

Daniel Gotthardt

Dr. med.

## **Untersuchung der Phagozytose in dem Modellorganismus *Dictyostelium discoideum***

Geboren am 18.11.1973 in Bonn

Reifeprüfung am 8.6.1994 in Koblenz

Studiengang der Fachrichtung Medizin vom SS 1997 bis SS 2003

Physikum am 23. März 1998 an der Universität Heidelberg

Klinisches Studium in Heidelberg

Praktisches Jahr in Heidelberg

Staatsexamen am 28.5.2003 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Biochemie

Doktorvater: Priv.-Doz. Dr. sci. nat. Thierry Soldati

Die vorliegende Arbeit „Untersuchung der Phagozytose in dem Modellorganismus *Dictyostelium discoideum*“ besteht im wesentlichen aus zwei Abschnitten. Der erste befaßt sich mit der möglichen Mitwirkung der Kontraktilen Vakuole (KV) bei der Ausbildung und Reifung des Phagosoms. Für diese Analyse wurden Methoden der konfokalen Mikroskopie mit nachfolgender Bildbearbeitung und statistischer Auswertung verwendet. Der zweite Teil enthält zunächst die Etablierung eines Protokolls zur Aufreinigung von Phagosomen, die danach in verschiedensten Verfahren untersucht worden sind, um Einblicke in die molekulare Maschinerie dieses Prozesses zu gewinnen.

*D. discoideum* ist eine Amöbe, also ein kernhaltiger Einzeller, das ursprünglich zur Untersuchung von Chemotaxis und seiner Fähigkeit zur Ausbildung von mehrzelligen Organisationsstrukturen bei widrigen Umweltverhältnissen diente. Da es ferner über enorme Phagozytoseraten verfügt und hier Analogien zu Makrophagen in Säugetieren aufweist, verwendet man es als Modellsystem für diese. *D. discoideum* bietet viele Vorteile u.a. ermöglicht die Aufzucht in Schüttelkulturen die einfache Untersuchung an einer großen Anzahl von Zellen, und seine gute Möglichkeiten zur genetischen Manipulation erlauben vielfältige Studien anhand von Knock-out-Mutanten oder überexprimierenden Systemen.

Da phagozytierende Zellen eine so große Anzahl von Phagosomen, also intrazelluläre, membranumhüllte Strukturen, aufnehmen können, dass die hierfür verwendeten Membranoberflächen ein Vielfaches der Plasmamembran darstellen, ist eine wichtige Frage bei der Untersuchung der Phagozytose, die Herkunft dieser Membranen aufzuklären. In *D. discoideum* erfolgt der Ausgleich des osmotischen Druckes zur Umwelt über ein weitverzweigtes Membransystem, die Kontraktile Vakuole, die gleichzeitig einen Großteil der v-ATPase enthält, das ebenfalls auf Phagosomen sehr stark angereichert ist. Eine mögliche Kommunikation zwischen KV und Phagosom sollte über eine Verschiebung von v-ATPase meßbar sein. Daher wurden Zellen mit Hefen gefüttert und diese Zellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten hinsichtlich der Verteilung der v-ATPase analysiert. Die Zellen wurden mittels konfokaler Mikroskopie aufgenommen, die Daten anschließend per Dekonvolution aufgearbeitet und statistisch ausgewertet. Die Ergebnisse zeigten eine hohe Lokalisation der v-ATPase an der KV in Zellen ohne Phagosomen. In Zellen mit Phagosomen nahm diese Kolokalisation deutlich ab und die v-ATPase war zu einem beträchtlichen Anteil auf den Phagosomen nachweisbar, so dass man dieses als starken Hinweis auf eine Beteiligung der KV an der Phagozytose werten darf.

Für Makrophagen gibt es ein Protokoll zur Aufreinigung von Phagosomen, das darauf beruht, dass Latex-Kügelchen phagozytiert werden, so aufgrund des Latex Phagosomen mit einer sehr geringen Dichte entstehen, die dann nach Aufschließung der Zellen mit Hilfe eines Sukrose-Dichtegradienten von anderen Zellbestandteilen getrennt werden. Für *D. discoideum* sollte nun das Protokoll adaptiert werden. Hierbei fiel vor allem die hohe Kontamination der Phagosomen auf. So konnte eine große Menge an mitochondrialen Proteinen und Bestandteilen des Endoplasmatischen Retikulums nachgewiesen werden. Der Zusatz von ATP erwies sich als großer Fortschritt, der die Verunreinigungen stark verminderte bei gleichzeitiger Erhaltung der erwünschten Proteine. Verantwortlich für diesen Effekt ist die Auflösung eines Netzwerkes aus Aktin und Myosin II, das Phagosomen mit den Kontaminanten verbindet und so diese innerhalb des Gradienten mitgeschleppt. Der nächste Schritt bestand in der Erstellung eines Pulse-Chase-Setup, das Phagosomen zu verschiedenen Reifungszeitpunkten lieferte. Es war nun möglich, eine große Anzahl intakter und unverfälschter Phagosomen zu verschiedenen Reifungsstadien aufzureinigen, die unterschiedlichen Analysemethoden zugeführt wurden. Zunächst wurde durch quantitative Auswertung von Immunoblots die Kinetiken verschiedenster Proteine aufgezeigt, die bei der Phagozytose eine Rolle spielen. Hierdurch konnte gezeigt werden, dass mindestens drei Phasen des Transport zum Phagosom und drei des Abtransportes durchlaufen werden. Ebenso

konnte gezeigt werden, dass die Anreicherung von unterschiedlichen Hydrolasen mit dem Eintreffen differierender Proteine der SNARE-Maschinerie zusammenfällt. Dann wurde ein Proteom der Phagosomen mittels 2-D-SDS-PAGE und Massenspektrometrie erstellt, das über 120, zum Teil neue Mitspieler der Phagozytose lieferte. Ein Mustervergleich von 2-D-Gelen von Phagosomen zu verschiedenen Zeitpunkten ergab interessante Verlaufsprofile der verschiedenen Proteine. Im Rahmen einer Zusammenarbeit mit dem BZH konnte eine Analyse der Lipidzusammensetzung von Phagosomen und ihre Veränderung über die Zeit erfolgen, die eine spezialisierte Komposition von Phagosomen gegenüber Gesamtmembranen aufzeigte und ebenfalls eine Reifung dieser über die Zeit. In einem weiteren Schritt demonstrierte die Untersuchung von Myosin IB-Knock-Out-Zellen, dass hier ein Recyclingdefekt und ein Mangel in der Anreicherung der Hydrolase Cathepsin D existiert. Im Rahmen dieser Arbeit konnte ein stark erweitertes Protokoll zur Aufreinigung von Phagosomen etabliert werden, das es ermöglichte, detaillierte Kinetiken von Proteinen zu erstellen, ein Proteom und Ansätze eines Lipidoms von Phagosomen aufzubauen, die Aufgabe von Myosin IB hierbei zu analysieren und somit neue, wesentliche Erkenntnisse über die Phagozytose zu gewinnen und zusätzliche, molekulare Mitspieler aufzudecken.