Dictyostelium* development. *Development (Cambridge, England)*, 122, 761–9.
- Eichinger, L., Pachebat, J. A., Glöckner, G., Rajandream, M.-A., Sucgang, R., Berriman, M., Song, J., Olsen, R., Szafranski, K., Xu, Q., Tunggal, B., Kummerfeld, S., Madera, M., Konfortov, B. A., Rivero, F., Bankier, A. T., Lehmann, R., Hamlin, N., Davies, R., Gaudet, P., Fey, P., Pilcher, K., Chen, G., Saunders, D., Sodergren, E., Davis, P., Kerhornou, A., Nie, X., Hall, N., Anjard,

- C., Hemphill, L., Bason, N., Farbrother, P., Desany, B., Just, E., Morio, T., Rost, R., Churcher, C., Cooper, J., Haydock, S., Van Driessche, N., Cronin, A., Goodhead, I., Muzny, D., Mourier, T., Pain, A., Lu, M., Harper, D., Lindsay, R., Hauser, H., et al. (2005). The genome of the social amoeba *Dictyostelium discoideum*. *Nature*, *435*, 43–57.
- Fajardo, M., Schleicher, M., Noegel, A., Bozzaro, S., Killinger, S., Heuner, K., Hacker, J., & Steinert, M. (2004). Calnexin, calreticulin and cytoskeleton-associated proteins modulate uptake and growth of *Legionella pneumophila* in *Dictyostelium discoideum*. *Microbiology (Reading, England)*, *150*, 2825–35.
- Farbrother, P., Wagner, C., Na, J., Tunggal, B., Morio, T., Urushihara, H., Tanaka, Y., Schleicher, M., Steinert, M., & Eichinger, L. (2006). *Dictyostelium* transcriptional host cell response upon infection with *Legionella*. *Cellular microbiology*, *8*, 438–56.
- Farouk, S. E., Mincheva-Nilsson, L., Krensky, A. M., Dieli, F., & Troye-Blomberg, M. (2004). Gamma delta T cells inhibit in vitro growth of the asexual blood stages of *Plasmodium falciparum* by a granule exocytosis-dependent cytotoxic pathway that requires granulysin. *European journal of immunology*, *34*, 2248–56.
- Fedders, H., Michalek, M., Grötzinger, J., & Leippe, M. (2008). An exceptional salt-tolerant antimicrobial peptide derived from a novel gene family of haemocytes of the marine invertebrate *Ciona intestinalis*. *The Biochemical journal*, *416*, 65–75.
- Fey, P., Stephens, S., Titus, M. a, & Chisholm, R. L. (2002). SadA, a novel adhesion receptor in *Dictyostelium*. *The Journal of cell biology*, *159*, 1109–19.
- Francione, L., Smith, P. K., Accari, S. L., Taylor, P. E., Bokko, P. B., Bozzaro, S., Beech, P. L., & Fisher, P. R. (2009). *Legionella pneumophila* multiplication is enhanced by chronic AMPK signalling in mitochondrially diseased *Dictyostelium* cells. *Disease models & mechanisms*, *2*, 479–89.
- Froquet, R., Cherix, N., Birke, R., Benghezal, M., Cameroni, E., Letourneur, F., Mösch, H.-U., De Virgilio, C., & Cosson, P. (2008). Control of cellular physiology by TM9 proteins in yeast and *Dictyostelium*. *The Journal of biological chemistry*, *283*, 6764–72.
- Froquet, R., Le Coadic, M., Perrin, J., Cherix, N., Cornillon, S., & Cosson, P. (2012). TM9/Phg1 and SadA proteins control surface expression and stability of SibA adhesion molecules in *Dictyostelium*. *Molecular biology of the cell*, *23*, 679–86.
- Froquet, R., Lelong, E., Marchetti, A., & Cosson, P. (2009). *Dictyostelium discoideum*: a model host to measure bacterial virulence. *Nature protocols*, *4*, 25–30.
- Galardi-Castilla, M., Pergolizzi, B., Bloomfield, G., Skelton, J., Ivens, A., Kay, R. R., Bozzaro, S., & Sastre, L. (2008). SrfB, a member of the Serum Response Factor family of transcription factors, regulates starvation response and early development in *Dictyostelium*. *Developmental biology*, *316*, 260–74.

-
- Ge, Y., MacDonald, D. L., Holroyd, K. J., Thornsberry, C., Wexler, H., & Zasloff, M. (1999). In vitro antibacterial properties of pexiganan, an analog of magainin. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 43, 782–8.
- Gebbie, L., Benghezal, M., Cornillon, S., Froquet, R., Cherix, N., Malbouyres, M., Lefkir, Y., Grangeasse, C., Fache, S., Dalous, J., Brückert, F., Letourneur, F., & Cosson, P. (2004). Phg2, a kinase involved in adhesion and focal site modeling in Dictyostelium. *Molecular biology of the cell*, 15, 3915–25.
- Gilsbach, B. K., Ho, F. Y., Vetter, I. R., Van Haastert, P. J. M., Wittinghofer, A., & Kortholt, A. (2012). Roco kinase structures give insights into the mechanism of Parkinson disease-related leucine-rich-repeat kinase 2 mutations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109, 10322–7.
- Giusti, C., Tresse, E., Luciani, M.-F., & Golstein, P. (2009). Autophagic cell death: analysis in Dictyostelium. *Biochimica et biophysica acta*, 1793, 1422–31.
- Goidl, E. A., Chassy, B. M., Love, L. L., & Krichevsky, M. I. (1972). Inhibition of aggregation and differentiation of Dictyostelium discoideum by antibodies against adenosine 3':5'-cyclic monophosphate diesterase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 69, 1128–30.
- Gomer, R. H. (2001). Not being the wrong size. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 2, 48–54.
- González, C., Langdon, G. M., Bruix, M., Gálvez, A., Valdivia, E., Maqueda, M., & Rico, M. (2000). Bacteriocin AS-48, a microbial cyclic polypeptide structurally and functionally related to mammalian NK-lysin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97, 11221–6.
- Gotthardt, D., Blancheteau, V., Bosserhoff, A., Ruppert, T., Delorenzi, M., & Soldati, T. (2006). Proteomics fingerprinting of phagosome maturation and evidence for the role of a Galpha during uptake. *Molecular & cellular proteomics : MCP*, 5, 2228–43.
- Goumon, Y., Strub, J. M., Moniatte, M., Nullans, G., Poteur, L., Hubert, P., Van Dorsselaer, A., Aunis, D., & Metz-Boutigue, M. H. (1996). The C-terminal bisphosphorylated proenkephalin-A-(209-237)-peptide from adrenal medullary chromaffin granules possesses antibacterial activity. *European journal of biochemistry / FEBS*, 235, 516–25.
- Hagedorn, M., Rohde, K. H., Russell, D. G., & Soldati, T. (2009). Infection by tubercular mycobacteria is spread by nonlytic ejection from their amoeba hosts. *Science (New York, N.Y.)*, 323, 1729–33.
- Hagedorn, M., & Soldati, T. (2007). Flotillin and RacH modulate the intracellular immunity of Dictyostelium to Mycobacterium marinum infection. *Cellular microbiology*, 9, 2716–33.

-
- 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*. *Cellular microbiology*, 2, 165–71.
- Hall, C. L., & Munford, R. S. (1983). Enzymatic deacylation of the lipid A moiety of *Salmonella typhimurium* lipopolysaccharides by human neutrophils. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 80, 6671–5.
- Harris, F., Dennison, S. R., & Phoenix, D. a. (2009). Anionic antimicrobial peptides from eukaryotic organisms. *Current protein & peptide science*, 10, 585–606.
- Hashimoto, Y., Orellana, A., Gil, G., & Hirschberg, C. B. (1992). Molecular cloning and expression of rat liver N-heparan sulfate sulfotransferase. *The Journal of biological chemistry*, 267, 15744–50.
- Hasselbring, B. M., Patel, M. K., & Schell, M. a. (2011). *Dictyostelium discoideum* as a model system for identification of *Burkholderia pseudomallei* virulence factors. *Infection and immunity*, 79, 2079–88.
- He, K., Ludtke, S. J., Worcester, D. L., & Huang, H. W. (1996). Neutron scattering in the plane of membranes: structure of alamethicin pores. *Biophysical journal*, 70, 2659–66.
- Hecht, O., Van Nuland, N. a, Schleinkofer, K., Dingley, A. J., Bruhn, H., Leippe, M., & Grötzinger, J. (2004). Solution structure of the pore-forming protein of *Entamoeba histolytica*. *The Journal of biological chemistry*, 279, 17834–41.
- Hemmes, D. E., Kojima-Buddenhagen, E. S., & Hohl, H. R. (1972). Structural and enzymatic analysis of the spore wall layers in *Dictyostelium discoideum*. *Journal of ultrastructure research*, 41, 406–17.
- Herbst, R., Marciano-Cabral, F., & Leippe, M. (2004). Antimicrobial and pore-forming peptides of free-living and potentially highly pathogenic *Naegleria fowleri* are released from the same precursor molecule. *The Journal of biological chemistry*, 279, 25955–8.
- Herbst, R., Ott, C., Jacobs, T., Marti, T., Marciano-Cabral, F., & Leippe, M. (2002). Pore-forming polypeptides of the pathogenic protozoon *Naegleria fowleri*. *The Journal of biological chemistry*, 277, 22353–60.
- Heukeshoven, J., & Dernick, R. (1985). Simplified method for silver staining of proteins in polyacrylamide gels and the mechanism of silver staining. *Electrophoresis*, 6, 103–112.
- Hoeckendorf, A., & Leippe, M. (2012). SPP-3, a saposin-like protein of *Caenorhabditis elegans*, displays antimicrobial and pore-forming activity and is located in the intestine and in one head neuron. *Developmental and comparative immunology*, 38, 181–6.

-
- Hoeckendorf, A., Stanisak, M., & Leippe, M. (2012). The saposin-like protein SPP-12 is an antimicrobial polypeptide in the pharyngeal neurons of *Caenorhabditis elegans* and participates in defence against a natural bacterial pathogen. *The Biochemical journal*, *445*, 205–12.
- Hoover, D. M., Boulegue, C., Yang, D., Oppenheim, J. J., Tucker, K., Lu, W., & Lubkowski, J. (2002). The structure of human macrophage inflammatory protein-3 α /CCL20. Linking antimicrobial and CC chemokine receptor-6-binding activities with human beta-defensins. *The Journal of biological chemistry*, *277*, 37647–54.
- Ilievska, J., Annesley, S. J., Bishop, N. E., & Fisher, P. R. (2013). Roles of ESCRT proteins in *Dictyostelium discoideum*. *unpubliziert*.
- Ingram, L. O. (1977). Changes in lipid composition of *Escherichia coli* resulting from growth with organic solvents and with food additives. *Applied and environmental microbiology*, *33*, 1233–6.
- Jabado, N., Cuellar-Mata, P., Grinstein, S., & Gros, P. (2003). Iron chelators modulate the fusogenic properties of *Salmonella*-containing phagosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *100*, 6127–32.
- Jacobs, T., & Leippe, M. (1995). Purification and molecular cloning of a major antibacterial protein of the protozoan parasite *Entamoeba histolytica* with lysozyme-like properties. *European journal of biochemistry / FEBS*, *231*, 831–8.
- Jenssen, H., Hamill, P., & Hancock, R. E. W. (2006). Peptide antimicrobial agents. *Clinical microbiology reviews*, *19*, 491–511.
- Jia, K., Thomas, C., Akbar, M., Sun, Q., Adams-Huet, B., Gilpin, C., & Levine, B. (2009). Autophagy genes protect against *Salmonella typhimurium* infection and mediate insulin signaling-regulated pathogen resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *106*, 14564–9.
- Jollès, P., & Jollès, J. (1984). What's new in lysozyme research? Always a model system, today as yesterday. *Molecular and cellular biochemistry*, *63*, 165–89.
- Journet, A., Klein, G., Brugière, S., Vandenbrouck, Y., Chapel, A., Kieffer, S., Bruley, C., Masselon, C., & Aubry, L. (2012). Investigating the macropinocytic proteome of *Dictyostelium amoebae* by high-resolution mass spectrometry. *Proteomics*, *12*, 241–5.
- Kang, D., Gho, Y. S., Suh, M., & Kang, C. (2002). Highly Sensitive and Fast Protein Detection with Coomassie Brilliant Blue in Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis. *Bullettin of the Korean Chemical Society*, *23*, 1511–1512.
- Kasárov, L. B. (1970). Degradation of the erythrocyte phospholipids and haemolysis of the erythrocytes of different animal species by leptospirae. *Journal of medical microbiology*, *3*, 29–37.

-
- Kim, J.-Y., Park, S.-C., Lee, J.-K., Choi, S. J., Hahm, K.-S., & Park, Y. (2012). Novel antibacterial activity of $\beta(2)$ -microglobulin in human amniotic fluid. *PloS one*, 7, e47642.
- Kishimoto, Y., Hiraiwa, M., & O'Brien, J. S. (1992). Saposins: structure, function, distribution, and molecular genetics. *Journal of lipid research*, 33, 1255–67.
- Klaassen, C. D., & Boles, J. W. (1997). Sulfation and sulfotransferases 5: the importance of 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate (PAPS) in the regulation of sulfation. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 11, 404–18.
- Korkmaz, B., Moreau, T., & Gauthier, F. (2008). Neutrophil elastase, proteinase 3 and cathepsin G: physicochemical properties, activity and physiopathological functions. *Biochimie*, 90, 227–42.
- Kovacs-Nolan, J., Latimer, L., Landi, A., Jenssen, H., Hancock, R. E. W., Babiuk, L. a, & Van Drunen Littel-van den Hurk, S. (2009). The novel adjuvant combination of CpG ODN, indolicidin and polyphosphazene induces potent antibody- and cell-mediated immune responses in mice. *Vaccine*, 27, 2055–64.
- Ladokhin, a S., & White, S. H. (2001). “Detergent-like” permeabilization of anionic lipid vesicles by melittin. *Biochimica et biophysica acta*, 1514, 253–60.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680–5.
- Lehrer, R. I., Rosenman, M., Harwig, S. S., Jackson, R., & Eisenhauer, P. (1991). Ultrasensitive assays for endogenous antimicrobial polypeptides. *Journal of immunological methods*, 137, 167–73.
- Leippe, M. (1997). Amoebapores. *Parasitology today (Personal ed.)*, 13, 178–83.
- Leippe, M. (1999). Antimicrobial and cytolytic polypeptides of amoeboid protozoa--effector molecules of primitive phagocytes. *Developmental and comparative immunology*, 23, 267–79.
- Leippe, M., Andrä, J., Nickel, R., Tannich, E., & Müller-Eberhard, H. J. (1994). Amoebapores, a family of membranolytic peptides from cytoplasmic granules of *Entamoeba histolytica*: isolation, primary structure, and pore formation in bacterial cytoplasmic membranes. *Molecular microbiology*, 14, 895–904.
- Leippe, M., Bruhn, H., Hecht, O., & Grötzinger, J. (2005). Ancient weapons: the three-dimensional structure of amoebapore A. *Trends in parasitology*, 21, 5–7.
- Leippe, M., Ebel, S., Schoenberger, O. L., Horstmann, R. D., & Müller-Eberhard, H. J. (1991). Pore-forming peptide of pathogenic *Entamoeba histolytica*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88, 7659–63.

-
- Leippe, M., Tannich, E., Nickel, R., Van der Goot, G., Pattus, F., Horstmann, R. D., & Müller-Eberhard, H. J. (1992). Primary and secondary structure of the pore-forming peptide of pathogenic *Entamoeba histolytica*. *The EMBO journal*, *11*, 3501–6.
- Lelong, E., Marchetti, A., Guého, A., Lima, W. C., Sattler, N., Molmeret, M., Hagedorn, M., Soldati, T., & Cosson, P. (2011). Role of magnesium and a phagosomal P-type ATPase in intracellular bacterial killing. *Cellular microbiology*, *13*, 246–58.
- Liepinsh, E., Andersson, M., Ruyschaert, J. M., & Otting, G. (1997). Saposin fold revealed by the NMR structure of NK-lysin. *Nature structural biology*, *4*, 793–5.
- Lima, W. C., Lelong, E., & Cosson, P. (2011). What can Dictyostelium bring to the study of Pseudomonas infections? *Seminars in cell & developmental biology*, *22*, 77–81.
- Lipsky, B. a, Holroyd, K. J., & Zasloff, M. (2008). Topical versus systemic antimicrobial therapy for treating mildly infected diabetic foot ulcers: a randomized, controlled, double-blinded, multicenter trial of pexiganan cream. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, *47*, 1537–45.
- Liu, C. C., & Schultz, P. G. (2006). Recombinant expression of selectively sulfated proteins in Escherichia coli. *Nature biotechnology*, *24*, 1436–40.
- Locatelli-Hoops, S., Rimmel, N., Klingenstein, R., Breiden, B., Rossocha, M., Schoeniger, M., Koenigs, C., Saenger, W., & Sandhoff, K. (2006). Saposin A mobilizes lipids from low cholesterol and high bis(monoacylglycerol)phosphate-containing membranes: patient variant Saposin A lacks lipid extraction capacity. *The Journal of biological chemistry*, *281*, 32451–60.
- Loew, L. M., Rosenberg, I., Bridge, M., & Gitler, C. (1983). Diffusion potential cascade. Convenient detection of transferable membrane pores. *Biochemistry*, *22*, 837–44.
- Löfgren, S. E., Miletti, L. C., Steindel, M., Bachère, E., & Barracco, M. a. (2008). Trypanocidal and leishmanicidal activities of different antimicrobial peptides (AMPs) isolated from aquatic animals. *Experimental parasitology*, *118*, 197–202.
- Loomis, W. F. (1975). Dictyostelium discoideum: a developmental system. *Academic Press, New York*.
- Lozupone, F., Perdicchio, M., Brambilla, D., Borghi, M., Meschini, S., Barca, S., Marino, M. L., Logozzi, M., Federici, C., Iessi, E., De Milito, A., & Fais, S. (2009). The human homologue of Dictyostelium discoideum phg1A is expressed by human metastatic melanoma cells. *EMBO reports*, *10*, 1348–54.
- Lu, C.-X., Nan, K.-J., & Lei, Y. (2008). Agents from amphibians with anticancer properties. *Anti-cancer drugs*, *19*, 931–9.

- Lüderitz, O., Galanos, C., Risse, H. J., Ruschmann, E., Schlecht, S., Schmidt, G., Schulte-Holthausen, H., Wheat, R., Westphal, O., & Schlosshardt, J. (1966). Structural relationships of Salmonella O and R antigens. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 133, 349–374.
- Ludtmann, M. H. R., Boeckeler, K., & Williams, R. S. B. (2011). Molecular pharmacology in a simple model system: implicating MAP kinase and phosphoinositide signalling in bipolar disorder. *Seminars in cell & developmental biology*, 22, 105–13.
- Maeda, M., Sakamoto, H., Iranfar, N., Fuller, D., Maruo, T., Ogihara, S., Morio, T., Urushihara, H., Tanaka, Y., & Loomis, W. F. (2003). Changing patterns of gene expression in dictyostelium prestalk cell subtypes recognized by in situ hybridization with genes from microarray analyses. *Eukaryotic cell*, 2, 627–37.
- Malchow, D., Lüderitz, O., Westphal, O., Gerisch, G., & Riedel, V. (1967). Polysaccharide in vegetativen und aggregationsreifen Amoben von *Dictyostelium discoideum*. 1. In vivo Degradierung von Bakterien-Lipopolysaccharid. *European journal of biochemistry / FEBS*, 2, 469–79.
- Malchow, D., Nägele, B., Schwarz, H., & Gerisch, G. (1972). Membrane-bound cyclic AMP phosphodiesterase in chemotactically responding cells of *Dictyostelium discoideum*. *European journal of biochemistry / FEBS*, 28, 136–42.
- Malik, S., Abel, L., Tooker, H., Poon, A., Simkin, L., Girard, M., Adams, G. J., Starke, J. R., Smith, K. C., Graviss, E. a, Musser, J. M., & Schurr, E. (2005). Alleles of the NRAMP1 gene are risk factors for pediatric tuberculosis disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102, 12183–8.
- Mancilla-Herrera, I., Méndez-Tenorio, A., Wong-Baeza, I., Jiménez-Urbe, A. P., Alcántara-Hernández, M., Ocadiz-Ruiz, R., Moreno-Eutimio, M. a, Arriaga-Pizano, L. a, López-Macías, C., González-y-Merchand, J., & Isibasi, A. (2012). A Toll/IL-1R/resistance domain-containing thioredoxin regulates phagocytosis in *Entamoeba histolytica*. *Parasites & vectors*, 5, 224.
- Maniak, M. (2011). *Dictyostelium* as a model for human lysosomal and trafficking diseases. *Seminars in cell & developmental biology*, 22, 114–9.
- Maniak, M. (2003). Fusion and fission events in the endocytic pathway of *Dictyostelium*. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, 4, 1–5.
- Maniak, M., Rauchenberger, R., Albrecht, R., Murphy, J., & Gerisch, G. (1995). Coronin involved in phagocytosis: dynamics of particle-induced relocalization visualized by a green fluorescent protein Tag. *Cell*, 83, 915–24.
- Marchetti, A., Lelong, E., & Cosson, P. (2009). A measure of endosomal pH by flow cytometry in *Dictyostelium*. *BMC research notes*, 2, 7.

-
- Maselli, A., Laevsky, G., & Knecht, D. a. (2002). Kinetics of binding, uptake and degradation of live fluorescent (DsRed) bacteria by *Dictyostelium discoideum*. *Microbiology (Reading, England)*, *148*, 413–20.
- Matsuzaki, K. (1999). Why and how are peptide-lipid interactions utilized for self-defense? Magainins and tachyplesins as archetypes. *Biochimica et biophysica acta*, *1462*, 1–10.
- Matsuzaki, K., Sugishita, K., Harada, M., Fujii, N., & Miyajima, K. (1997). Interactions of an antimicrobial peptide, magainin 2, with outer and inner membranes of Gram-negative bacteria. *Biochimica et biophysica acta*, *1327*, 119–30.
- Meyer, I., Kuhnert, O., & Gräf, R. (2011). Functional analyses of lissencephaly-related proteins in *Dictyostelium*. *Seminars in cell & developmental biology*, *22*, 89–96.
- Michaelis, A. (2006). Molekulare Charakterisierung Amoebapore-ähnlicher Peptide von *Dictyostelium discoideum*. 81.
- Michalek, M., Gelhaus, C., Hecht, O., Podschun, R., Schröder, J. M., Leippe, M., & Grötzinger, J. (2009). The human antimicrobial protein psoriasin acts by permeabilization of bacterial membranes. *Developmental and comparative immunology*, *33*, 740–6.
- Michalek, M., Sönnichsen, F. D., Wechselberger, R., Dingley, A. J., Hung, C., Kopp, A., Wienk, H., Simanski, M., Herbst, R., Lorenzen, I., Marciano-Cabral, F., Gelhaus, C., Gutschmann, T., Tholey, A., Grötzinger, J., & Leippe, M. (2013). Structure and function of a unique pore-forming protein from a pathogenic acanthamoeba. *Nature chemical biology*, *9*, 37–42.
- Miroux, B., & Walker, J. E. (1996). Over-production of proteins in *Escherichia coli*: mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels. *Journal of molecular biology*, *260*, 289–98.
- Morimoto, S., Martin, B. M., Yamamoto, Y., Kretz, K. a, O'Brien, J. S., & Kishimoto, Y. (1989). Saposin A: second cerebrosidase activator protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *86*, 3389–93.
- Müller, I., Subert, N., Otto, H., Herbst, R., Rühling, H., Maniak, M., Leippe, M., Ru, H., Mu, I., & Ninon, S. (2005). A *Dictyostelium* mutant with reduced lysozyme levels compensates by increased phagocytic activity. *The Journal of biological chemistry*, *280*, 10435–43.
- Mullis, K. B., & Faloona, F. A. (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in enzymology*, *155*, 335–50.
- Munford, R. S., & Hunter, J. P. (1992). Acyloxyacyl hydrolase, a leukocyte enzyme that deacylates bacterial lipopolysaccharides, has phospholipase, lysophospholipase, diacylglycerollipase, and acyltransferase activities in vitro. *The Journal of biological chemistry*, *267*, 10116–21.

-
- Munford, R., Lu, M., & Varley, A. (2009). Chapter 2: Kill the bacteria...and also their messengers? *Advances in immunology*, 103, 29–48.
- Munford, R. S., Sheppard, P. O., & O'Hara, P. J. (1995). Saposin-like proteins (SAPLIP) carry out diverse functions on a common backbone structure. *Journal of lipid research*, 36, 1653–63.
- Myre, M. a. (2012). Clues to γ -secretase, huntingtin and Hirano body normal function using the model organism *Dictyostelium discoideum*. *Journal of biomedical science*, 19, 41.
- Mysliwy, J., Dingley, A. J., Stanisak, M., Jung, S., Lorenzen, I., Roeder, T., Leippe, M., & Grötzinger, J. (2010). Caenopore-5: the three-dimensional structure of an antimicrobial protein from *Caenorhabditis elegans*. *Developmental and comparative immunology*, 34, 323–30.
- Nasser, W., Parikh, A., Miranda, R., Juneja, K., Dinh, C., Chen, R., Shaulsky, G., & Kuspa, A. (2008). *Bacterial Discrimination in the social amoeba Dictyostelium discoideum [Poster]*.
- Neuhoff, V., Arold, N., Taube, D., & Ehrhardt, W. (1988). Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis*, 9, 255–62.
- Nickel, R., Ott, C., Dandekar, T., & Leippe, M. (1999). Pore-forming peptides of *Entamoeba dispar*. Similarity and divergence to amoebapores in structure, expression and activity. *European journal of biochemistry / FEBS*, 265, 1002–7.
- Nielsen, H., Engelbrecht, J., Brunak, S., & Von Heijne, G. (1997). Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein engineering*, 10, 1–6.
- Niewöhner, J., Weber, I., Maniak, M., Müller-Taubenberger, A., & Gerisch, G. (1997). Talin-null cells of *Dictyostelium* are strongly defective in adhesion to particle and substrate surfaces and slightly impaired in cytokinesis. *The Journal of cell biology*, 138, 349–61.
- Nigam, V. N., Malchow, D., Rietschel, E. T., Lüderitz, O., & Westphal, O. (1970). Die enzymatische Abspaltung langkettiger Fettsäuren aus bakteriellen Lipopolysacchariden mittels Extrakten aus der Amöbe von *Dictyostelium discoideum*. *Hoppe-Seyler's Zeitschrift für physiologische Chemie*, 351, 1123–32.
- Nizet, V. (2006). Antimicrobial peptide resistance mechanisms of human bacterial pathogens. *Current issues in molecular biology*, 8, 11–26.
- O'Brien, J. S. (1972). Ganglioside storage diseases. *Advances in human genetics*, 3, 39–98.

-
- Olmeda, B., García-Álvarez, B., & Pérez-Gil, J. (2013). Structure-function correlations of pulmonary surfactant protein SP-B and the saposin-like family of proteins. *European biophysics journal : EBJ*, *42*, 209–22.
- Otto, G. P., Wu, M. Y., Kazgan, N., Anderson, O. R., & Kessin, R. H. (2004). Dictyostelium macroautophagy mutants vary in the severity of their developmental defects. *The Journal of biological chemistry*, *279*, 15621–9.
- Otto, G. P., Wu, M. Y., Kazgan, N., Anderson, O. R., & Kessin, R. H. (2003). Macroautophagy is required for multicellular development of the social amoeba Dictyostelium discoideum. *The Journal of biological chemistry*, *278*, 17636–45.
- Pasupuleti, M., Schmidtchen, A., & Malmsten, M. (2012). Antimicrobial peptides: key components of the innate immune system. *Critical reviews in biotechnology*, *32*, 143–71.
- Pelegri, P. B., Quirino, B. F., & Franco, O. L. (2007). Plant cyclotides: an unusual class of defense compounds. *Peptides*, *28*, 1475–81.
- Peña, S. V., Hanson, D. A., Carr, B. A., Goralski, T. J., & Krensky, A. M. (1997). Processing, subcellular localization, and function of 519 (granulysin), a human late T cell activation molecule with homology to small, lytic, granule proteins. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *158*, 2680–8.
- Peña, S. V., & Krensky, A. M. (1997). Granulysin, a new human cytolytic granule-associated protein with possible involvement in cell-mediated cytotoxicity. *Seminars in immunology*, *9*, 117–25.
- Peracino, B., Balest, A., & Bozzaro, S. (2010). Phosphoinositides differentially regulate bacterial uptake and Nramp1-induced resistance to Legionella infection in Dictyostelium. *Journal of cell science*, *123*, 4039–51.
- Peracino, B., Wagner, C., Balest, A., Balbo, A., Pergolizzi, B., Noegel, A. a, Steinert, M., & Bozzaro, S. (2006). Function and mechanism of action of Dictyostelium Nramp1 (Slc11a1) in bacterial infection. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, *7*, 22–38.
- Perron, G. G., Zasloff, M., & Bell, G. (2006). Experimental evolution of resistance to an antimicrobial peptide. *Proceedings. Biological sciences / The Royal Society*, *273*, 251–6.
- Pettersen, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Couch, G. S., Greenblatt, D. M., Meng, E. C., & Ferrin, T. E. (2004). UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of computational chemistry*, *25*, 1605–12.
- Pick, U. (1981). Liposomes with a large trapping capacity prepared by freezing and thawing of sonicated phospholipid mixtures. *Archives of biochemistry and biophysics*, *212*, 186–94.

-
- Popovic, K., & Privé, G. G. (2008). Structures of the human ceramide activator protein saposin D. *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography*, *64*, 589–94.
- Provencher, S. W., & Glöckner, J. (1981). Estimation of globular protein secondary structure from circular dichroism. *Biochemistry*, *20*, 33–7.
- Pukatzki, S., Ma, A. T., Sturtevant, D., Krastins, B., Sarracino, D., Nelson, W. C., Heidelberg, J. F., & Mekalanos, J. J. (2006). Identification of a conserved bacterial protein secretion system in *Vibrio cholerae* using the *Dictyostelium* host model system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *103*, 1528–33.
- Raper, K. B. (1935). *Dictyostelium discoideum*, a new species of slime mold from decaying forest leaves. *Journal of Agricultural Research*, *50*, 135 – 147.
- RAPER, K. B. (1950). Stalk formation in *Dictyostelium*. *Science (New York, N.Y.)*, *112*, 450.
- Reeves, E., Lu, H., Jacobs, H. L., Messina, C. G. M., Bolsover, S., Gabella, G., Potma, E. O., Warley, A., Roes, J., & Segal, A. W. (2002). Killing activity of neutrophils is mediated through activation of proteases by K⁺ flux. *Nature*, *416*, 291–7.
- Van der Rest, M. E., Kamminga, A. H., Nakano, A., Anraku, Y., Poolman, B., & Konings, W. N. (1995). The plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae*: structure, function, and biogenesis. *Microbiological reviews*, *59*, 304–22.
- Rot, G., Parikh, A., Curk, T., Kuspa, A., Shaulsky, G., & Zupan, B. (2009). dictyExpress: a *Dictyostelium discoideum* gene expression database with an explorative data analysis web-based interface. *BMC bioinformatics*, *10*, 265.
- Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. a, & Arnheim, N. (1992). Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Biotechnology (Reading, Mass.)*, *24*, 476–80.
- Schaap, P. (2011). Evolutionary crossroads in developmental biology: *Dictyostelium discoideum*. *Development (Cambridge, England)*, *138*, 387–96.
- Schägger, H., & Von Jagow, G. (1987). Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Analytical biochemistry*, *166*, 368–79.
- Schitteck, B., Hipfel, R., Sauer, B., Bauer, J., Kalbacher, H., Stevanovic, S., Schirle, M., Schroeder, K., Blin, N., Meier, F., Rassner, G., & Garbe, C. (2001). Dermcidin: a novel human antibiotic peptide secreted by sweat glands. *Nature immunology*, *2*, 1133–7.
- Schmidt, H., Gelhaus, C., Nebendahl, M., Lettau, M., Watzl, C., Kabelitz, D., Leippe, M., & Janssen, O. (2008). 2-D DIGE analyses of enriched secretory lysosomes

- reveal heterogeneous profiles of functionally relevant proteins in leukemic and activated human NK cells. *Proteomics*, 8, 2911–25.
- Schmidtchen, A., Frick, I.-M., Andersson, E., Tapper, H., & Björck, L. (2002). Proteinases of common pathogenic bacteria degrade and inactivate the antibacterial peptide LL-37. *Molecular microbiology*, 46, 157–68.
- Shai, Y. (1999). Mechanism of the binding, insertion and destabilization of phospholipid bilayer membranes by alpha-helical antimicrobial and cell non-selective membrane-lytic peptides. *Biochimica et biophysica acta*, 1462, 55–70.
- Shaulsky, G., Kuspa, A., & Loomis, W. F. (1995). A multidrug resistance transporter/serine protease gene is required for prestalk specialization in Dictyostelium. *Genes & Development*, 9, 1111–1122.
- Shevchuk, O., Batzilla, C., Hägele, S., Kusch, H., Engelmann, S., Hecker, M., Haas, A., Heuner, K., Glöckner, G., & Steinert, M. (2009). Proteomic analysis of Legionella-containing phagosomes isolated from Dictyostelium. *International journal of medical microbiology : IJMM*, 299, 489–508.
- Shuman, S. (1989). Vaccinia DNA topoisomerase I promotes illegitimate recombination in Escherichia coli. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86, 3489–93.
- Sillo, A., Bloomfield, G., Balest, A., Balbo, A., Pergolizzi, B., Peracino, B., Skelton, J., Ivens, A., & Bozzaro, S. (2008). Genome-wide transcriptional changes induced by phagocytosis or growth on bacteria in Dictyostelium. *BMC genomics*, 9, 291.
- Simpson, A. G. B., & Roger, A. J. (2004). The real “kingdoms” of eukaryotes. *Current biology : CB*, 14, R693–6.
- Skriwan, C., Fajardo, M., Hägele, S., Horn, M., Wagner, M., Michel, R., Krohne, G., Schleicher, M., Hacker, J., & Steinert, M. (2002). Various bacterial pathogens and symbionts infect the amoeba Dictyostelium discoideum. *International journal of medical microbiology : IJMM*, 291, 615–24.
- Slocinska, M., Marciniak, P., & Rosinski, G. (2008). Insects antiviral and anticancer peptides: new leads for the future? *Protein and peptide letters*, 15, 578–85.
- Song, C., Weichbrodt, C., S Salnikov, E., Dynowski, M., O Forsberg, B., Bechinger, B., Steinem, C., De Groot, B. L., Zachariae, U., & Zeth, K. (2013). Crystal structure and functional mechanism of a human antimicrobial membrane channel. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1–6.
- Steiner, H., Hultmark, D., Engström, A., Bennich, H., & Boman, H. G. (1981). Sequence and specificity of two antibacterial proteins involved in insect immunity. *Nature*, 292, 246–8.

-
- Steinert, M. (2011). Pathogen-host interactions in Dictyostelium, Legionella, Mycobacterium and other pathogens. *Seminars in cell & developmental biology*, 22, 70–6.
- Stenger, S. (1998). An antimicrobial activity of cytolytic T cells mediated by Granulysin. *Science*, 282, 121–5.
- Tamargo, R. J., Velayati, A., Goldin, E., & Sidransky, E. (2012). The role of saposin C in Gaucher disease. *Molecular genetics and metabolism*, 106, 257–63.
- Tang, Y.-L., Shi, Y.-H., Zhao, W., Hao, G., & Le, G.-W. (2008). Insertion mode of a novel anionic antimicrobial peptide MDpep5 (Val-Glu-Ser-Trp-Val) from Chinese traditional edible larvae of housefly and its effect on surface potential of bacterial membrane. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 48, 1187–94.
- Tasiemski, A., Vandenbulcke, F., Mitta, G., Lemoine, J., Lefebvre, C., Sautière, P.-E., & Salzet, M. (2004). Molecular characterization of two novel antibacterial peptides inducible upon bacterial challenge in an annelid, the leech *Theromyzon tessulatum*. *The Journal of biological chemistry*, 279, 30973–82.
- Tiaden, A., Spirig, T., Weber, S. S., Brüggemann, H., Bosshard, R., Buchrieser, C., & Hilbi, H. (2007). The Legionella pneumophila response regulator LqsR promotes host cell interactions as an element of the virulence regulatory network controlled by RpoS and LetA. *Cellular microbiology*, 9, 2903–20.
- Tresse, E., Giusti, C., Kosta, A., Luciani, M.-F., & Golstein, P. (2008). Autophagy and autophagic cell death in Dictyostelium. *Methods in enzymology*, 451, 343–58.
- Tropea, J. E., Cherry, S., & Waugh, D. S. (2009). Expression and purification of soluble His(6)-tagged TEV protease. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 498, 297–307.
- Urwyler, S., Nyfeler, Y., Ragaz, C., Lee, H., Mueller, L. N., Aebersold, R., & Hilbi, H. (2009). Proteome analysis of Legionella vacuoles purified by magnetic immunoseparation reveals secretory and endosomal GTPases. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, 10, 76–87.
- Vaccaro, a M., Ciaffoni, F., Tatti, M., Salvioli, R., Barca, a, Tognozzi, D., & Scerch, C. (1995). pH-dependent conformational properties of saposins and their interactions with phospholipid membranes. *The Journal of biological chemistry*, 270, 30576–80.
- Vidal, S. M., Malo, D., Vogan, K., Skamene, E., & Gros, P. (1993). Natural resistance to infection with intracellular parasites: isolation of a candidate for Bcg. *Cell*, 73, 469–85.
- Waddell, D. R., & Duffy, K. T. (1986). Breakdown of self/nonself recognition in cannibalistic strains of the predatory slime mold, Dictyostelium caveatum. *The Journal of cell biology*, 102, 298–305.

-
- Wagner, S., Klepsch, M. M., Schlegel, S., Appel, A., Draheim, R., Tarry, M., Högbom, M., Van Wijk, K. J., Slotboom, D. J., Persson, J. O., & De Gier, J.-W. (2008). Tuning *Escherichia coli* for membrane protein overexpression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *105*, 14371–6.
- Weeks, G., & Herring, F. G. (1980). The lipid composition and membrane fluidity of *Dictyostelium discoideum* plasma membranes at various stages during differentiation. *Journal of lipid research*, *21*, 681–6.
- West, C. M., & Erdos, G. W. (1990). Formation of the *Dictyostelium* spore coat. *Developmental genetics*, *11*, 492–506.
- Wetzel, M. G., & Korn, E. D. (1969). Phagocytosis of latex beads by *Acanthamoeba castellanii* (Neff). 3. Isolation of the phagocytic vesicles and their membranes. *The Journal of cell biology*, *43*, 90–104.
- Whittingham, W. F., & Raper, K. B. (1960). NON-VIABILITY OF STALK CELLS IN DICTYOSTELIUM. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *46*, 642–9.
- Wiener, E., & Ashworth, J. M. (1970). The isolation and characterization of lysosomal particles from myxamoebae of the cellular slime mould *Dictyostelium discoideum*. *The Biochemical journal*, *118*, 505–12.
- Winkelmann, J., Leippe, M., & Bruhn, H. (2006). A novel saposin-like protein of *Entamoeba histolytica* with membrane-fusogenic activity. *Molecular and biochemical parasitology*, *147*, 85–94.
- Wood, W. B. (1966). Host specificity of DNA produced by *Escherichia coli*: bacterial mutations affecting the restriction and modification of DNA. *Journal of molecular biology*, *16*, 118–33.
- World Health Organization. (2011). The top 10 causes of death, Fact sheet N° 310. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/index.html>.
- Xu, Y., Tao, X., Shen, B., Horng, T., Medzhitov, R., Manley, J. L., & Tong, L. (2000). Structural basis for signal transduction by the Toll/interleukin-1 receptor domains. *Nature*, *408*, 111–5.
- Yang, D., Biragyn, A., Kwak, L. W., & Oppenheim, J. J. (2002). Mammalian defensins in immunity: more than just microbicidal. *Trends in immunology*, *23*, 291–6.
- Yang, L., Weiss, T. M., Lehrer, R. I., & Huang, H. W. (2000). Crystallization of antimicrobial pores in membranes: magainin and protegrin. *Biophysical journal*, *79*, 2002–9.
- Yuen, I. S., Jain, R., Bishop, J. D., Lindsey, D. F., Deery, W. J., Van Haastert, P. J., & Gomer, R. H. (1995). A density-sensing factor regulates signal transduction in *Dictyostelium*. *The Journal of cell biology*, *129*, 1251–62.

Zasloff, M. (2002). Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature*, *415*, 389–95.

Zorko, M., & Jerala, R. (2010). Production of recombinant antimicrobial peptides in bacteria. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, *618*, 61–76.

7 Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1: Modelle des Wirkmechanismus antimikrobieller Peptide.** Die ungefalteten Proteine ändern ihre Konformität durch die Anlagerung an die negativ geladene Membran. Im Barrel stave- und im Toroidal pore-Modell entsteht ein physisches Loch in der Zellmembran, was den Zusammenbruch des Ionengradienten nach sich zieht. Im Carpet-Modell wird die Zellmembran durch die Anlagerung der AMPs aufgelöst (Abbildung aus Pasupuleti *et al.*, 2011). 3
- Abb. 2: Tertiärstruktur von Saposin A (magenta), NK-Lysin (orange) und Amoebapore A (grün).** Alle Proteine zeigen fünf α -Helices mit drei internen Disulfidbrücken (Abbildung aus Mysliwy *et al.*, 2010). 6
- Abb. 3: Strukturmodell des Dimers und Hexamers von Amoebapore A.** Darstellung eines Amoebapore-Dimers (**a**) als Bandmodell und (**b**) mit seinem elektrostatischen Oberflächenpotential. Reste mit positivem Oberflächenpotential sind in blau, Reste mit negativem Potential sind in rot und unpolare Aminosäurereste sind in weiß gezeigt. (**c**) Sechs Amoebapores bilden eine hexamere Pore. (**d**) Darstellung des elektrostatischen Oberflächenpotentials des Hexamers. Die hydrophilen Aminosäurereste mit einem positiven Oberflächenpotential kleiden das Innere der Pore aus (Abbildung aus Leippe *et al.*, 2005). 8
- Abb. 4: Proteombasierte eukaryotische Phylogenie.** Die Abspaltung von *Dictyostelium discoideum* erfolgte kurz nach der Trennung von Pflanzenzellen und Tier- bzw. Pilzzellen. (Abbildung aus Eichinger *et al.*, 2005). 10
- Abb. 5: Lebenszyklus von Dictyostelium discoideum.** (A) Der Lebenszyklus teilt sich in einen vegetativen und einen Entwicklungszyklus. Im Entwicklungszyklus aggregieren ~20.000 Amöben und bilden über verschiedene Zwischenstadien einen Fruchtkörper (Copyright Brown/Strassmann). (B) Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme des Entwicklungszyklus von *D. discoideum* (Copyright, M.J. Grimson und R.L. Blanton, Biological Sciences Electron Microscopy Laboratory, Texas Tech University). . 12
- Abb. 6: Modell für die Autophagie in Dictyostelium discoideum hergeleitet von Saccharomyces cerevisiae** Das doppelmembranöse Phagophor umschließt Teile des Zytoplasmas oder Organellen und bildet das Autophagosom. Dieses fusioniert mit Lysosomen zum Autolysosom, in welchem die Zellbestandteile abgebaut werden (Atg, *autophagy-related*; PE, Phosphatidylethanolamin; TOR, *target of rapamycin*; Vmp, *vacuole membrane protein*; Vps, *vacuolar protein sorting*) (Abbildung verändert nach Calvo-Garrido *et al.*, 2010) 14
- Abb. 7: Mechanismen der Abtötung von Klebsiella pneumoniae.** Bei der intrazellulären Abtötung der Bakterien in *Dictyostelium* ist Phg1 bei der Regulierung der Adhäsion, des intraphagosomalen pHs und der Zusammensetzung der lysosomalen Enzyme beteiligt. Die Hauptaufgabe von Phg1 ist jedoch die Kontrolle der intrazellulären Menge von Kil1, welches für eine effiziente Verwertung der Bakterien benötigt wird. Zusätzlich reguliert die P-ATPase Kil2 die phagosomale Mg^{2+} -Konzentration und die phagosomale Protease-Aktivität (Abb. entnommen aus Le Coadic *et al.*, 2013). 23
- Abb. 8: Molekulare Organisation der Apls.** Das Signalpeptid ist grau dargestellt, die SAPLIP-Domänen sind rot und die Serin-reichen Regionen zwischen den Domänen blau dargestellt. Potenzielle N-Glykosylierungsstellen (Asn-Xaa-Ser/Thr) sind mit Y dargestellt (verändert nach einer Abbildung von Prof. Dr. Matthias Leippe und Dr. Rosa Herbst, unpubliziert). 26
- Abb. 9: Transkription von apID während des Entwicklungszyklus.** *ApID* wird in allen Stadien exprimiert. Die maximale Transkription von *apID* ist nach 16 h (*slug*-Phase) erreicht. Die Daten der RNA-Sequenzierungen wurden von der Datenbank *Dictybase.org* entnommen (Rot *et al.*, 2009). 28
- Abb. 10: Fusionsprotein rApl D.** Schematische und nicht-proportionale Darstellung des Fusionsproteins von rApl D, das in den Vektor pET-32a(+) ligiert wurde. Die Pfeile kennzeichnen die Proteaseschnittstellen von Thrombin und der TEV-Protease. 42
- Abb. 11: Phagosomenpräparation nach Dichtegradientenzentrifugation.** Die gereinigten Phagosomen (\blacktriangleleft) befanden sich zwischen der 10 % und der 25 % Saccharoseschicht. 67
- Abb. 12: 2D-PAGE der Proteine aus der Phagosomenpräparation mit dem pH-Gradienten 3 – 10 NL.** Das Gel wurde mit FlamingoPink gefärbt. Es wurden 500 μ g Protein aus Phagosomen aufgetrennt. Die

Eichproteine sind links im Gel dargestellt. Der Proteinpunkt, der als DdLysEh3 identifiziert wurde, ist angezeigt. 68

Abb. 13: 2D-PAGE der Proteine aus der Phagosomenpräparation mit dem pH-Gradienten 3 – 5,6 NL. Das Gel wurde mit FlamingoPink gefärbt. Es wurden 250 µg Protein aus Phagosomen aufgetrennt. Die Eichproteine sind links im Gel dargestellt. 69

Abb. 14: Kompartimentzuordnung der identifizierten Proteine. Nach der Phagosomenpräparation und der massenspektrometrischen Analyse wurden 71 unterschiedliche Proteine identifiziert. Die Zuordnung erfolgte anhand der Annotationen in der Datenbank *Dictybase.org*. 70

Abb. 15: Sequenzvergleich der Primärstrukturen der Vorläuferproteine von den zwei bereits bekannten *Eh-like*-Lysozymen aus *D. discoideum* und dem neu identifizierten Lysozym DdLysEh3 (DDB0252581) inklusive der Signalpeptide. Legende: * = identischer Aminosäurerest in allen Proteinen; : = konservierter Austausch; . = semi-konservierter Austausch. **Grau** entspricht hydrophoben Aminosäureresten, **blau** entspricht kationischen Aminosäureresten, **rot** entspricht anionischen Aminosäureresten, **gelb** entspricht Cysteinresten. Das Signalpeptid ist **grün** unterlegt. 72

Abb. 16: Polyacrylamidgel eines Proteinextrakts von *Dictyostelium discoideum*. Es wurden 50 µg Protein eingesetzt. Das Gel wurde mit FlamingoPink gefärbt, in Stücke geschnitten und die Gelstücke 14 – 27 für die Massenspektrometrie vorbereitet. Die Eichproteine sind rechts im Gel dargestellt. 73

Abb. 17: Anreicherung von *slugs* für Proteomics. (A) *Dictyostelium*-Zellen wurden auf Phosphat-Agar ausplattiert und in einer dunklen Box mit einer Lichtquelle auf der gegenüberliegenden Seite inkubiert. Die phototaktisch aktiven *slugs* wanderten auf die Lichtquelle zu und wurden von den restlichen Zellen getrennt. **(B)** Die Proteine der *slugs* wurden extrahiert und die Proteinmenge mittels BCA-Test bestimmt. Nach der Auftrennung der *slug*-Proteine wurden die Gelstücke 1 – 4 massenspektrometrisch analysiert. Die Eichproteine sind links im Gel dargestellt. 76

Abb. 18: Proteomisch nachgewiesene Apls in *Dictyostelium discoideum*. Von 33 potenziellen SAPLIPs wurden 15 Apls auf Proteinebene identifiziert (mit ✓ markiert). **Y** = potenzielle N-Glykosylierung, **grau** = Signalpeptid (Bendtsen *et al.*, 2004), **rot** = SAPLIP-Domäne, **blau** = potenzielle *Linker*- oder Endregion (Abbildung verändert nach Prof. Dr. Matthias Leippe und Dr. Rosa Herbst, unpubliziert). 79

Abb. 19: Schematische Darstellung des Genkonstrukts für ein ausgewähltes Apl. Die kodierende Sequenz des Gens ist in **gelb**, das Stopkodon in **rot**, die Proteaseschnittstelle in **grau** und die Restriktionsschnittstellen (RS) sind in **blau** dargestellt. Das schematische Darstellung der einzelnen Bereiche ist nicht proportional. 81

Abb. 20: Aminosäuresequenzen der bei *GeneArt* hergestellten Apl-Konstrukte. Die Proteaseschnittstelle ist in **grün**, das Stopkodon in **rot** und die Cysteinreste in **gelb** hervorgehoben. **█** markiert die Schnittstelle der jeweiligen Protease. 82

Abb. 21: Reinigung von rekombinant hergestelltem Apl D und Apl B2. Das Startmaterial (**Start**) wurde mittels Affinitätschromatographie in Bakterienproteine (**IMAC FT**) und Fusionsprotein (**▶**) (**IMAC Eluat**) getrennt und über Anionenaustausch-Chromatographie weiter gereinigt (**RQ**). Das Fusionsprotein wurde proteolytisch in den Thioerodoxin/Histidin-Rest und das Zielprotein rApl D (**◀**) gespalten (**TEV**) und über eine Mini Q-Säule von Proteinkontaminationen getrennt (**MQ**). Das gereinigte Protein wurden gegen 10 mM Natriumphosphatpuffer pH 6,8 dialysiert (**rApl D**). Ebenso wurde rekombinantes rApl B2 (**rApl B2**) (**◻**) hergestellt. Der Proteingehalt der jeweiligen Probe ist unter dem Gel in µg/ml angegeben. 83

Abb. 22: Massenspektrometrisch identifizierte Proteinsequenz von rApl D. Identifizierte Peptide sind in **rot**, nicht identifizierte Peptide sind in **schwarz** dargestellt. Die Trypsinschnittstellen sind unterstrichen. 83

Abb. 23: Massenspektrum von gereinigtem rApl B2. Die Maxima stellen geschnittenes rApl B2 plus **FQ** (8635,9 m/z) bzw. rApl B2 plus **YFQ** (8800,5 m/z) dar. Der abgeschnittene Fusionspartner hat eine Masse von 17428,0 m/z. 84

Abb. 24: Massenspektrum von gereinigtem rApl D. Die Massen stellen geschnittenes rApl D als Monomer (9071,8 m/z) und als Dimer (18136,4 m/z) dar. 85

Abb. 25: CD-Spektrum von rekombinant hergestelltem Apl D. Die Abbildung zeigt ein charakteristisches Spektrum für ein α-helikales gefaltetes Protein mit den Absorptionsminima bei 208 und 222 nm. Das

Spektrum wurde bei pH 6,8 und RT aufgenommen. Die Absorption des Puffers (10 mM Natriumphosphat) wurde vorher abgezogen. 87

Abb. 26: Modellierung der Tertiärstruktur von rApl D. (A) Die beiden Ansichten zeigen das Protein jeweils um 180° gedreht. Das Modell für rApl D verfügt über vier α -Helices. Die drei Disulfidbrücken sind in gelb dargestellt. Der N- und C-Terminus ist mit N bzw. C gekennzeichnet. (B) Anordnung der Seitenketten hydrophiler Aminosäuren (D, E, K, R, H, Q, N) im Bändermodell. Stickstoffe sind in blau, Sauerstoffe in rot dargestellt. (C) Anordnung der Seitenketten hydrophober Aminosäuren (F, V, I, L). 88

Abb. 27: Beispielhafte Darstellung der hämolytischen Aktivität von rApl D. Die Abbildung zeigt ein repräsentatives Ergebnis aus 3 Versuchen. Es wurden 50 μ M des rekombinanten Proteins in der ersten Vertiefung eingesetzt und durch 2 Reihen verdünnt (Pfeil). Das Kontrollpeptid Melittin wurde mit final 10 μ M in der ersten Vertiefung eingesetzt. In der letzten Reihe der Platte wurden Erythrozyten in 80 μ l ddH₂O resuspendiert. 90

Abb. 28: Membranpermeabilisierende Aktivität von rApl B2 gegen *B. megaterium* (A) und *E. coli* (B). Die Datenpunkte repräsentieren den Mittelwert aus 3 unabhängigen Experimenten bei pH 5,2 (n = 3). 91

Abb. 29: Membranpermeabilisierende Aktivität von rApl D. Die Abbildungen zeigen die Aktivität von rApl D und dem Kontrollpeptid Cecropin P1 gegen *E. coli* D31 (A) nach 30 min Inkubation bei pH 5,2. Zusätzlich wurde gegen *Klebsiella pneumoniae aerogenes* (B), KP21 (C) und K⁻ (D) getestet. Die Datenpunkte repräsentieren den Mittelwert aus jeweils 3 unabhängigen Experimenten bei pH 5,2 nach 60 min Inkubationszeit (n = 3). 92

Abb. 30: Membranpermeabilisierende Aktivität von rApl D gegen *K. pneumoniae* KP21 bei unterschiedlichen pH-Werten. Aktivität von rApl D und dem Kontrollpeptid Cecropin P1 bei pH 4,4 (A) und pH 7,4 (B) nach 60 Minuten Inkubationszeit. Die Datenpunkte repräsentieren den Mittelwert aus jeweils 3 unabhängigen Experimenten nach 60 min Inkubationszeit (n = 3). 93

Abb. 31: Membranpermeabilisierende Aktivität von rApl D gegen *Bacillus megaterium*. Aktivität von rApl D und dem Kontrollpeptid Cecropin P1 bei pH 5,2 (A) und pH 7,4 (B) nach 30 Minuten Inkubationszeit. Die Datenpunkte repräsentieren den Mittelwert aus 3 unabhängigen Experimenten. 94

Abb. 32: Zeitkinetik der Membranpermeabilisation von *B. megaterium* durch rApl D. Der Prozentsatz der permeabilisierten Bakterien wurde nach 2, 5, 10, 20, 30, 40 und 60 min gemessen. Es ist ein repräsentatives Experiment von vier Versuchen mit ähnlichen Resultaten dargestellt. 95

Abb. 33: Membranpermeabilisierende Aktivität von rApl D gegen *Dictyostelium*-Zellen. *Dictyostelium*-Amöben wurden in 20 mM MES, 150 mM NaCl pH 5,2 für 60 min (A) und für 18 h (B) zusammen mit rApl D inkubiert. Die Werte stellen den Mittelwert von 3 unabhängigen Experimenten dar. 96

Abb. 34: Membranpermeabilisierende Aktivität von rApl D gegen *S. cerevisiae*. Hefezellen wurden in 20 mM MES, 25 mM NaCl pH 5,2 für 3 h zusammen mit rApl D inkubiert. Die Werte stellen den Mittelwert von drei unabhängigen Experimenten dar. 96

Abb. 35: pH-Abhängigkeit der porenbildenden Aktivität von rApl D und rApl B2 im Liposomendepolarisationstest. Dargestellt ist der Mittelwert und die Standardabweichung von sechs unabhängigen Experimenten. Die Werte der Pufferkontrolle (rApl B2 und rApl D in 10 mM Natriumphosphatpuffer pH 6,8) oder des Solvens (Alamethicin in 0,01 % TFA) wurden abgezogen. 97

Abb. 36: Porenbildende Aktivität nach Zugabe von rApl D und Alamethicin. Die Abbildung zeigt die Freisetzung des Fluoreszenzfarbstoffs nach Zugabe des porenbildenden Proteins (Pfeil) bei pH 5,2 (A) und pH 7,4 (B). Das Kontrollpeptid Alamethicin (blau) wurde mit 200 nmol in der Küvette eingesetzt. Vom Protein rApl D wurden jeweils 100 nmol unbehandeltes Protein (dunkelgrün) und reduziert und alkyliertes Protein (hellgrün) eingesetzt. Als Negativkontrolle wurde der Puffer von rApl D (10 mM Natriumphosphatpuffer pH 6,8) in unbehandelter (rot) und in reduziert/alkylierter Form (orange) eingesetzt. 99

Abb. 37: Sequenzalignment der rekombinant hergestellten Fusionsproteine von Apl B2 und Apl D. Legende: Thio-redoxin-tag, His-tag, Thrombin-Schnittstelle, TEV-Protease-Schnittstelle, N-Terminus des geschnittenen Zielproteins, C = Cysteinrest, - = Stop-Codon. Die Spaltstellen der Proteasen sind mit dargestellt. Die TEV-Protease sollte zwischen dem Glutaminrest (Q) und dem Glycinrest (G) schneiden. Die Fusionsproteine unterscheiden sich in der Aminosäuresequenz vor allem im Bereich C-terminal von der

TEV-Protease-Schnittstelle. Während bei rApl B2 nur 4 Aminosäurereste vor dem ersten Cystein zu finden sind, zeigt die Sequenz von rApl D drei zusätzliche Aminosäurereste (DNN) vor dem ersten Cystein..... 110

Abb. 38: Reinigung des Fusionsproteins rApl B2 über IMAC. Als Startmaterial wurde der Proteinextrakt aus den Bakterien verwendet und das Fusionsprotein in den Fraktionen 50, 100 und 500 mM Imidazol in 1x TBS angereichert..... 149

Abb. 39: Reinigung des Fusionsproteins rApl B2 über Anionenaustausch-Chromatographie. Das Fusionsprotein wurde mittels einer Resource Q 1ml-Säule weiter gereinigt. 150

Abb. 40: Proteolytische Spaltung von rApl B2. Das Fusionsprotein wurde mit der TEV-Protease gespalten und ein weiteres Mal über die IMAC-Säule gegeben, um den *tag* und die Protease zu entfernen. 150

Abb. 41: Reinigung von geschnittenem rApl B2 über RP-HPLC. Das geschnittene Protein wurde über eine Vydac HPLC-Säule von den restlichen Proteinkontaminationen befreit. Für die funktionalen Assays wurde ausschließlich die Fraktion I9 verwendet. 151

Abb. 42: Porenbildende Aktivität von rApl D mit und ohne SYTOX Green. Die Abbildung zeigt die Freisetzung des Fluoreszenzfarbstoffs nach Zugabe von rApl D (Pfeil). Der Farbstoff SYTOX Green wurde in der Küvette final mit 1 μ M eingesetzt..... 152

8 Appendix

Tab. 19: Ergebnisse der proteomischen Analyse von *Dictyostelium*-Phagolysosomen

#	DDB Nummer	Proteinname (in Englisch)	Accession Number	Masse in Da	Kompartiment	Funktion	Prozess
1	DDB_G0278725	17 kDa protein	gi 66828875	18738,5	Unknown	Unknown	Unknown
2	DDB_G0289487	Actin	gi 7199	42116,98047	Cytoskeleton	Cell motion	Protein binding
3	DDB_G0289005	Actin	gi 940010	28991,38086	Phagocytic vesicle	Endocytosis	Structural modification
4	DDB_G0268744	Actin	gi 66827139	40280,07813	Phagocytic vesicle	Myosin binding	Cell morphogenesis
5	DDB_G0289663	Actin 5	gi 167599	5415,569824	Phagocytic vesicle	Structural constituent of cytoskeleton	Endocytosis
6	DDB_G0282297	Actin binding protein	gi 23491725	123859,9766	Cytoskeleton	Cytoskeleton organization	Profilin binding
7	DDB_G0286715	Actin binding protein	gi 66807831	15599,70996	Membrane	Not determined	Actin binding
8	DDB_G0282813	Actin related protein 2/3 complex, subunit 2	gi 66811280	32968,39844	Phagocytic vesicle	Polymerization	Actin binding
9	DDB_G0289173	ADP-ribosylation factor	gi 66805241	20839,64063	Phagocytic vesicle	ER to Golgi vesicle	GTP binding
10	DDB_G0292270	Aldehyde dehydrogenase	gi 66801509	52928,66016	Cytosol	Dehydrogenase	Metabolic
11	DDB_G0287689	Alpha tubulin	gi 66806671	51612,57031	Phagocytic vesicle	Protein polymerization	GTPase activity
12	DDB_G0269160	Annexin VII	gi 671859	49622,94141	Phagocytic vesicle	Response to bacterium	Protein binding
13	DDB_G0292306	ATP synthase gamma chain	gi 66801529	33665,41016	Phagocytic vesicle	Proton transport	Proton transport
14	DDB_G0269196	Beta tubulin	gi 290061	51760,19922	Phagocytic vesicle	Response to bacterium	GTPase activity
15	DDB_G0272560	CABP1 protein	gi 4490373	31676,81055	Unknown	Response to stress	Unknown
16	DDB_G0285793	Calcium-dependent cell adhesion molecule-1	gi 66808651	24138,75977	Phagocytic vesicle	Cell-cell adhesion	Ca+ binding
17	DDB_G0288065	Cell division cycle protein 48	gi 66806375	89241,50781	Phagocytic vesicle	ATP binding	Response to bacterium
18	DDB_G0289663	Chain A, Crystal Structure Of <i>Dictyostelium</i> Caatp-Actin In Complex With Gelsolin Segment 1	gi 7245498	41074,42188	Phagocytic vesicle	Endocytosis	Structural modification
19	DDB_G0291970	Cofilin	gi 66801703	15727,62012	Intracellular	Response to bacterium	Unknown
20	DDB_G0267382	Coronin	gi 11023	49582,10938	Phagocytic vesicle	Filament organization	Actin binding
21	DDB_G0291191	Cysteine protease	gi 66803062	39085,85938	Extracellular space	Proteolysis	Peptidase activity
22	DDB_G0286171	Cytochrome bd ubiquinol oxidase, 14 kDa subunit	gi 66808287	13265,78027	Unknown	Electron transport	Reductase activity

23	DDB_G0269118	Cytochrome c oxidase subunit V	gjl66826157	13659,88965	Phagocytic vesicle	Response to bacteria	Cytochrome-c oxidase activity
24	DDB_G0288907	Delta-24-sterol methyltransferase	gjl66805519	39818,89844	Phagocytic vesicle	Response to bacteria	Sterol 24-C methyltransferase activity
25	DDB_G0273885	Discoidin I, C chain and B chain	gjl66822409	28830,07031	Phagocytic vesicle	Cell adhesion	Unknown
26	DDB_G0288373	Elongation factor 2	gjl167788	92497,57813	Phagocytic vesicle	Response to bacteria	GTP binding
27	DDB_G0277859	Essential myosin light chain (ELC)	gjl66816041	16350,2002	Everywhere	Cell motion	Actin-dependent ATPase activity
28	DDB_G0269242	Fatty acyl-CoA synthetase	gjl28565633	75219,14844	Phagocytic vesicle	Metabolic	Ligase activity
29	DDB_G0277143	G protein b-subunit	gjl66818199	39396,07031	Phagocytic vesicle	Signaling	G-Protein gamma sub-unit binding
30	DDB_G0267400	Heat shock cognate protein	gjl899060	80059,82813	Phagocytic vesicle	Protein folding	Protein binding
31	DDB_G0269144	Heat shock protein	gjl433180	70050,71875	Phagocytic vesicle	Protein folding	Protein binding
32	DDB_G0273623	Heat shock protein	gjl66822147	70088,75	Phagocytic vesicle	Protein folding	Protein binding
33	DDB_G0276445	Heat shock protein Hsp70 family protein	gjl66818991	72664,47656	Phagocytic vesicle	Protein folding	ATP binding
34	DDB_G0273249	Heat-shock cognate protein 70; Hsc70	gjl2564920	70098,67188	Phagocytic vesicle	Protein folding	ATP binding
35	DDB_G0277501	Hypothetical protein	gjl166240554	27352,48047	Centrosome	Response to stress	Unknown
36	DDB_G0281609	Hypothetical protein	gjl66812706	34330,73828	Extracellular space	Unknown	Unknown
37	DDB_G0278333	Hypothetical protein	gjl66816573	71751,49219	Membrane	Signal peptide processing	Peptidase activity
38	DDB_G0273919	Hypothetical protein	gjl66822443	28696,93945	Phagocytic vesicle	N-acetylgalactosamine binding	Response to bacterium
39	DDB_G0277213	Hypothetical protein	gjl66817992	27061,80078	Phagocytic vesicle	Unknown	Unknown
40	DDB_G0293566	Hypothetical protein (DdLysEh3)	gjl66800171	24890,92969	Phagocytic vesicle	Peptidoglycan catabolic process	Lysozyme activity
41	DDB_G0273979	Hypothetical protein	gjl66821987	30401,99023	Proteasome	Proteolysis	Unknown
42	DDB_G0292160	Hypothetical protein	gjl111229232	19656,58008	Unknown	Unknown	Unknown
43	DDB_G0267728	Hypothetical protein	gjl66827811	19638,03906	Unknown	Unknown	Unknown
44	DDB_G0275301	Hypothetical protein	gjl28829775	39307,39844	Unknown	Unknown	Binding
45	DDB_G0283283	Mitochondrial F1 complex ATP synthase, O subunit	gjl66810864	33109,08984	Phagocytic vesicle	Proton transport	Proton transport metalloendopeptidase activity
46	DDB_G0288777	Mitochondrial processing peptidase beta subunit	gjl111226358	52821,78125	Mitochondrial membrane	Mito protein processing	Catalytic activity
47	DDB_G0276473	NAD-dependent epimerase/dehydratase family protein	gjl66819015	40420,85156	Phagocytic vesicle	Metabolic	Catalytic activity
48	DDB_G0286371	NCS-1/frequenin-related protein	gjl50261973	20627,76953	Phagocytic vesicle	Unknown	Calcium binding
49	DDB_G0276153	N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein	gjl2584876	82589,11719	Membrane	Phagocytosis	Protein binding
50	DDB_G0283709	Oxysterol binding family protein	gjl66810540	46327,10938	Phagocytic vesicle	Steroid metabolism	Unknown

51	DDB_G0272813	P34-cdc2 protein		gj 66823249	34036,80859	Intracellular	Phosphorylation	Protein binding
52	DDB_G0291081	Penta EF hand calcium binding protein		gj 66803108	22397,35938	Phagocytic vesicle	Apoptosis	Protein binding
53	DDB_G0282337	Phosphatidylserine decarboxylase proenzyme 2 precursor.		gj 66812174	64370,25	Unknown	Phosphatidylserine decarboxylase activity	Phospholipid biosynthetic process
54	DDB_G0290333	Physaropepsin		gj 66803989	65347,19922	Extracellular space	Unknown	Unknown
55	DDB_G0267786	Pleckstrin homology (PH) domain-containing protein		gj 66827907	61286,07813	Unknown	Unknown	Unknown
56	DDB_G0291091	putative mitogen-activated protein binding protein interacting protein		gj 66803104	10559,34961	Late endosome	Activation of MAPKK activity	Unknown
57	DDB_G0269236	Rab GTPase		gj 66825113	23022,66992	Phagocytic vesicle	ATP binding	Phagocytosis
58	DDB_G0269238	Rab GTPase		gj 66826405	24085,2207	Phagocytic vesicle	Protein transport	GTP binding
59	DDB_G0281337	Rab4		gj 414969	23291,98047	Phagocytic vesicle	Protein transport	GTP binding
60	DDB_G0291858	vacuolar proton ATPase 100-kDa subunit		gj 182702220	93570,35938	Phagocytic vesicle	Proton transport	Unknown
61	DDB_G0272130	Recoverin family protein		gj 66823617	23041,90039	Phagocytic vesicle	Unknown	Calcium binding
62	DDB_G0276077	Regulatory myosin light chain (RLC)		gj 66819307	18368,24023	Everywhere	Cytokinesis	ATPase activity
63	DDB_G0268948	SAM dependent methyltransferase		gj 66827073	33838,17188	Phagocytic vesicle	S-adenosylmethionine-dependent methyltransferase activity (ISS)	Not determined
64	DDB_G0272831	Proteasome subunit alpha-7		gj 28828056	27793,56055	Proteasome	Proteolysis	Peptidase activity
65	DDB_G0276233	Chaperonin containing TCP1 theta subunit		gj 42733848	58872,5	Cytoskeleton	Unfolded protein binding	Protein folding
66	DDB_G0280345	Tetrahricopeptide-like helical domain-containing protein (TPR)		gj 66814424	36915,28906	Phagocytic vesicle	Unknown	Binding
67	DDB_G0268810	Magnesium-translocating P-type ATPase		gj 66827257	106100,0391	Membrane	Transport	Magnesium transporter
68	DDB_G0279721	Ubiquitin		gj 167945	25660,75	Everywhere	Protein modification	Everywhere
69	DDB_G0273071	Vacuolar ATPase subunit DVA41		gj 532733	41148,26172	Phagocytic vesicle	ATP synthesis proton transporter	Proton transport
70	DDB_G0287127	Vacuolar H+-ATPase A subunit		gj 66807257	68670,71875	Phagocytic vesicle	Response to bacteria	Unknown
71	DDB_G0291858	Vacuolar proton ATPase 100-kDa subunit		gj 66802220	93714,42188	Phagocytic vesicle	Proton transport	Unknown

Oligonukleotide für die rekombinante Expression:

Alle Oligonukleotide wurden bei der Firma Biomers bestellt. Die Schmelztemperatur wurde mit dem Programm Oligocalculator berechnet.

rApl B2_F1	5' GAGAGGATCC GGTATTTTAGAATGTGACATTTGCC 3'
rApl B2_R1	5' GCGGTCTTGTTCGGTTTATGTTAATAAGAATTCTCTC 3'
rApl B3_F1	5' GGTGAACTGGAATGTGGTGT 3'
rApl B3_R1	5' CGGTACAAACAACGGTTGCG 3'
rApl C_F1	5' GATGCCGAATGCATGCTG 3'
rApl C_R1	5' TGTTCAAAATGGTGGTCGG 3'
rApl D_F1	5' CAGTGCCAGATTTGCGAACTG 3'
rApl D_R1	5' GCAAATTTCTTGC GGATCATCATG 3'

Reinigung von rApl B2:

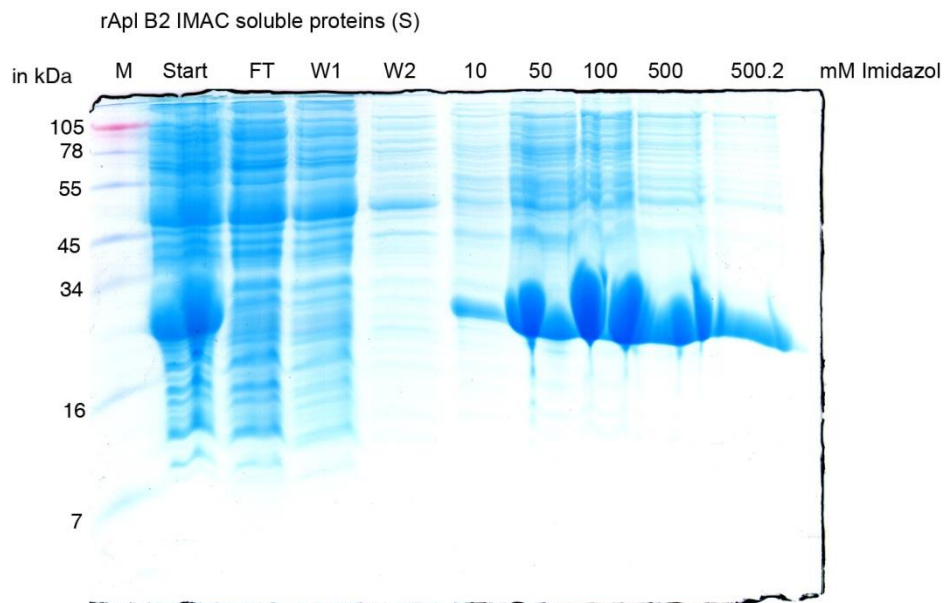


Abb. 38: Reinigung des Fusionsproteins rApl B2 über IMAC. Als Startmaterial wurde der Proteinextrakt aus den Bakterien verwendet und das Fusionsprotein in den Fraktionen 50, 100 und 500 mM Imidazol in 1x TBS angereichert.

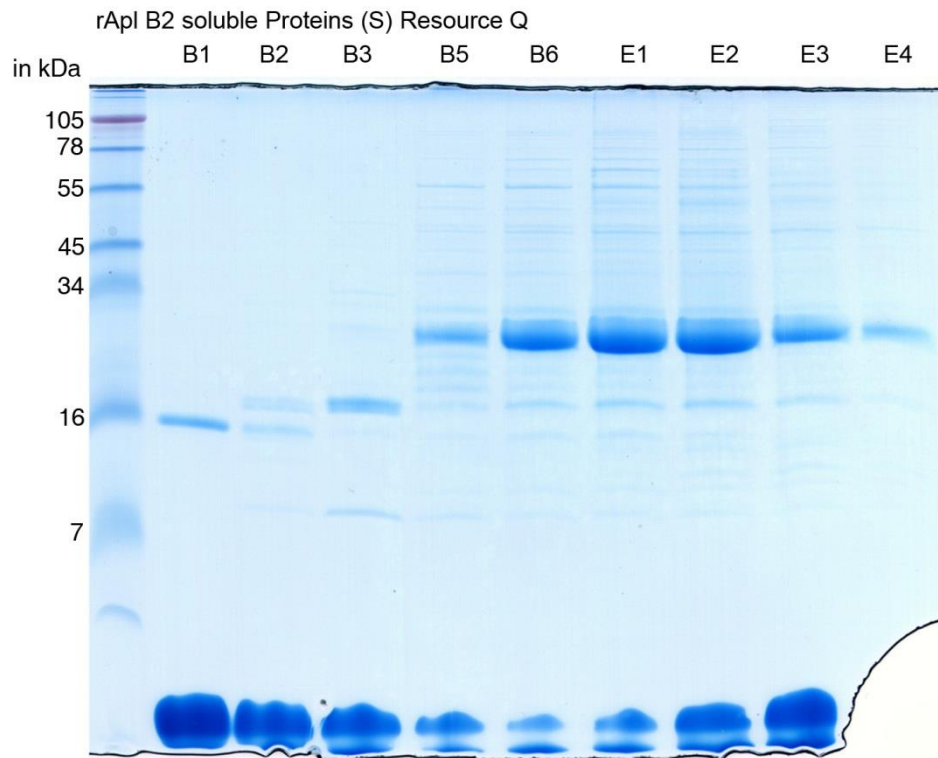


Abb. 39: Reinigung des Fusionsproteins rApl B2 über Anionenaustausch-Chromatographie. Das Fusionsprotein wurde mittels einer Resource Q 1ml-Säule weiter gereinigt.

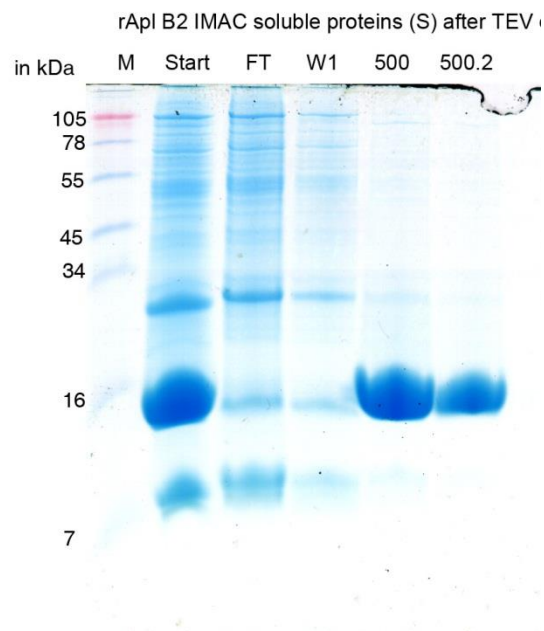


Abb. 40: Proteolytische Spaltung von rApl B2. Das Fusionsprotein wurde mit der TEV-Protease gespalten und ein weiteres Mal über die IMAC-Säule gegeben, um den tag und die Protease zu entfernen.

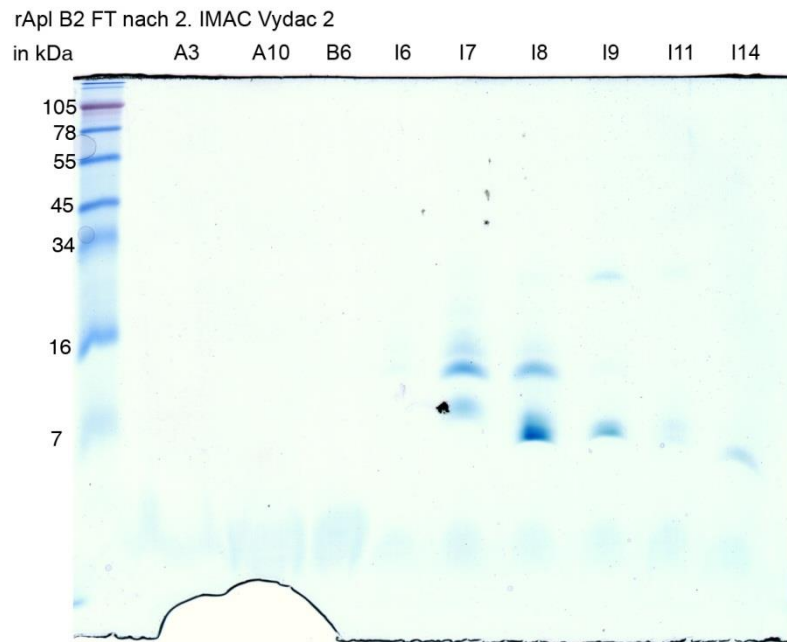


Abb. 41: Reinigung von geschnittenem rApl B2 über RP-HPLC. Das geschnittene Protein wurde über eine Vydac HPLC-Säule von den restlichen Proteinkontaminationen befreit. Für die funktionalen Assays wurde ausschließlich die Fraktion I9 verwendet.

Kontrolle der Beeinträchtigung der Aktivität von rApl D im *SYTOX Green*-Assay durch den Farbstoff *SYTOX Green*.

Der in den Analysen zur membranpermeabilisierenden Aktivität verwendete Farbstoff *SYTOX Green* interkaliert mit DNA, die negativ geladen ist. Es sollte überprüft werden, ob der Farbstoff auch an das negativ geladene Protein rApl D bindet und eine mögliche Aktivität unterbindet. Um einen Effekt des Farbstoffes auf das anionische Protein rApl D auszuschließen, wurde der Farbstoff im Liposomen-Depolarisations-Test zusammen mit rApl D eingesetzt.

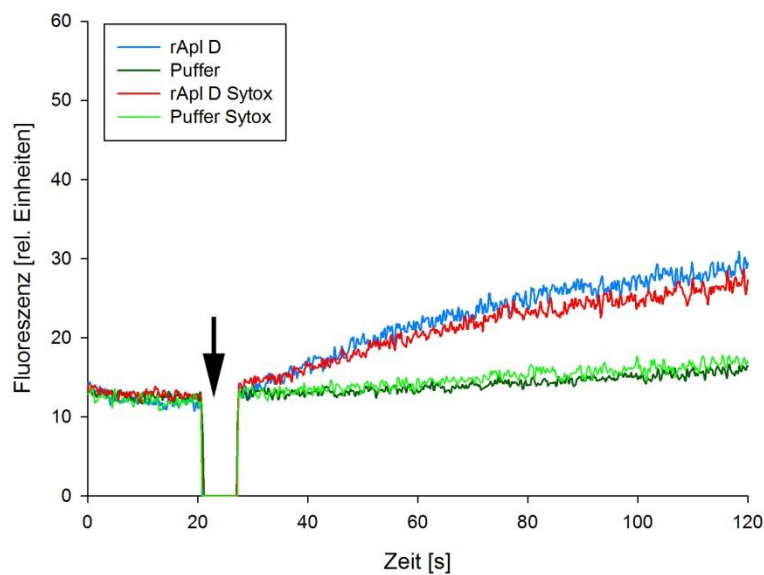


Abb. 42: Porenbildende Aktivität von rApl D mit und ohne *SYTOX Green*. Die Abbildung zeigt die Freisetzung des Fluoreszenzfarbstoffs nach Zugabe von rApl D (Pfeil). Der Farbstoff *SYTOX Green* wurde in der Küvette final mit 1 μM eingesetzt.

Die porenbildende Aktivität von rApl D ist unabhängig von der Anwesenheit von 1 μM *SYTOX Green*.

ERKLÄRUNG

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen benutzt habe. Die Arbeit wurde an keiner anderen Universität zur Begutachtung eingereicht noch habe ich ein anderes Promotionsverfahren ohne Erfolg abgeschlossen.

Die Arbeit ist unter Einhaltung der Regeln guter wissenschaftlicher Praxis der Deutschen Forschungsgemeinschaft entstanden.

Kiel, den 12. Juni 2013

Moritz Bitzhenner

Danksagung

An erster Stelle möchte ich meinem Doktorvater Prof. Dr. Matthias Leippe für die Überlassung des interessanten Themas, endlose fruchtbare Diskussionen und konstruktive Ratschläge danken.

Ich möchte ebenso Prof. Dr. Eric Beitz für die Übernahme des Koreferats danken.

Ein besonderer Dank geht an Dr. Christoph Gelhaus für seine unsagbar wertvollen Ratschläge und Tipps bei den praktischen Problemen des Laboralltags und für seinen großen Ideenreichtum. Auch möchte ich Christoph und Maren Hartelt für Ihren Einsatz bei den massenspektrometrischen Analysen danken.

Des Weiteren geht mein aufrichtiger Dank an Heidrun Ließegang für Ihren unzerstörbaren Optimismus, die ständigen kleinen Hilfen im Labor und unzählige SYTOX *Green-Assays*.

Ich möchte mich bei Dr. Matthias Michalek für die Aufnahme des CD-Spektrums und die vielen nützlichen Hinweise bei der Erstellung des Proteinmodells danken.

Ich danke Prof. Dr. Andreas Tholey und Dr. Thorsten Overath für die Analyse der Proben via LC-MS/MS in der Arbeitsgruppe „Systematische Proteomics und Bioanalytik“ des Instituts für Experimentelle Medizin.

Ich möchte allen aktuellen und ehemaligen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Zoophysiologie I und II danken, besonders Henning Fedders, Aylin Höckendorf, Tasja Rahn, Christine Fink, Julia Hoffmann, Ranjani Dhakshinamoorthy, Stephan Philipp, Saskia Viebig, Sigmund Sperstad und Heidrun Wegner für eine von Hilfsbereitschaft geprägte Arbeitsatmosphäre und viele schöne gemeinsame Stunden.

Meinen Eltern und Geschwistern danke ich für die maternale Rechtschreibprüfung, die fortwährende Unterstützung und viele aufmunternde Worte. Des Weiteren möchte ich Dr. Anke Bergmann und Dr. Beate Schulze für die guten Korrekturvorschläge danken. Ein besonderer Dank geht an meine Ehefrau Dr. Sigrid Bitzhenner für das aufopferungsvolle Korrekturlesen der ersten Fassung, die emotionale Unterstützung und ihre endlose Nachsicht, wenn es im Labor mal wieder etwas länger gedauert hatte.