

Aus dem Institut für Mikrobiologie und Hygiene der Medizinischen Fakultät Charitè-Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Etablierung einer Methode zum Nachweis von Diacylglycerol, einem Signalisationsmediator mit potenzieller Funktion bei der Epithelzellinvasion durch *E. coli* Shigella

Zur Erlangung des akademischen Grades Doctor medicinae (Dr. med.)

Vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charitè – Universitätsmedizin
Berlin

von

Hendrik Güthenke

aus Berlin

Gutachter: 1. Priv. Doz. Dr. Th. Adam
2. Prof. Dr. med. R. Tauber
3. Prof. Dr. M. Aepfelbacher

Datum der Promotion: 25.11.2009

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	I
GLOSSAR	1
1 EINLEITUNG	4
1.1 Klassifikation im Wandel	4
1.2 Shigellosis	5
1.2.1 Definition, ätiologische Gesichtspunkte und Symptomatik	5
1.2.2 Histopathologische Aspekte der Shigellosis	6
1.2.3 Primäre Invasion	6
1.2.4 Intrazelluläre Bewegung und laterale Ausbreitung von Shigella	8
1.3 Genetische und molekulare Aspekte der Invasion	9
1.4 Die Rolle der kleinen GTPasen der Rho-Familie	13
1.5 Phospholipidstoffwechsel	14
1.5.1 Phospholipide sind involviert in signaltransduktive Prozesse	14
1.5.2 Phospholipasen	14
1.5.2.1 Phospholipase A	14
1.5.2.2 Phospholipase C	16
1.5.2.3 Phospholipase D	17
1.5.3 Phosphatidylinositol-(4,5)-Bisphosphat beeinflusst das Aktinzytoskelett-Remodelling	19
1.5.4 Schnittstellen zwischen der bakteriellen Invasion und dem Phospholipidstoffwechsel	20
1.6 Fragestellung	21
2 MATERIAL UND METHODEN	22
2.1 Material	22
2.1.1 Biologisches Material	22
2.1.1.1 Zelluläre Komponenten	22
2.1.1.2 Bakterielle Komponenten	22
2.1.2 Geräte	22
2.1.3 Chemikalien	24
2.1.4 Enzyme	25

Inhaltsverzeichnis	II
2.1.5 Nährmedien	25
2.1.6 Bestandteile verwendeter Reagenzien.....	25
2.1.6.1 Antibiotika	25
2.1.6.2 Medien	26
2.1.6.2.1 Flüssigmedien.....	26
2.1.6.2.2 Feste Medien	26
2.1.6.3 Puffer und Lösungen.....	27
2.1.7 Sonstige Materialien	29
2.2 Methoden.....	29
2.2.1 Zellbiologische Methoden.....	29
2.2.1.1 Anlegen einer HeLa-Zellkultur mit definierter Zellzahl.....	29
2.2.1.2 Anfärbung des zytoskelettalen F-Aktins durch Bodipy markiertes Phalloidin.....	31
2.2.1.3 Eindecken der Deckgläschen auf einen Objektträger	32
2.2.2 Bakteriologische Methoden	32
2.2.2.1 Stammhaltung	32
2.2.2.2 Inokulation.....	32
2.2.2.3 Herstellung infektiöser Lösungen mit definierter Anzahl Bakterien	32
2.2.2.4 Infektion der HeLa-Zellkulturen mit SC300 und SC301	33
2.2.3 Bestimmung des Proteingehaltes.....	34
2.2.4 Phospholipidgewinnung durch Chloroformextraktion.....	34
2.2.5 Solubilisierung und Aktivierung der Phospholipide.....	35
2.2.6 Herstellung eines Reaktionsansatzes für die enzymatische Phosphorylierung des Diacylglycerols	35
2.2.7 Enzymatische Reaktion: Initiation, Termination und Phospholipidextraktion	36
2.2.8 Dünnschichtchromatographie.....	36
2.2.8.1 Mobile Phase und Dünnschichtchromatographiekammer	36
2.2.8.2 Dünnschichtchromatographieplatten	36
2.2.8.3 Chromatographische Auftrennung der Phospholipide	37
2.2.9 Normalisierung.....	37
2.2.10 Identifizierung in den Proben enthaltener Phospholipide.....	38
2.2.11 Herstellung eines Zellpools	38
2.2.12 Phospholipidanteil bakterieller Membranen	39
2.2.13 Abhängigkeit der DAG-Kinase von der Reaktionszeit.....	39
2.2.14 Abhängigkeit der DAG-Kinase von der Reaktionstemperatur.....	39
2.2.15 Solubilisierung der Phospholipide in unterschiedlichen Chloroform/ Methanol-Gemischen	40
2.2.16 Suche nach ungelösten Phospholipiden	41
2.2.17 Negativkontrolle.....	42
2.2.18 Untersuchung der Substratkonkurrenz zwischen "kaltem" und "heißem" ATP am Enzym DAG-Kinase	42

2.2.19	Untersuchung aller Bestandteile des Reaktionsansatzes zum Ausschluss möglicher DAG-Kontaminationen	43
2.2.19.1	Untersuchung des 20,0 mM ATP und des ^{32}P - γ -ATP	43
2.2.19.2	Additionsexperiment zum Ausschluss einer DAG-Kontamination	44
2.2.19.3	Subtraktionsexperiment zum Ausschluss einer DAG-Kontamination	45
2.2.19.4	Untersuchung der einzelnen Bestandteile des 2X Reaktionspuffers	46
2.2.19.5	Untersuchung des Cardiolipins als ein mögliches Substrat der DAG-Kinase	47
3	ERGEBNISSE	49
3.1	Ausschluss bakterieller Störfaktoren	49
3.2	Charakterisierung des Enzyms DAG-Kinase	50
3.2.1	Zeitabhängigkeit der DAG-Kinase-Reaktion	50
3.2.2	Temperaturabhängigkeit der DAG-Kinase-Reaktion	51
3.2.3	Abhängigkeit der DAG-Kinase Reaktion von der Ausgangsmenge an Kosubstrat ^{32}P - γ -ATP	51
3.2.4	Reaktivität der DAG-Kinase	52
3.3	Nachweis einer DAG-Kontamination	53
3.3.1	Ausschluss einer Kontamination von ATP und ^{32}P - γ -ATP	53
3.3.2	Das Additionsexperiment	54
3.3.3	Das Subtraktionsexperiment	54
3.3.4	Ausschluss einer Kontamination des 2X Reaktionspuffers	55
3.3.5	Nachweis der Kontaminierung des Detergens	55
3.4	Aussagen zur Phospholipidfraktion	56
3.5	Infektionskinetik	57
4	DISKUSSION	59
4.1	Diskussion der Methoden	59
4.1.1	Zellkulturelle Methodik	59
4.1.2	Infektion	59
4.1.3	Isolierung der Phospholipide	60
4.1.4	Solubilisierung der Phospholipide	61
4.1.5	Enzymatische Reaktion	62
4.1.6	Chromatographie und Detektion der Phospholipide	63
4.1.7	Auswertung	63
4.2	Diskussion der Ergebnisse	64

4.2.1	Theoretische Betrachtungen zur Rolle des Diacylglycerins während der Infektion von Zellkulturen durch <i>E. coli</i> Flexneri.....	64
4.2.2	Biomembranen als Ressourcen	66
4.2.3	Verlängerte Inkubationszeiten ergeben keine höhere DAG-Utilisation	68
4.2.4	Inkubationstemperatur unter Berücksichtigung enzymkinetischer Aspekte.....	69
4.2.5	Interaktionen zwischen ATP und ³² P-γ-ATP als Kosubstrate der DAG-Kinase	70
4.2.6	Cardiolipin ist ein Kofaktor und Substrat der DAG-Kinase.....	71
4.3	Diskussion der Strategie.....	73
4.3.1	Der theoretische Ansatz	73
4.3.2	Der experimentelle Ansatz	74
5	ZUSAMMENFASSUNG	75
	LITERATURVERZEICHNIS	77
	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	87
	TABELLENVERZEICHNIS	88
	LEBENS LAUF	89
	ERKLÄRUNG.....	90
	DANKSAGUNG	91

Glossar

A	Angström, Längenmaß, 1 A = 0,1 nm (Nanometer)
Arp2/3	2 der 7 Untereinheiten des "Actin-related-proteins"-Komplexes, die den Aktinmonomeren ähneln und als Nukleationszonen für weitere Aktinmonomere fungieren.
CD	"Cluster of differentiation"- Gruppen immunphänotypischer Oberflächenmerkmale von Zellen, die sich nach funktionellen und biochemischen Kriterien unterscheiden lassen.
Cdc42	Kleine GTPase der Rho-Familie. Cdc42 entspricht "cell-division-cycle-gene 42".
DAG	Diacylglycerol bzw. Diacylglycerin
EHEC	Enterohämorrhagische <i>Escherichia coli</i> , darmpathogene Bakterie, Pathogenität beruht auf plasmidkodierten Adhärenzgenen und Sekretion enterotoxischer Toxine, Verursacher einer enterohämorrhagischen Kolitis und des Hämolytisch Urämischen Syndroms.
EIEC	Enteroinvasive <i>Escherichia coli</i> , darmpathogene Bakterie, Penetration der Kolonschleimhaut, Verursachung ulceröser Kolitiden, klinisches Bild entspricht der bakteriellen Ruhr.
ETEC	Enterotoxische <i>Escherichia coli</i> , darmpathogene Bakterie, Adhärenz am Darmepithel über Haftungsfimbrien, Sekretion von Toxinen, dadurch Stimulation der Adenylat- bzw. Guanylatcyclase und hieraus folgende NaCl-Resorptionshemmung durch die Dickdarmzellen, führt zum klinischen Bild einer ausgeprägten wässrigen Diarrhoe.
eNOS	"Endothelial Nitric-Oxide-Synthetase", endotheliale Stickstoffoxid-Synthetase, Katalyse der Oxidation der Aminogruppe der Aminosäure Arginin in Anwesenheit von Sauerstoff.
GAP	GTPase-aktivierendes-Protein, Regulatorprotein der kleinen GTPasen, initiiert GTP-Hydrolyse und bedingt dadurch Inaktivierung des G-Proteins.
GDI	GDP-Dissoziation-Inhibitor, stabilisiert den GDP-gebundenen und somit den inaktiven Zustand des G-Proteins.
GDP	Guanosindiphosphat

GEF	GTP-Exchanging-Factor, Regulatorprotein der kleinen GTPasen, Aktivierung des G-Proteins durch Initiierung des GDP/ GTP-Austausches.
GTP	Guanosintriphosphat
GTPase	Proteine mit intrinsischer GTP-Hydrolyse Aktivität, die im Zusammenhang mit signaltransduktiven Prozessen als "molekulare Schalter" dienen. Der GTP-gebundene Zustand kennzeichnet ein aktives, der GDP-gebundene Zustand ein inaktives Protein.
<i>his</i> -Region	Histidin-reicher Abschnitt auf dem Bakterienchromosom von Shigella
<i>icsA</i>	"Intracellular/ intercellular spread"- Gen auf dem Virulenzplasmid, das die intrazelluläre Bewegung von Shigella durch Aktinpolymerisation ermöglicht."
<i>ipa</i>	"Invasion-plasmid-antigen"-Gen auf dem Virulenzplasmid von Shigella. Kodierung der Ipa-Proteine, die essenziell für die zelluläre Invasion bzw. das Entweichen von Shigella aus der phagozytotischen Vakuole sind.
<i>ipg</i>	Gen des Virulenzplasmids von Shigella, das verschiedene Chaperone verschlüsselt.
kb	Kilobase, Maßeinheit für die Länge eines DNA -Abschnittes, entspricht 1000 Nukleotiden.
<i>kcp</i>	"Keratokonjunctivitis provocation locus"-Gen auf dem Bakterienchromosom von Shigella.
kDa	10 ³ Da (Dalton), Maß für das Molekulargewicht.
IL1	Interleukin 1, Zytokin
IL8	Interleukin 8, Zytokin
INF	Interferon, Zytokin
IP ₃	Inositoltriphosphat, 2nd Messenger
Ipa	Invasion-plasmid-antigen
LDC	Lysindecaboxylase
MALT	Mucosa associated lymphatic tissue.
MDa	10 ⁶ Da, Maß für das Molekulargewicht.
MG	Molekulargewicht
<i>mtl</i>	Mannitol locus. Gen auf dem Bakterienchromosom von Shigella.

<i>mxI</i>	Gen auf dem Virulenzplasmid von <i>Shigella</i> , das die Membranexpression von <i>lpa</i> verschlüsselt.
N-WASP	“Neurales Wiskott Aldrich Syndrom Protein“, Protein, das über Aktivierung des Arp2/3-Komplexes die Aktinpolymerisation induziert.
Olm	“Organelle-like-movement“-kernwärts gerichtete Bewegung von <i>Shigella</i> entlang von Stressfasern.
PKC	Proteinkinase C
PL	Phospholipid(e)
PLA	Phospholipase A
PLC	Phospholipase C
PLD	Phospholipase D
PPH	Phosphatidat Phosphohydrolase
PS	Phosphatidsäure
PtdCho	Phosphatidylcholin
PtdInsP ₂	Phosphatidylinositolbisphosphat
PtdInsP	Phosphatidylinositolphosphat
RNA	Ribonukleinsäure
<i>spa</i>	Gen auf dem Virulenzplasmid von <i>Shigella</i> , das die Membranoberflächenpräsentation von <i>lpa</i> verschlüsselt.
VASP	“Vasodilatator stimuliertes Phosphoprotein“, regulatorisches Aktinbindendes Protein, involviert in Prozesse der Zelladhäsion und des Zytoskeletts.
<i>virG</i>	Gen des Virulenzplasmids, entspricht <i>icsA</i> .
<i>virA</i>	Gen des Virulenzplasmids, dessen Genprodukt Einfluss auf die intra- und interzelluläre Ausbreitung von <i>Shigella</i> hat.

1 Einleitung

1.1 Klassifikation im Wandel

Die heute noch zum Großteil verwendete Nomenklatur beschreibt *Shigella* als eigenständigen Genus innerhalb der Familie der *Enterobacteriaceae* und unterteilt vier Spezies: *S. boydii*, *S. dysenteriae*, *S. flexneri* und *S. sonnei*. Traditionell wurden *Shigella* Stämme durch die bestehende Pathogenität, die fehlende Laktosefermentation und die Unbeweglichkeit gegenüber *E. coli* Stämmen abgegrenzt. Schwierigkeiten boten sich jedoch, als pathogene Stämme (ETEC, EHEC, EIEC) mit charakteristischen Merkmalen von *E. coli* isoliert wurden. Diese Varianten wurden fortan als pathogene Formen von *E. coli* bezeichnet. Damit ließ sich die bis dahin gültige Vorstellung, dass es innerhalb einer Spezies keine Stämme mit konträren Eigenschaften gäbe, nicht aufrechterhalten. Zusätzlich zeigten EIEC eine ähnliche Pathogenese wie Shigellen, und Kreuzreaktionen von EIEC mit den *Shigella* typischen Antisera konnten beobachtet werden. Daneben wurden Ähnlichkeiten der Zytotoxine SLT1 und SLT2 von EHEC mit dem Shiga-Toxin von *S. dysenteriae* beschrieben [1, 2]. Folglich existierten fortan berechnete Zweifel an der Autonomie von *Shigella* als eigene Gattung. Allein die Pathogenität schien jedenfalls kein hinreichender Grund zu sein. Trotzdem haben aufgrund des Ernstes der Erkrankung Shigellosis und der engen Assoziation mit dem Namen der Gattung getrennte Genera in der internationalen Klassifikation weiterhin ihren Bestand.

Anhand der Multilocus-Enzym-Elektrophorese und von Sequenzanalysen des chromosomalen *mdh*-Gens in *E. coli* und *Shigella* konnte gezeigt werden, dass die o.g. konventionelle Klassifizierung von *Shigella* keine Berechtigung mehr hat. Vielmehr ist *Shigella* als Klon der Spezies *Escherichia coli* zu betrachten. Chromosomale Analysen an 46 repräsentativen Stämmen der vier klassischen "Shigella-Spezies" zeigen eine Eingliederung dieser in drei Konglomerate mit typischem DNA-Muster. Die *S. sonnei* und *S. dysenteriae* Stämme 1,8 und 10 präsentieren eine differente DNA-Basenabfolge, sind aber auch eindeutig der Spezies *E. coli* zuzuordnen. *S. boydii* 13 ist weder *Shigella* noch *E. coli* klar zuzurechnen [3, 4]. Weiterhin demonstrierten vergleichende Sequenzanalysen der auf dem Virulenzplasmid lokalisierten *ipgD*-, *mxiC*- und *mxiA*-Gene von *Shigella* und von zwei enteroinvasiven *E. coli*-Stämmen die phylogenetische Verwandtschaft [5].

Im Rahmen dieser Arbeit werden daher zur Unterstreichung der phylogenetischen Zusammenhänge die vier traditionellen "Shigella-Spezies" als Klone der Gattung *Escherichia coli* betrachtet, und als *E. coli* Dysenteriae, Flexneri, Sonnei und Boydii bezeichnet.

1.2 Shigellosis

1.2.1 Definition, ätiologische Gesichtspunkte und Symptomatik

Die Shigellose ist eine bakterielle entzündliche Erkrankung des Kolons mit Meldepflicht. Synonym werden die Begriffe Bakterienruhr oder Dysenterie verwendet. Erreger sind enteropathogene Shigellen. Der Name Shigella ist auf den japanischen Bakteriologen Kiyoshi Shiga zurückzuführen, der 1896 erstmals *Bacillus dysenteriae* (heute: *S. dysenteriae*, Typ 1) isolieren konnte. Die Shigellose zeigt unter schlechten hygienischen Bedingungen und besonders in Kriegszeiten eine hohe Prävalenz. Dies erklärt, warum sie heute in entwickelten Ländern allenfalls sporadisch auftaucht. In den sogen. Entwicklungsländern ist die Ruhr noch immer von Bedeutung. Ihr Vorkommen ist dort meist endemisch, wird aber ebenso epidemisch beobachtet. Es besteht weltweit eine jährliche Inzidenz von 150 Millionen Fällen, wovon ca. 95% in den Entwicklungsländern auftreten. Ähnlich verhält es sich mit den ungefähr 600000 Todesfällen pro Jahr [6]. Die Infektion erfolgt fäkal-oral direkt oder indirekt über kontaminierte Lebensmittel. Seltener ist auch eine Schmierinfektion möglich. Als Infektionsquelle und natürlicher Wirt kommt nur der Mensch vor [7]. Außerordentlich geringe Erregerzahlen zwischen 10 bis 100 Bakterien können schon zum klinischen Bild der Ruhr führen [8]. Dies ist zum einen durch die hohe Virulenz der Erreger bedingt. Zum anderen sind Shigellen vergleichsweise resistent gegenüber dem sauren Milieu des oberen Gastrointestinaltraktes, so dass sie die Säurebarriere gut überwinden können [9].

Shigella gehört als Klon der Spezies *E. coli* der Familie *Enterobacteriaceae* an [3, 10]. Morphologisch sind es Stäbchenbakterien, und aufgrund der dünnen Mureinschicht in der Zellwand erscheinen sie in der Gramfärbung negativ. Des Weiteren sind Shigellen fakultativ anaerob, unbegeißelt und unbeweglich. Im Gegensatz zu den meisten in der Darmflora ansässigen Bakterien können sie keine Säure aus Milchzucker bilden, eine Eigenschaft, die sie mit der Mehrheit von *Salmonella* teilen, und die sich differentialdiagnostisch ausnutzen lässt. Unterscheiden lassen sich anhand biochemischer und serologischer Merkmale vier Serogruppen: *E. coli* *Boydii*, *E. coli* *Dysenteriae*, *E. coli* *Flexneri* und *E. coli* *Sonnei*. Eine exaktere Unterteilung in Serotypen (=Serovaren) erfolgt durch Analyse der O-Antigene, speziellen Polysaccharidketten des Lipopolysaccharidkomplexes der äußeren Membran. Das bei anderen Enterobakterien in den Geißeln vorkommende H-Antigen und das in den Kapseln ansässige K-Antigen sind bei Shigellen nicht existent. Demnach werden *E. coli* *Boydii*, *E. coli* *Dysenteriae* und *E. coli* *Flexneri* in 18, 6 bzw. 15 Serotypen subsumiert [7]. *E. coli* *Sonnei* ist serologisch einheitlich [7]. Alle vier Klone sind in der Lage, die dysenterische Symptomatik hervorzurufen. Schwere Verläufe werden hauptsächlich durch *E. coli* *Dysenteriae* verursacht. Der Erreger wird gehäuft in tropischen und subtropischen Klimazonen im Rahmen plötzlich auftretender, größerer Epidemien mit hoher Mortalität isoliert [11, 12]. Nur *E. coli* *Dysenteriae* Typ 1 produziert das Shiga-Toxin. Dieses inhibiert die eukaryotische Proteinbiosynthese durch Bindung an die 60S-Untereinheit des Ribosoms und folgender Spaltung der 28S-r-RNA. Dadurch entstehen die Epithelschäden im Kolon und die Dünndarmdiarrrhoe [13, 14]. Für das endemische Auftreten der Ruhr stehen *E. coli* *Flexneri* in tropischen Gebieten und *E. coli* *Sonnei* in hiesigen Breitengraden [6, 15, 16]. Infektionen mit *E. coli* *Sonnei* verlaufen

i. d. R. unter dem Bild einer milden Diarrhoe. *E. coli* *Boydii* wird insgesamt selten gesehen. Der Erregernachweis erfolgt kulturell aus dem Stuhl im Rahmen der TPER-Untersuchung (=Typhus, Paratyphus, Enteritis, Ruhr), die neben Shigellen auch die obligat darmpathogenen Salmonellen und Yersinien nachweist. Die genaue Klassifikation erfolgt wie oben beschrieben serologisch bzw. biochemisch.

Im Rahmen einer Shigellose werden unterschiedliche Verlaufsformen beobachtet. So kann sich die Ruhr als harmlose Durchfallerkrankung präsentieren, aber auch dramatische Krankheitsbilder mit massiver Dysenterie und schwersten Komplikationen kommen vor. Die Inkubationszeit der Erkrankung beträgt gewöhnlich zwei bis fünf Tage. Dann zeigen sich die typischen Symptome der Ruhr: blutige, schleimig-eitrige Diarrhoe, Fieber, Tenesmen und Leibschmerzen. Begleitend treten allgemeine Krankheitszeichen wie Müdigkeit, Inappetenz und Gliederschmerzen auf. I. d. R. verläuft die Shigellose nach ca. 14 Tagen selbstlimitierend. Lokale Komplikation sind das toxische Megakolon und die nekrotisierende Kolitis mit Perforationsgefahr. Systemisch werden das hämolytisch-urämische Syndrom, Sepsis, Exsikkose und Enzephalopathie als komplizierend erwähnt [17-19]. Diese sind insgesamt selten und hauptsächlich bei Kindern vorkommend [17]. Als seltene Spätkomplikation einer Shigelleninfektion gilt das Reiter-Syndrom mit Arthritis und Urethritis. Das therapeutische Regime ist differenziert zu betrachten. So sind bei leichten Verläufen Allgemeinmaßnahmen wie Flüssigkeitssubstitution und Diät anzuwenden. Nur bei schwerer Erkrankung, Immunsuppression oder epi- bzw. endemischen Auftreten sollte antibiotisch eingegriffen werden.

1.2.2 Histopathologische Aspekte der Shigellosis

Makroskopisch zeigt eine floride Bakterienruhr das Bild einer geröteten und geschwollenen Kolonschleimhaut mit schmutzig-grauen, herdförmigen Belägen. Vorwiegend sind Sigmoid und Rektum betroffen, aber auch das übrige Kolon und das distale Ileum können betroffen sein [20]. Die Schleimhaut infizierter Bezirke ist allgemein aufgelockert, geprägt von einem entzündlichen Infiltrat und zahlreichen Shigellen, die entweder vakuolisiert oder frei im Zytoplasma befallener Kolonepithelzellen vorkommen. Des Weiteren kommt *Shigella* in den Interzellularspalten, in Makrophagen und in neutrophilen Granulozyten vor [21].

1.2.3 Primäre Invasion

Die Ruhr ist primär durch die Invasion von *Shigella* in Kolonepithelzellen verursacht [22]. Die invasiven Fähigkeiten sind dabei essenziell, so dass nicht-invasive Stämme keine dysenterische Symptomatik auslösen können [23, 24]. Es ist also von herausragender Bedeutung, die Schleimhautbarriere zu überwinden. Dabei wird nicht der von Salmonellen benutzte Mechanismus gewählt, die über einen der Phagozytose ähnlichen Prozess über die apikale Seite eines polarisierten Epithels nach intrazellulär gelangen [25]. Interessanterweise erfolgt die Penetration der Darmschleimhaut über den basolateralen Pol, d. h. der freien Oberfläche abgewandten Seite [26]. Die primäre Eintrittspforte wird dabei durch die im Oberflächenepithel lokalisierten M-Zellen realisiert. Die M-Zellen sind als Teil des MALT

(engl. mucosa-associated-lymphatic-tissue) fähig, an der Kolonschleimhaut auftretende Antigene zu erkennen und aufzunehmen, um diese dann auf der gegenüberliegenden Seite Makrophagen, dendritischen Zellen und B-Lymphozyten zu präsentieren. Die Erkennung dieser zahlenmäßig auf der Darmschleimhaut weit unterlegenen Zellspezies durch entsprechende Mikroben basiert auf der Präsenz spezifischer Oligosaccharidpitope innerhalb der Membran der M-Zellen, die Lektin-ähnlichen bakteriellen Adhäsinen als Rezeptoren dienen [27]. Die Aufnahme der Mikroorganismen erfolgt via Phagozytose. Obwohl innerhalb der Phagosomen in den M-Zellen ein saures Milieu vorherrschen kann, erreichen die meisten Pathogene die basale Zellseite lebendig [28]. Dort sind die Shigellen teilweise frei beweglich in der Submukosa und können die Kolonzellen direkt invadieren. Ein anderer Teil von *Shigella* wird direkt durch residente Makrophagen phagozytiert [29]. Durch bakterielle Sekretion von IpaB wird einerseits die Apoptose der Makrophagen bedingt, wodurch sich *Shigella* der lytischen Verdauung entzieht [30]. Andererseits aktiviert IpaB die Cysteinprotease Caspase1, die dann die katalytische Spaltung der Makrophagenzytokine Pro-IL-1 β und Pro-IL-18 in die biologisch aktiven Formen IL-1 β bzw. IL-18 gewährleistet [31]. IL-18 induziert die Synthese von γ -INF, einem von T-Lymphozyten sezernierten Zytokin, welches essenziell für die effektive Eradikation einer Infektion mit *Shigella* ist [32]. IL-1 β verursacht die Chemotaxis polymorphkerniger Leukozyten, die dann in die Zellzwischenräume transmigrieren. Interessanterweise ist die Transmigration dabei kein indirekt bakterieller Effekt, etwa durch Expression spezifischer Oberflächenantigene oder der vermehrten Synthese von Zytokinen durch entsprechende Wirtszellen. Vielmehr konnte *in vitro* gezeigt werden, dass sie direkt bakteriell durch Ausschüttung von Ipa-Proteinen hervorgerufen wird. Es scheint jedoch die Gesamtheit der sezernierten Ipa-Invasine entscheidend zu sein. So ist nur der invasive Wildtyp M90T, nicht jedoch einzelne *ipa*-Mutanten bzw. der nicht-invasive Stamm BS176, bezüglich der Leukozytentransmigration kompetent [33].

Im Verlauf der fortschreitenden Inflammation wird *Shigella* zwar dezimiert, allerdings kommt es ebenso zur Auflockerung der tight junctions und somit zur Untergrabung der Integrität des Kolonepithels. Der Mechanismus beruht nach Sakaguchi et al. auf der Interaktion von *Shigella* mit den innerhalb der tight junctions vorhandenen Strukturproteinen Occludin, E-Cadherin, Zo 1 und Zo 2 [34].

Ist die Barriere des Darmepithels überwunden und *Shigella* in den Intrazellulärraum gelangt, synthetisieren die Kolonzellen eine Reihe proinflammatorischer Moleküle, unter ihnen IL-8, das polymorphkernige Leukozyten anlockt und die lokale Entzündung weiter fördert [35]. Insofern sind wirtseigene Abwehrmechanismen auch als Trigger der fortschreitenden Invasion durch *Shigella* und den damit verbundenen massiven Schleimhautdestruktionen zu bewerten. Es ist daher auch nicht verwunderlich, dass der experimentelle Einsatz von IL-1 Rezeptorantagonisten und Leukozytenmigration-hemmender CD18-Antikörper die Entzündungsreaktion, die Bakterieninvasion und die Gewebszerstörung erheblich eindämmen [36, 37].

1.2.4 Intrazelluläre Bewegung und laterale Ausbreitung von Shigella

Shigella ist aufgrund ihrer Unbeweglichkeit auf passive intra- und interzelluläre Transportformen angewiesen. Die primäre Invasion wird dabei über einen der Phagozytose ähnelnden Mechanismus realisiert [38]. Mikroskopische Studien an HeLa-Zellen zeigten die Ausbildung von Aktinnukleationszonen nach Kontakt von Shigella mit der Zelloberfläche in unmittelbarer Nähe der Kontaktstelle, welche Ausgangspunkt beidseitig lateral von Shigella aufwachsender, zellulärer Membranprotrusionen sind. Diese werden von langen, parallel angeordneten und dicht gebündelten Aktinfilamenten getragen. Durch Konfluenz der beiden freien Enden wird das Bakterium unter Vakuolenbildung letztlich internalisiert [39]. Ca. 15 min nach der Vesikelinkorporation sind 90% der Vesikel lysiert. Die nun frei im Zytoplasma befindlichen Bakterien vermehren sich rapide. Eine zytotoxische Wirkung infolge der Bakterienvermehrung ist gegensätzlich zu Makrophagen für Enterozyten nicht beschrieben [40, 41]. Clark et al. zeigten, dass durch Inhibition des Effektorproteins Caspase 3 die Apoptose infizierter Darmzellen verhindert wird [42]. Tattoli et al. konnten kürzlich nachweisen, dass eine intraepitheliale Bakteriolyse wiederum eine Apoptose der infizierten Zellen zur Folge hatte. Diese wurde induziert durch die mitochondriale Freisetzung von Cytochrom C und der konsekutiven Aktivierung der Caspasenkaskade [43]. Insofern ist es ein aktiver Eingriff von Shigella, der das intrazelluläre Überleben in infizierten Darmepithelien möglich macht.

Im Intrazellularraum kann Shigella seine Motilität unter Ausnutzung wirtszelleigener Strukturen entfalten. Dabei können zwei Phänotypen unterschieden werden. Eine *icsA*-unabhängige, Organellen-ähnliche Fortbewegung (Olm) entlang intrazellulär vorkommender Stressfasern und eine *icsA*-abhängige, eine auf Nukleation, Polymerisation und polarer Organisation von Aktin zurückführbare Motilität [44, 45].

Das *icsA*-Gen ist auf dem Virulenzplasmid von Shigella lokalisiert und kodiert ein 120 kDa Protein der bakteriellen Außenmembran [44].

Der Olm-Phänotyp ist in den ersten beiden Stunden nach Invasion vorherrschend und zeigt drei Phasen: Invasion im Gebiet des Adhäsionsplaques, kernwärtsgerichtete Bewegung entlang radiärer Stressfasern und kernnahes bakterielles Wachstum in Mikrokolonien [45, 46].

Stressfasern sind vorübergehend gebildete Bündel aus Aktin und Myosin-II, die mit einem Ende in einem sogen. Fokalkontakt bzw. Adhäsionsplaque innerhalb der Plasmamembran inserieren. Das andere Ende der Stressfasern kann in einem weiteren Fokalkontakt oder in ein den Zellkern umgebendes Geflecht von Intermediärfasern inserieren. Ihre Formierung bestimmt u. a. Zellform und Zellbewegung.

Ca. zwei Stunden postinvasiv kann elektronenmikroskopisch die schnellere und ungerichtete *icsA*-abhängige Bewegung der Bakterien innerhalb der HeLa-Zellen beobachtet werden [44].

Das *icsA* (= *virG*)-Genprodukt besitzt drei Domänen, den N-Terminus (52 AS), die α -Domäne (706 AS) und die C-terminale β -Domäne (343 AS). Die α -Domäne wird asymmetrisch verteilt auf der Oberfläche von Shigella präsentiert. Sie ist essenzielle Voraussetzung der membran-nahen F-Aktinakkumulation

intrazellulär befindlicher Shigellen. Die β -Domäne verankert VirG innerhalb der Außenmembran des Bakteriums. VirG induziert die unipolare Aktinpolymerisation und die Ausbildung eines in der Länge variierenden Schweifes an einem Bakterienpol [47, 48]. Aktin-assoziierte Proteine wie Vinculin, Plastin, Filamin, α -Actinin, Vasodilatator Stimuliertes Phosphoprotein (VASP), Ezrin, Cofilin und Neurales-Wiskott Aldrich Syndrom Protein (N-WASP) konnten im Zusammenhang mit der Generierung des Aktinschweifes gezeigt werden.

Hinsichtlich der Kausalität der aktinpolymerisierenden Wirkung von VirG bestehen verschiedene theoretische Ansätze.

Erstens kann VirG seinen Effektor N-WASP durch Bindung innerhalb der α -Domäne aktivieren. Konstitutionell liegt N-WASP in einem inaktiven Zustand vor, der eine Interaktion mit IcsA nicht gestattet. Erst das Protein Toca-1 überführt N-WASP durch Konformationsänderung in einen bindungsfähigen Zustand. Interessanterweise erfolgt die Rekrutierung von Toca-1 durch Effektorproteine des Typ III Sekretionsapparates. Die Rekrutierung von N-WASP hingegen ist von IcsA abhängig [49]. Aktiviertes N-WASP rekrutiert dann Arp2/3. Der entstandene Komplex ist nun in der Lage, lokal Aktinpolymerisation zu induzieren. Daneben ist N-WASP ein *downstream*-Effektor der GTPase Cdc42, wodurch aktiviertes Cdc42 die Aktinpolymerisation verstärken kann [50, 51]. Zweitens kann Vinculin, insbesondere das aus der proteolytischen Spaltung hervorgegangene 90 kDa Fragment, in der α -Domäne von VirG binden. Somit wird wiederum eine Interaktion mit VASP, ebenfalls ein Protein mit aktinpolymerisierender Wirkung, möglich [52].

IcsA- bzw. *virG*-negative Mutanten sind *in vitro* zwar zur Invasion fähig, eine intra- oder interzelluläre Ausbreitung der Mikroben ist jedoch nicht möglich [53, 54].

Einige Shigellen erreichen die Oberfläche infizierter Zellen und dringen in durchschnittlich 2,0 μm , teilweise bis zu 20 μm langen Membranprotrusionen in die Membranen benachbarter Zellen vor. Das distale Ende wird schließlich mit dem Bakterium in Form einer doppelwandigen Vakuole abgeschnürt. Intrazytoplasmatisch findet dann die Lyse des Vesikels statt und *Shigella* gelingt somit die laterale Ausbreitung der Infektion [55]. Interessanterweise scheint initial der *icsA*-bedingte Bewegungstyp mit einer Bakterienteilung einherzugehen. Erst anschließend kommt es zu einer polar orientierten Aktinbündelung. Diese wiederum geht mit einer vermehrten Rekrutierung von Plastin, einem Aktinbündelungsprotein, einher [55].

1.3 Genetische und molekulare Aspekte der Invasion

Shigella ist als Klon innerhalb der *E. coli* Spezies anzusehen (s.1.1). Die außerordentliche Pathogenität gegenüber den vor allem als Kommensalen im menschlichen Gastrointestinaltrakt lebenden Koli-bakterien ergibt sich aus der unterschiedlichen genetischen Information von *Shigella*. Diese verteilt sich auf das Virulenzplasmid und das Bakterienchromosom. Auf dem Chromosom sind Regulatorgene bestimmter Virulenzgene des Plasmids und Strukturgene verschlüsselt. Zu den Strukturgenen gehören unter anderem Lipopolysaccharidgene und Siderophorengene. Bemerkenswert sind die durch Maurelli

et al. als “*black holes*“ umschriebenen, chromosomalen Gendelektionen [56]. Besonders der Verlust der Lysin-Decarboxylase-Aktivität (LDC-Aktivität) zeigt sich für *E. coli* Flexneri als pathogenitätsfördernd. So sind Mutanten mit bestehender LDC-Aktivität zwar weiterhin invasiv. Die Wirksamkeit der Enterotoxine ShET1 und ShET2 von *E. coli* Flexneri 2a ist aber durch einen wahrscheinlich zytoprotektiven Effekt des LDC-Produktes Cadaverin eingeschränkt [56].

Weitaus wichtiger bezüglich der Pathogenität von Shigella ist das insgesamt 220 kb umfassende 140 MDa Virulenzplasmid [57]. Stämme, die das Plasmid nicht besitzen, sind nicht zur Invasion befähigt und somit apathogen [58, 59]. Retransfer des Plasmids auf *E. coli* Flexneri konnte die Pathogenität dagegen reaktivieren [58]. Wird auf den nicht-invasiven Stamm 395.1 von *E. coli* K12 das Virulenzplasmid übertragen, ist dieser zwar im HeLa-Zellmodell invasiv, jedoch fällt der Sereny Test negativ aus, und auch die histopathologische Begutachtung infizierter Hasendarmschlingen zeigt nur eine schwache, aber definitive Reaktion. Um volle Pathogenität, d. h. positiver Sereny Test und fluide Sekretion im Hasendarmmodell, zu erreichen, ist eine gleichzeitige Übertragung chromosomaler DNA-Abschnitte von Shigella, speziell der *his*-Region und der Loci *kcp* und *mtl*, erforderlich [60]. Daraus wird erneut deutlich, dass sowohl chromosomale als auch Plasmid-kodierte Struktureinheiten im Rahmen der Shigellenruhr aktiviert werden müssen.

Die bedeutenden Gene des invasiven Phänotyps von Shigella sind in einem 31 kb umfassenden Abschnitt innerhalb des Plasmids eingebettet [57]. Diese Region verschlüsselt die Gene des Mxi-Spa Typ III-Sekretionsapparates, die Ipa-Invasine, die Chaperone IpgC und IpgE, IpgD, VirA und weitere Proteine unbekannter Funktion. IpgC verhindert die Degradation von IpaB und IpaC im bakteriellen Zytoplasma. Dadurch kann das Bakterium einen zytoplasmatischen Pool notwendiger Ipa-Invasine aufrechterhalten und entsprechend große Mengen ausschütten. Im extrazellulären Medium fehlt die Chaperonwirkung, so dass IpaB und IpaC und evtl. zusätzlich IpaA einen Proteinkomplex formen [61, 62]. IpgE ist Chaperon von IpgD, einem bakteriellem Virulenzfaktor mit Phosphatasefunktion, der zytoplasmatisch gespeichert wird. Das Substrat 4,5-PtdInsP₂ wird in 5-PtdInsP gespalten und verursacht unabhängig von den Ipa-Invasinen Aktin-Remodelling und Membranfaltung der Zielzelle [63, 64]. *VirA*, ein für ein 46 kDa Protein kodierender Abschnitt des Virulenzplasmids, wird unmittelbar nach der primären Invasion von Shigella vermehrt transkribiert. Der Effekt *virA*-negativer Mutanten wird unterschiedlich bewertet. Nach Uchiya et al. waren sowohl die primäre Invasion, als auch die laterale Ausbreitung der Infektion in MK2-Epithelzellen betroffen [65]. Demers et al. dagegen konnten dagegen keinen Effekt einer *virA*-Mutation hinsichtlich der initialen Invasion beobachten [66].

Beide Autoren konnten allerdings eine Beziehung zwischen *virA*-Mutation und *icsA*-Expression nachweisen, die als Ursache der verminderten Lateralausbreitung nach erfolgter Primärinfektion zu diskutieren wäre [65, 66].

Der *mxi-spa*-Locus verschlüsselt einen Typ III-Sekretionsapparat, der für die Sezernierung der Ipa-Proteine binnen weniger Minuten direkt nach Kontakt von Shigella mit der Oberfläche der Zielzelle verantwortlich gemacht wird [67].

Morphologisch kann ein innerhalb der Bakterienmembran eingebetteter Basalkörper von etwa 300x20 nm Ausdehnung und eine hiervon ausgehende nadelförmige, ca. 45x8,4 nm Membranprotrusion (*needle like structure*) unterschieden werden. Auf molekularer Ebene konnten Proteine unterschiedlicher molarer Massen MxiD (63 kDa), MxiG (43 kDa), MxiJ (27 kDa) und MxiH (9 kDa) identifiziert werden [68]. MxiD ist in der äußeren Membran lokalisiert, bildet dort ringförmige Strukturen und zählt zur Familie der Sekretine. MxiG und MxiJ sind integrale Membranproteine der inneren Membran. Inaktivierung des *mxiD*- und *mxiG*-Gens gingen mit Verlust der invasiven Fähigkeiten von *Shigella* einher [69, 70]. Bisher nicht näher charakterisierte Interaktionen scheinen notwendig für die Formierung eines funktionierenden Sekretionsapparates. MxiH konnte hauptsächlich in der *needle like structure* lokalisiert werden. MxiH scheint essenziell für die Bildung eines funktionierenden Sekretionsapparates. Entsprechende Nullmutanten waren nicht invasiv und sezernierten keine Effektorproteine. Des Weiteren fehlte die *needle like structure*. Dagegen führte die Überexpression von MxiH zur Bildung außergewöhnlich langer Protrusionen bis max. 1000 nm und einer verdoppelten Invasionsrate [68]. Tamano et al. interpretierten das als Möglichkeit, den Kontakt von Bakterium und Zielzelle auch über größere Distanzen als die durchschnittliche Länge der Protrusionen von 45 nm zu gewährleisten [68]. Insbesondere unter Berücksichtigung des Umstandes, dass eine Interaktion des Typ III-Sekretions und der Membran der Zielzelle nach Blocker et al. bis max. 100 nm möglich ist, scheint MxiH-Überexpression eine Option zur Steigerung des Invasionspotenzials von *Shigella* [71]. MxiM, ein ebenso auf dem *mxi-spa*-Operon hinterlegtes Lipoprotein der äußeren Membran mit Chaperon-ähnlicher Funktion beeinflusst Stabilität, Membranassoziation und Multimerisation von MxiD. Nach Schuch et al. ist seine Funktion unabdingbare Voraussetzung für die Ipa-Sekretion und die Invasivität von *Shigella* [72, 73]. Ebenfalls wichtig in diesem Zusammenhang sind die gleichermaßen vom *mxi-spa*-Operon kodierten Eiweiße Spa32, 33 und 47 [71, 74, 75]. Die ATPasen Spa47 und Spa32 sind involviert in die Formierung und Funktion der *needle like structure*. Depletion des *spa47*- oder des *spa32*-Gens führten zu einem bezüglich der Sezernierung von Effektorproteinen defekten Typ III-Sekretion [68, 75]. Spa32 kontrolliert daneben Länge der Membranausstülpungen. So streute die Länge der Protrusionen bei *spa32*-negativen Mutanten zwischen 40 und 1150 nm [75]. Spa33 reguliert den Transfer der Ipa-Proteine vom Innenblatt zum Außenblatt der Bakterienmembran. Es ist essenzieller Bestandteil des C-Rings, einem nur bei *Shigella* vorkommenden Bestandteil des Sekretionsapparates [76, 77]. *Spa33*-Negativität drückte sich durch fehlende Invasivität infolge mangelnder Ipa-Sekretion aus [74]. Interessanterweise kam es durch alleinige Überexpression von Spa33 oder Spa32 zur Blockade der Ipa-Sekretion bzw. der Invasionsfähigkeit. Parallele Überexpression von Spa32 und Spa33 führte dagegen zu dem Wildtyp entsprechenden Invasionsraten. Schuch et al. nahmen diesbezüglich folgende Interaktion an: Spa33 reguliert den transmembranösen Verkehr, Spa32 induziert die Freisetzung der Ipa-Proteine [74].

Die Aktivierung des Sekretionsapparates erfolgt durch den Kontakt von Bakterium und Außenmembran der jeweiligen Zelle und ist abhängig von der Wachstumsphase. Die Ausschüttung der Ipa-Invasine ist am größten in der frühen exponentiellen Phase zum Zeitpunkt der Zellteilung [78, 79].

Sie scheint im Vergleich zur apikalen Zelloberfläche effizienter zu sein, wenn der Kontakt mit der basolateralen Oberfläche polar organisierter Caco2-Zellen stattfindet. Dies kann damit zusammenhängen, dass die dort im Übermaß vorkommenden Proteine Fibronectin, Laminin und Kollagen IV die Sekretion von Ipa-Invasinen triggern [80].

Der Hyaluronrezeptor CD44 ist befähigt mit seiner extrazellulären Domäne IpaB zu binden. Als Folge der Interaktion kommt es zur Rekrutierung des Rezeptors im Bereich der Eintrittsstelle von Shigella und in den zellulären Membranprotrusionen. Die Inhibition dieser Bindung mit CD44 Antikörper konnte die Invasion von Shigella und die Aktinpolymerisation signifikant eindämmen. Im Gegensatz dazu führte Transfektion der DNA des Rezeptors in CD44-negative Zellen zur Internalisation von Shigella [81].

Watarai et al. konnten eine proportionale Abhängigkeit zwischen Invasionsrate von *E. coli* Flexneri und Anzahl exprimierter $\alpha 5\beta 1$ -Integrine auf der Oberfläche von CHO-Zellen zeigen, so dass auch hier eine Interaktion angenommen werden muss [82].

Die im bakteriellen Zytoplasma gespeicherten Ipa-Invasine einschließlich der Chaperone werden nach Kontaktaktivierung durch etwaige Zielzellen oder durch den Farbstoff Kongorot freigesetzt [67]. Unterschieden werden IpaA, IpaB, IpaC und IpaD mit Molekulargewichten von 38 kDa (IpaD) bis 70 kDa (IpaA). Des Weiteren ist IpaH beschrieben [83]. Die genaue Charakterisierung der Ipa-Invasine ergab, dass außer IpaA und IpaH alle absolut erforderlich für die Zellinvasion von Shigella sind [83-85].

Die Sekretion von IpaH geschieht über das Typ III-Sekretion etwa 2 h nach bakteriellem Eintritt. Nach dem Transport entlang tubulärer Strukturen wird IpaH perinukleär akkumuliert und schließlich nach intranukleär transloziert und bindet an den Spleißingfaktor U2AF. Durch Beeinflussung der Genexpression wird die antiinflammatorische Antwort der Wirtszelle so moduliert, dass letztlich eine vermehrte Invasion stattfindet [83, 86].

IpaA erhöht die Invasionsrate von Shigella durch Bindung an Vinculin zehnfach. Die Bindung erfolgt nach ähnlichem Muster wie das der nativen Bindungspartner Talin und α -Actinin. Hamiaux et al. bezeichneten die Interaktion daher als strukturelles Mimikry [87, 88].

Ein geringer Teil der IpaB-Proteine ist gemeinsam mit IpaD in der bakteriellen Außenmembran gespeichert. Eine regulierende Funktion im Kontext der Sekretion wird für beide Invasine vermutet [89]. IpaB und IpaC sind mit dem stabilisierenden Chaperon IpgC als Komplex zytoplasmatisch gespeichert [62]. IpaB und IpaC bilden nach ihrer Sekretion mittels ihrer hydrophoben Molekülanteile einen Komplex mit der Zielmembran. Dieser enthält eine ca. 25 Å große Pore, über die weitere Effektorproteine in die Zielzelle eingeschleust werden [71]. IpaD-Proteine sind involviert in die Regulation der Sekretion von IpaB und IpaC und die optimale Insertion des IpaB-IpaC-Komplexes in die Zellmembran. Sie werden zusammen mit IpaB und IpaC unmittelbar nach Aktivierung des Typ III-Sekretionsapparates ausgeschüttet und sind an der Spitze der *needle like structure* lokalisiert [90, 91].

Auf die Funktion der Ipa-Proteine, im Besonderen von IpaB, während der Apoptose von Makrophagen wurde bereits hingewiesen (s.1.2.3).

1.4 Die Rolle der kleinen GTPasen der Rho-Familie

Die Rho-GTPasen gehören zur Superfamilie der Ras-GTPasen. Unterschieden werden sieben Proteine: RhoA-C, Rac1 und 2, Cdc42 (Hs und G25K), RhoD, RhoG, RhoE und TC10. Beschrieben ist ein GTP-gebundener aktiver und ein GDP-gebundener inaktiver Zustand. Der aktive Zustand wird mittels Austausch von GDP und GTP über GEF-Proteine (Guanin-Nucleotid-Exchange-Factors) realisiert. Der inaktive Zustand wird durch Aktivierung der intrinsischen GTPase mittels GAP-Proteine (GTPase-activating-Proteins) erreicht. GDI-Proteine (Guanin-Nucleotid-Dissociation-Inhibitor) stabilisieren den inaktiven Zustand [92]. Rho ist in die Formierung von Stressfasern und deren Kontraktion sowie in die Ausbildung von Fokaladhäsionskontakten involviert. Rac vermittelt die de novo Aktinpolymerisation zur Bildung von Lamellipodien in der Zellperipherie. Cdc42 triggert die de novo Aktinpolymerisation zur Bildung von Filopodien [92].

Aus dem Geschilderten wird deutlich, dass Rho-GTPasen eine entscheidende Bedeutung im Rahmen der Umformierung bzw. Neuformation des Aktinzytoskeletts einnehmen, so dass eine funktionelle Bedeutung im Zusammenhang mit dem Fortschreiten der Zellinvasion durch *Shigella* nahe liegt. Unmittelbar nach Kontakt von *Shigella* mit der Zelloberfläche können unterhalb der Kontaktstelle Aktinpolymerisationszonen und später von diesen ausgehende Membranprotrusionen, die letztlich fusionieren und das Bakterium einschließen, beobachtet werden [39]. Im Bereich der Kontaktstellen werden die Isoformen RhoA-C rekrutiert. Wobei RhoA um das Bakterium, RhoC und RhoB im Bereich der Membranprotrusion akkumuliert werden [93, 94]. Interessanterweise ist lediglich die Aktinelongation, nicht aber die Aktinnukleation von Rho abhängig [94].

Mounier et al. zeigten, dass die GTPasen Rac und Cdc42 im Bereich der Eintrittsstelle von *Shigella* rekrutiert werden. Gleichzeitig zeigten Zellen mit inaktivem Cdc42 und Rac eine deutlich verminderte Internalisation von *Shigella*. Es kann also angenommen werden, dass die Aktinnukleation am Beginn der Invasion durch Cdc42 und Rac vermittelt wird. Die intrazelluläre, durch *icsA* vermittelte Motilität der Bakterien war gänzlich unabhängig von den Rho-GTPasen [93].

Ipg1 und *Ipg2* sind bakterielle Effektorproteine mit funktioneller Verwandtschaft zu den Ras-GTPasen, die über das Typ III-Sekretionssystem aktiv von *Shigella* sezerniert werden. *Ipg2* ist funktionell dem RhoA ähnlich, wogegen *Ipg1* eher Rac und Cdc42 ähnelt. Es besteht aber keine strukturelle Verwandtschaft, so dass keine Abhängigkeit von Guanininnucleotiden vorhanden ist. Mutanten mit einem simultanen Defekt für beide Gene *ipg1* und *ipg2* zeigten eine um 70 % verminderte Invasion von polarisiert organisierten Caco2-Zellen. Separate Gendefekte waren aber deutlich weniger wirksam [95, 96].

1.5 Phospholipidstoffwechsel

1.5.1 Phospholipide sind involviert in signaltransduktive Prozesse

PL machen den größten Anteil der Membranlipide aus und sind somit wesentlich an der Strukturhaltung der Zellen beteiligt [97]. Anteilsmäßig der geringere Teil übernimmt wichtige Funktionen für die Transduktion extrazellulärer Signale in intrazelluläre Aktivitäten. Wesentlich sind die Phosphatidylinositolphosphate, vor allem PtdInsP_2 , dessen meist hormonaktivierte Spaltung durch die Phospholipase C (PLC) Inositol-(1,4,5)-Triphosphat (IP_3) und Diacylglycerin (DAG) ergibt. IP_3 ist fähig, Ca^{2+} aus dem endoplasmatischen Retikulum zu mobilisieren. Es aktiviert und hemmt diverse intrazelluläre Enzyme, Ionenkanäle und andere Transportproteine. Die Wirkung des Ca^{2+} wird zum Teil über Bindung an Calmodulin entfaltet. Der resultierende Calcium-Calmodulin-Komplex aktiviert sogen. Calmodulin-abhängige Kinasen. DAG ist ein Aktivator der Proteinkinase C (PKC) [98]. DAG kann des Weiteren durch die nacheinander geschalteten Aktionen der Phospholipase D (PLD) und Phosphatidylphosphohydrolase (PPH) synthetisiert werden. Hierbei wird jedoch kein Ca^{2+} liberiert.

1.5.2 Phospholipasen

Phospholipasen sind Phosphoglycerid-spaltende Enzyme. Die Position der Spaltung am Glycerinkörper definiert die jeweilige Familie der Phospholipasen. Drei verschiedene Lipasen lassen sich klassifizieren. Unterschieden werden in Abhängigkeit vom Ort des C-Atoms im Glycerinkörper die Phospholipasen A PLA_1 und PLA_2 , deren Produkte dementsprechend ein verestertes 1- bzw. 2-Akyl-Lysophospholipid (LPL) und eine freie Fettsäure sind. Die Phospholipase C (PLC) spaltet die Seitenkette proximal am C_3 -Atom des Glyceringrundkörpers, so dass DAG und ein Phosphatester entstehen. Die Phospholipase D (PLD) spaltet die Seitenkette distal des mit dem am C_3 -Atom des Glyceringerüsts veresterten Phosphates ab. Dementsprechend werden Phosphatidsäure und eine alkoholische Verbindung generiert.

1.5.2.1 Phospholipase A

Von den beiden Subtypen der PLA ist die PLA_2 wesentlich besser charakterisiert. Die PLA_2 stellt eine Superfamilie dar, die anhand der Nukleotidsequenzen in mindestens zehn Typen untergliedert werden kann [99]. Die sekretorische sPLA_2 (Typ I-III, V, IX, X) mit Molekulargewichten (MG) von 14-18 kDa wird von der Zelle sezerniert, ihre Esteraseaktivität erfordert Ca^{2+} im milimolaren Bereich. Sie ist im Gegensatz zur zytosolischen cPLA_2 nicht selektiv für Arachidonsäure. Isoformen der cPLA_2 (Typ IV_{A+B}) haben ein MG von ca. 85 kDa. Die Translokation zu den PL der Membran ist von Ca^{2+} in mikromolaren Mengen abhängig. Die Ca^{2+} -unabhängige iPLA_2 (Typ $\text{IV}_{C,VI,VII_B,VIII}$) sind im Zytosol und in der Membranfraktion ansässig und haben mit 29 bis 85 kDa ein breites MG-Spektrum [100, 101].

Ein Metabolit der PLA-Spaltung ist Arachidonsäure, eine C₂₀-Karbonsäure mit vier Doppelbindungen. Sie wird vor allem mit der Genese von Entzündungsmediatoren wie Prostaglandine und Leukotriene, mit Membranfusionsprozessen und mit Enzymaktivierung in Zusammenhang gebracht [102]. Das andere Produkt der PLA-Katalyse ist die Lysophosphatidsäure (lyso-PS). Lyso-PS ist ein bedeutender Lipidmediator mit Wachstumsfaktor-ähnlichen Eigenschaften. Mindestens zwei G-Protein gekoppelte Subtypen von lyso-PS-Rezeptoren vermitteln Änderungen der Zellmorphologie. Dabei konnte an Neuroblastzellen von Mäusen gezeigt werden, dass sowohl Aktinpolymerisation als auch Aktindepolymerisation über einen singulären Rezeptor gesteuert werden können. Die Polymerisation ist auf molekularer Ebene durch Aktivierung der Rho-Kaskade, die Depolymerisation von einem intrazellulären Calcium-Shift und α -Actinin-Aktivität, begleitet [103, 104].

In humanen immunkompetenten dendritischen Zellen wechselt die Zellantwort auf lyso-PS während des Reifungsprozesses. Während unreife Zellen mit einem intrazellulären Calciumanstieg, mit Aktinpolymerisation und Chemotaxis auf die Aktivierung des lyso-PS-Rezeptors, einem G-Protein gekoppelten EDG-Rezeptor, antworten, verlieren reife Zellen diese Fähigkeit. Hier modelliert lyso-PS stattdessen die Immunreaktion. Ursächlich ist die Synthese verschiedener m-RNAs mit daraus folgendem Rezeptorwandel [105].

Kou et al. wiesen die vom EDG-Rezeptor unabhängige Aktivierung der endothelialen Stickoxidsynthetase eNOS durch Phosphorylierung durch die Serin-Threonin-Kinase Akt mittels lyso-PS in Endothelzellen nach. Die eNOS Aktivierung ist hierbei abhängig von Pertussistoxin sensitiver G-Proteine und der PtdIns-(3)-Kinase-Akt-Kaskade [106].

Eine Involvierung der PLA₂ im Rahmen des Noxen-bedingten oder programmierten Zelltodes ist beschrieben. Die genauen Mechanismen sind allerdings nur unvollständig untersucht [107]. Bekannt ist, dass nach Erhöhung der zytosolischen Ca²⁺-Konzentration, beispielsweise durch externe Noxen Calcium-abhängige PLA₂ aktiviert und zur Membran transloziert werden, wo sie PL spalten und dezimieren, was schließlich zur Zerstörung der Membranintegrität beiträgt [108].

Weiterhin bekannt ist, dass PLA₂-Aktivität in Mäusemakrophagen durch Induktion von TNF α und Freisetzung von Cytochrom C aus Mitochondrien zur Aktivierung der Capasenkaskade führt und in die Spaltung von DNA Reparaturproteinen der Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase (PARB) Gruppe mündet [109]. Caspasen sind Cystinproteasen, die Zielproteine am Aspartatrest spalten und wesentlich zum programmiertem Zelltod beitragen.

Aber auch eine protektive Funktion der PLA₂ mittels Entfernung oxidierter Membranlipide wird erwähnt [110].

1.5.2.2 Phospholipase C

Die PLC lässt sich grundsätzlich in eine PtdIns- und eine PtdCho-spezifische PLC untergliedern. Die Syntheseprodukte DAG und PtdIns(1,4,5)P₃ führen einerseits zur Aktivierung der Proteinkinase C, andererseits zur Freisetzung von Calcium aus intrazellulären Speichern.

Wesentlich besser charakterisiert ist die PtdIns-spez. Form. Bekannt sind bisher 13 Isoenzyme mit sechs Unterformen. Zur Aktivierung der PtdIns-PLC ist Calcium erforderlich [111]. Alle PLC enthalten eine katalytisch wirksame X- und Y-Region. Eine Phosphotyrosin bindende SH2-Domäne enthalten die γ -Isoformen der PLC. Eine Phosphoinositid-bindende PH-Region sind bei den β -, γ - und δ - Isoformen bekannt. Die PLC β wird über ein G-Protein Rezeptor reguliert. Zur Aktivierung führen entweder die Bindung der α -Untereinheit bei G_q-G-Proteinen oder die Bindung des β - γ -Dimeres bei G_i-G-Proteinen in der PH-Region. Synergistisch wirkt sich PS auf die Aktivierung aus [112-114].

Die PLC γ_{1-2} werden durch Rezeptortyrosinkinasen phosphoryliert und damit aktiviert [115]. Agonistisch an Rezeptortyrosinkinasen wirken die Wachstumsfaktoren PDGF, EGF, FGF und NGF. Non-Rezeptor Tyrosinkinasen wie Src, Syc und Jak/ Tyc stellen Bindeglieder zwischen verschiedenen PLC-unspezifischen Rezeptoren und der PLC γ dar. Daneben können die vor allem in neuralem Gewebe ansässigen Mikrotubulus-assoziierten Tau-Proteine aktivierend sein. Der Effekt wird durch Arachidonsäure verstärkt [116].

Falasca et al. demonstrierten, dass PtdIns(3,4,5)P₃ nach Stimulation durch Growth Hormon (GH) an die Pleckstrin-Region (PH Region) der PLC γ_1 gebunden wird und so zur Translokation zur Membran und zur Aktivierung der PLC γ_1 in COS-Zellen führte. Gleiches wurde durch Aktivierung der PtdIns(3)-Kinase hervorgerufen. Inhibition der Kinase hingegen unterband diesen Mechanismus. Insofern erscheint ihre Funktion essenziell [117]. Die PH-Region ist ein Proteinmodul von ca. 120 Aminosäuren, welches bei über 100 Proteinen nachgewiesen werden konnte. Da sie keine katalytische Fähigkeit besitzt und ein vermehrtes Vorkommen in Proteinen mit Assoziation zur Membran besteht, ist eine Adapterfunktion für die Membrananbindung der entsprechenden Eiweiße anzunehmen. Im Gegensatz zur γ -Isoform bindet die PLC δ PtdIns(4,5)P₂. Die PLC β ist nicht spezifisch für ein bestimmtes Polyphosphoinositid, wenngleich die PH-Region auch hier eine Membrananbindung vermitteln kann [118].

Die Aktivierung der PLC δ erfolgt über Transglutaminase II, ein atypisches G-Protein mit GTPase- und Transglutaminase-Aktivität [119]. In der Folge kommt es zur Erhöhung des intrazellulären Calciums, das letztlich die Aktivierung der PLC δ bedingt. Interessanterweise erfolgt die PLC δ -Aktivierung nur durch Agonisten des G-Protein gekoppelten Rezeptors. Freisetzung aus intrazytoplasmatischen Calciumspeichern führen zur Deaktivierung [120]. Generell scheint die PLC δ in Gegenwart von Calcium eine erhöhte Aktivität zu entfalten. So zeigte sich in Abwesenheit aktivierender G-Proteine bzw. Proteinkinasen eine 50- bis 100-fache Aktivität der PLC δ , verglichen mit den Isoformen β und γ [121].

Ein funktionell dem Rho-GAP entsprechendes Protein p122 führt in Anwesenheit geringer Mengen Calciums (ca. 0,1 μ M) zur etwa 10-fachen PLC δ Aktivität [122]. Über die Konsequenzen kann nur spe-

kuliert werden. Der Umstand, dass sowohl PLC δ , p122 und mit dem Aktinzytoskelett assoziierte Proteine wie Gelsolin und Vinculin in Kolokalisation vorgefunden werden, lässt eine Involvierung in die Organisation des Aktinzytoskeletts vermuten [123]. Möglicherweise beruht diese auf der Fähigkeit der PLC δ , proteingebundenes PtdIns(4,5)P₂ zu spalten. Für die PLC γ_1 konnte diese Eigenschaft nach EGF-Aktivierung gezeigt werden [124]. Die PLC δ kann in diesem Kontext als Antagonist des Aktinakkumulation vermittelnden RhoA verstanden werden.

Die PLC ϵ besitzt eine Bindungsstelle für das GEF-Protein der Ras-GTPasen im N-Terminus des Moleküls. Zwei Bindungsstellen für Ras-Proteine befinden sich im Bereich des C-Terminus. Stope et al. beschrieben anhand von HEK293-Zellen einen Aktivierungsmechanismus, der nach Stimulation mit EGF sowohl zur Aktivierung der PLC γ_1 als auch der PLC ϵ führte. Die agonistische Stimulation am EGF-Rezeptor führte zum einen zur Phosphorylierung und Aktivierung der PLC γ_1 , zum anderen wurde die Tyrosinkinase c-SRC nach Phosphorylierung aktiviert. Der PLC γ_1 -induzierte Calcium-Anstieg intrazellulär und die Phosphorylierung durch die Kinase c-SRC aktivieren das GEF-Protein Ras-GRP3, das die GTPase Rap2B durch Nukleotidaustausch aktiviert. Aktiviertes Rap2B führt letztlich zur Aktivierung und Translokation der PLC ϵ zur Zellmembran [125].

Zusammenfassend ist die PLC aufgrund vieler Vernetzungen mit verschiedenen Transduktionskaskaden ein wichtiges Schlüsselenzym, das sowohl der *upstream*-Regulation unterliegt als auch *downstream* mittels der Syntheseprodukte DAG und PtdIns(1,4,5)P₃ in zelluläre Prozesse eingreift.

1.5.2.3 Phospholipase D

Die humanen Isoformen der Phospholipase D (hPLD₁, hPLD₂) kommen ubiquitär bei Mammaliern vor.

Die hPLD₁ wird aufgrund einer anderen Aminosäuresequenz am C-Terminus in die zwei Subtypen hPLD_{1a} und hPLD_{1b} untergliedert. Die dabei fehlende Sequenz von 38 AS bei der hPLD_{1b} ist Folge des posttranslationalen Spleißings [126].

Eine hPLD₂-Aktivität findet sich zum Großteil in der Plasmamembran, wogegen die hPLD₁ hauptsächlich in der perinukleären Region innerhalb des endoplasmatischen Retikulums und des Golgi-Apparates lokalisiert ist [127].

Die hPLD_{1a,b} werden aktiviert durch die kleinen GTPasen RhoA, Rac, Cdc42 und Arf sowie die Proteinkinase C (PKC). Arf, Rho und die PKC zeigen Synergieeffekte. Des Weiteren sind PtdIns(4,5)P₂ und PtdIns(1,4,5)P₃ aktivierend [126]. Magnesium ist für die Aktivierung zwingend erforderlich. Calcium ist hingegen nicht notwendig [126].

Von der hPLD₂ sind zwei Spleißing-Varianten beschrieben, die sich aber funktionell nicht unterscheiden [128].

Die beiden hPLD-Varianten zeigen eine basale Aktivität in Gegenwart von PtdIns(4,5)P₂. Die Stimulation der hPLD₂ durch Arf ist allerdings nur zweifach, verglichen mit einer etwa 20-fachen Stimulation der hPLD₁ [129]. Die im Vergleich höhere basale Aktivität der hPLD₂ erklärt sich zum Teil aus dem

Fehlen der für die hPLD₁ typischen sogen. Loop-Sequenz. Diese ist den beiden katalytischen Zentren des Enzyms, die notwendigerweise zur vollen Aktivität entfaltung angenähert werden müssen, zwischengelagert und wirkt so autoinhibitorisch. Wird der hPLD₁ die Loop-Sequenz entfernt, entfaltet sie eine hohe basale Aktivität. Umgekehrt kommt es durch Einfügen dieser Sequenz in hPLD₂ zum Verlust der höheren Basalaktivität [130, 131].

Ähnlich der PLC findet sich auch bei der hPLD eine PH-Region. Diese bindet spezifisch PtdIns(4,5)P₂ und PtdIns(1,4,5)P₃. Es zeigte sich jedoch, dass diese Region für die Esterhydrolyse nicht notwendig ist. Auch scheint ihr Vorkommen nicht die Erklärung für die PtdIns(4,5)P₂-Abhängigkeit der hPLD₁₊₂ zu sein [130, 131]. Sciorra et al. konnten eine zweite PtdIns(4,5)P₂-bindende Region mit einem hohen Anteil basischer Aminosäuren innerhalb des Proteins zwischen den beiden katalytischen Zentren identifizieren. Diese scheint verantwortlich für die PtdInsP₂-Abhängigkeit der hPLD-Aktivität zu sein [132, 133].

Vor allem die hPLD₁ ist durch die PKC aktivierbar [134]. Dabei zeigt sich eine Assoziation beider Proteine am N-Terminus der hPLD₁ [135]. Die Aktivierung des Enzyms ist jedoch auch ohne ATP möglich, so dass sie unabhängig von der Kinasefunktion der PKC zu sein scheint [136]. Andere Untersuchungen konnten allerdings zeigen, dass PKC hPLD₁ in vivo phosphoryliert. Inhibition dieser Interaktion durch Veränderung der phosphatbindenden Region, führten zur Abnahme der durch PKC-aktivierende Phorbolster bedingten hPLD₁-Aktivität [137].

Auch für die als PKC-insensitiv geltende hPLD₂ konnten Siddiqui et al. bei Koexpression beider Proteine eine Phorbolster-induzierte Aktivitätssteigerung der PKC in Sf9-Zellen demonstrieren [138].

Schmidt et al. konnten an HEK293-Zellen zeigen, dass die Rho-Kinase, ein RhoA-phosphorylierendes Enzym in die M3-Acetylcholin-Rezeptor vermittelte PLD-Stimulation eingebunden ist. Einsatz eines Inhibitors bzw. Expression einer katalytisch inaktiven Rho-Kinase blockierte die Agonist-induzierte PLD-Aktivierung. Unabhängig von der Rho-Kinase ist die PLD-Aktivierung über die PKC-Kaskade [139]. In diesem Zusammenhang zu bemerken ist die Involvierung durch Ral-GTPasen in die PKC/PLD-Kaskade. Die Acetylcholin abhängige PLD-Aktivierung wird dagegen durch Rho-GTPasen vermittelt [140].

Die hPLD₂ scheint dagegen weniger durch GTPasen als durch die Interaktion mit der PtdIns(4,5)P-generierenden Kinase reguliert [141].

PLD-Aktivität lässt sich für viele zelluläre Prozesse demonstrieren. Unter anderem wird eine maßgebliche Beteiligung der PLD durch Generierung des *2nd messenger* PS bei Sekretionsprozessen, bei der Mitogenese, bei der Generierung freier Radikale und bei Transportprozessen innerhalb des Golgi-Apparates angenommen. Weiterhin aktiviert PS in vitro unter anderem die PLC γ , die PtdIns(3)-Kinase und die PLA₂ [142].

Bezüglich der Radikalbildung ist eine durch PS-aktivierte Kinase beschrieben, die p47phox, eine Untereinheit der NADPH-Oxidase, mittels Phosphorylierung aktiviert [143].

Eine Beteiligung vor allem Arf-induzierter PLD-Aktivität am Vesikeltransfer im Golgi-Apparat und während der Exozytose konnte gezeigt werden [144, 145].

An der MAPK-Kaskade (**Mitogen Aktivierte Protein Kinase**) ist PLD durch Produktion von PS beteiligt. Am Ende dieser Transduktionskaskade steht die Aktivierung bestimmter Transkriptionsfaktoren, die regulierend auf zellproliferative Prozesse wirken. PS kann in diesem Zusammenhang durch Assoziation mit der Serin/ Threoninkinase Raf-1 deren Rekrutierung zur Membran bewirken. PS bindet dabei nahe dem C-Terminus innerhalb der sogenannten CR3-Domäne, den für die endogene Kinasetätigkeit verantwortlichen Proteinanteil. Die Blockade dieser Bindung führte zu einer Störung der Translokation von Raf-1 und somit zur gestörten Aktivierung der MAPK-Kaskade in HIRcB-Zellen. Die alleinige Membranassoziation scheint zur Aktivierung von Raf-1 aber nicht ausreichend, sondern wiederum Funktion der GTPase Ras zu sein [146].

Zahlreiche Hinweise auf eine Assoziation der PLD bzw. ihrer Hydrolyseprodukte mit der Organisation des Aktinzytoskeletts sind in der Literatur erwähnt. So wird eine relevante PLD-Aktivität zusammen mit Proteinen des Zytoskeletts in der gleichen Zellfraktion gefunden. Die Proteine α -Actinin und Gelsolin konnten im Zusammenhang erhöhter PLD-Aktivität identifiziert werden. Fodrin gilt hingegen als Inhibitor der PLD [147-149].

Neben der oben schon geschilderten Hydrolyseaktivität katalysiert PLD die Transphosphatidylierung von Phosphatidsäure, eine Reaktion, die sich auch zur Bestimmung der PLD-Aktivität nutzen lässt. Im Beisein eines primäre Alkohols entsteht so eine Phosphatidylalkohol und DAG [150].

1.5.3 Phosphatidylinositol-(4,5)-Bisphosphat beeinflusst das Aktinzytoskelett-Remodelling

Mehrfach finden sich in der Literatur Hinweise auf eine Verbindung zwischen dem Phosphoinositid $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ und dem Zytoskelett. Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass vom $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ ein positiver Effekt auf die Aktinpolymerisation ausgeht. Bekannte Mechanismen sind die Dissoziation vom G-Aktin-bindenden Profilin, die Inhibition der depolymerisierend wirkenden Proteine Cofilin, Villin, Severin und Gelsolin und die Trennung der molekularen Schutzkappen (Cap Proteine) vom (+)-Ende des Aktinmoleküls, wodurch eine erneute Anlagerung von G-Aktin und Molekülverlängerung erreicht wird [151]. Des Weiteren fördert $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ die Quervernetzung von Aktinmolekülen untereinander durch Aktivitätssteigerung von α -Actinin, Talin und Vinculin [151]. Auf die Adapterproteingruppe ERM, die Bindungsstellen einerseits für die Membranmoleküle CD43, CD44 und ICAM-2 und andererseits für F-Aktin besitzen, scheint $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ einen aktivierenden Einfluss auszuüben [152-154].

Zusätzlich ist auch ein aktivierender Einfluss auf das N-WASP bekannt. Über eine Aktivierung des Arp2/3-Komplexes kommt es schließlich zur Aktinnukleation. Sowohl Cdc42 als auch $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ werden im Protein gebunden. Damit einhergehend ist eine Konformationswandel des N-WASP, der zur Aktivierung von N-WASP führt. $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ kann direkt aktivierend wirken. Es wird aber auch ein indirekter Effekt über eine Aktivierung von Cdc42 vermutet [155].

1.5.4 Schnittstellen zwischen der bakteriellen Invasion und dem Phospholipidstoffwechsel

Über die Stoffwechselwege der Phospholipide im Zusammenhang mit der Infektion eukaryoter Zellen durch Shigellen ist wenig bekannt. Unter anderem bekannt ist die Rolle der PtdIns(4)-Phosphatase IpgD, die zusammen mit anderen Effektorproteinen über den bereits oben beschriebenen Typ III-Sekretionsapparat sezerniert wird [64]. Das durch die Phosphatase IpgD generierte PtdIns(5)P wird in der unmittelbaren Umgebung des Eintrittsfokus von *Shigella* und interessanterweise zusammen mit der aktivierten Serin-Threonin-Kinase Akt, die der Proteinkinase B entspricht, akkumuliert [156]. PtdIns(5)P aktiviert die PtdIns(3)-Kinase, deren Produkt PtdIns(3)P zur Aktivierung von Akt führt [156, 157]. Akt ist ein Phosphoprotein, das zunächst nach Bindung entsprechender 3-Phosphoinositid-Derivate aus dem zytosolischen Kompartiment zur Plasmamembran transloziert wird. Als Folge der Phosphoinositidbindung innerhalb der PH-Region des Proteins kommt es zum Konformationswandel, wodurch zwei Phosphatbindungsplätze an die freie Oberfläche des Moleküls gelangen. Erst nach Phosphorylierung dieser Threonin 308- und Serin 473-Reste durch entsprechende Kinasen erreicht Akt seine Kinaseaktivität [157]. Wichtige Regulatorfunktionen übernimmt Akt im Zusammenhang mit dem zellulären Überleben bzw. der Apoptose, wobei eine Aktivierung von Akt *downstream*-Phosphorylierungen entsprechender Effektorproteine zur Folge hat, wodurch in der Konsequenz ein Überleben der Zelle respektive eine Vermeidung von Apoptose gesichert wird. Zum einen ist das durch Phosphorylierung und somit Inaktivierung der Caspase 9 möglich. Zum anderen wird die Expression von in die Apoptose involvierten Genen mittels Akt-Aktivität reguliert. Durch Phosphorylierung der zur Forkhead-Familie gehörigen Transkriptionsfaktoren werden diese inaktiviert und nicht in den Nukleus transportiert, was eine Apoptose verhindert. Durch Phosphorylierung von *upstream*-Kinasen via Akt wird der Transkriptionsfaktor NF- κ B aktiviert und dadurch Gene, die das zelluläre Überleben sichern, im Nukleus angeschaltet [157].

Zusammenfassend kann hieraus geschlussfolgert werden, dass IpgD ein wichtiger Garant der intrazellulären bakteriellen Replikation durch Induktion der PtdIns(3)- Kinase/ Akt-Kaskade ist.

Eine Involvierung der Phospholipasen C und D während der bakteriellen Infektion ist unter anderem für *Listeria monocytogenes* beschrieben [158]. Goldfine et al. infizierten Mäusemakrophagen mit *Listeria* und beobachteten eine Aktivierung der wirtszelleigenen PtdIns-spezifischen PLC und der PLD. Die PLC-Aktivierung der Wirtszelle war abhängig vom Antigen Listeriolysin O (LLO) und der bakteriellen PLC. Die PLD-Aktivierung erforderte LLO und eine Aktivierung der PKC δ . Die PLD-Aktivierung war hierbei durch den PKC δ -Inhibitor Rottlerin hemmbar, so dass die PLD als *downstream*-Effektor der PKC im Rahmen der Infektion durch *Listeria* anzunehmen ist [158].

Mumy et al. konnten zeigen, dass nach Infektion von Darmepithel durch *E. coli* Flexneri vermehrt Hepoxilin A durch die Wirtszellen sezerniert wird. Hepoxilin A entsteht in einer Mehrschrittsynthese aus Arachidonsäure und ist ein Chemokin, das eine vermehrte Leukozytenmigration zur Folge hat. Ein Schlüsselenzym hierbei ist die 12/ 15-Lipoxygenase. Zusätzlich konnte eine Induktion der PLA₂ gezeigt werden [159]. Hieraus ist zu schließen, dass die Infektion mit *Shigella* zunächst eine Induktion der PLA₂ mit konsekutiver Freisetzung von Arachidonsäure bedingt und im Verlauf durch Aktivierung

der 12/ 15-Lipoxygenase Hepoxilin A entsteht. Hepoxilin A könnte daher eine Triggerfunktion während der transepithelialen Migration der Leukozyten bei der primären Invasion von *Shigella* besitzen.

Im Zusammenhang mit der zellulären Abwehr konnten He et al. eine verstärkte Aktivität der PtdIns-spez. wirtszelleigenen PLC nach Lipopolysaccharid (LPS)-Stimulus von *Salmonella* in aviären Makrophagen mit konsekutiv verstärkter NO-Synthese beobachten [160]. Eine Involvierung der PtdCho-spez. PLC und der PLD konnte mittels selektiver Inhibitoren ausgeschlossen werden [160]. Zhang et al. konnten mit Inhibitorexperimenten wiederum zeigen, dass die Immunantwort in LPS-stimulierten Mäusemakrophagen durch PtdCho-spez. PLC und PtdCho-spez. PLD vermittelt wird [161]. Die Phagozytose von *Mycobacterium tuberculosis* in humane Monocyten scheint direkt abhängig von der PLD-Aktivität und ist signifikant reduziert unter Einsatz von 2,3-Diphosphoglycerinsäure, einem kompetitiven PLD-Hemmer [162].

Die im Labor T. Adam gewonnenen Erkenntnisse mit dem PLC-Inhibitor D609 und dem PPH-Inhibitor Propranolol weisen auf eine Involvierung der PLD und der PPH in den Invasionsprozess von *Shigella* hin. Wurden HeLa-Zellen vor einer geplanten Infektion mit *Shigella* mit D609 inkubiert, zeigte sich die Invasionseffizienz erhöht. Präinkubation mit Propranolol dagegen bewirkte eine verminderte Invasionsrate bzw. geringere zytoskelettale Rearrangements (T. Adam, E. Far, unveröffentlichte Daten). Insofern scheint DAG, das gemeinsame Produkt der PLC- und der kombinierten PLD/PPH-Reaktion einen invasionssteigernden Effekt von *Shigella* zu haben. Die DAG-Synthese über die PLC-Katalyse scheint jedoch ohne Bedeutung für die Quantität einer Invasion zu sein. Die Funktion des DAG während der Infektion durch *Shigella* ist bisher allerdings unklar. Bekannt hingegen ist, dass *Chlamydia trachomatis* DAG in der als Überlebensraum dienenden Vakuole akkumuliert [163]. Hierdurch kommt es zur Rekrutierung der proapoptotisch wirkenden PKC δ . Insofern fehlt die durch die PKC vermittelte Cytochrom C freisetzende Wirkung an den Mitochondrien und auch die hemmende Wirkung auf DNA Reparaturenzyme. Letztlich wird hierdurch das Überleben der Wirtszelle damit die Vermehrung von *Chlamydia* gesichert [163]. Ob sich hieraus auch eine Überlebensstrategie für *Shigella* ergeben könnte, ist noch unklar.

1.6 Fragestellung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, einen Versuchsaufbau zu etablieren, der es ermöglicht, eine invasionsabhängige Konzentrationsveränderung von Diacylglycerol in HeLa-Zellen nach Infektion mit *E. coli* Flexneri, nachzuweisen. Dabei war insbesondere von Interesse, ob es mit dem zeitlichen Fortschreiten einer Infektion durch *E. coli* Flexneri zu einer vermehrten DAG-Produktion kommt.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Biologisches Material

2.1.1.1 Zelluläre Komponenten

Als zelluläre Grundlage werden für alle Versuche, die auf Grund der Fragestellung eine Zellkultur verlangten, HeLa-Zellen verwendet. Diese nach ihrer Spenderin Henrietta Lack benannten Tumorzellen wurden 1951 aus einer Gebärmuttergeschwulst isoliert und gezüchtet [164]. Das Patent obliegt der American-Type-Culture-Collection in Rockville.

2.1.1.2 Bakterielle Komponenten

Untersucht werden prokaryotische Mikroorganismen aus der Familie Enterobacteriaceae der Gattung Shigella. Dabei interessiert insbesondere *E. coli* Flexneri Serotyp 5. Verwendet werden folgende Stämme:

- SC301 mit dem 140 MDa Plasmid pWR 100 und dem Plasmid pIL 22
- SC300 mit dem Plasmid pIL 22

Das 140 MDa Plasmid pWR 100 ist verantwortlich für die invasiven Eigenschaften von SC301 und kodiert zusätzlich durch Einfügung des Transposons Tn5 für die Kanamycinresistenz dieses Stammes [58]. Das beiden Stämmen gemeinsame Plasmid pIL 22 kodiert neben der Ampicillinresistenz für das afimbrische Adhäsin AFA 1 von *E. coli*. Mit Hilfe von AFA 1 können SC300 und SC301 an epithelialen Zelloberflächen adhären [165].

2.1.2 Geräte

Die folgenden Geräte wurden für die Erfüllung der Aufgabenstellung verwendet.

- Abzug bei Umgang mit gefährlichen Substanzen
Typ 2-418 Köttermann
- Autoklav Heraeus
- Bakterieninkubator *Inkubator 1000* Heidolph
- Bakterienerschüttler *Unimax-Schüttler 1010* Heidolph

- Begasungsbrutschrank *Typ BB 16* Heraeus
- Bunsenbrenner *Fireboy plus* Integra
Bioscience AG
- DC-Kammer (geeignet für 20x20 DC Platten) Desaga
- Eindampfungsanlage (bestehend aus N₂-Hochdruckflasche,
Schläuchen, Ventilen, Pasteur Glaspipetten) Eigenbau
- Fotoentwicklungsmaschine für Röntgenfilme
Hyperprocessor Amersham
- Kühlschränke: +4 °C Liebherr
-20 °C Liebherr
-80 °C Heraeus
- Magnetrührer mit beheizbarer Platte *MR 3001* Heidolph
- Mikroskope: *Telaval 131* Zeiss
Axiovert 135 Zeiss
- pH-Meter *pHITM* Beckmann
- Photometer: *Spectronic 20 D⁺* Spectronic
Ultrospec III Pharmacia
- Sterilbank *Antair BSK 4 MP* Heraeus
- Vortexgerät *Reax 2000* Heidolph
- Waagen : *A 120 S* Sartorius
LC 6210 Sartorius
- Wärmeblock *DB 2A* Techne
- Wasserbäder: *10L-M-BB* Bioblock Scientific
ET 232320 Dinkelberg Labor-
technik
- Zentrifugen : *Labofuge 400 R* Heraeus
eppendorf centrifuge 5402 Eppendorf
Hettich Zentrifuge Hettich

2.1.3 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien sind nachfolgend in alphabetischer Reihenfolge genannt.

- Aceton pro analysi Merck (Darmstadt)
- Ampicillin Fluka (Neu-Ulm)
- Adenosintriphosphat (ATP); 250,0 mM Sigma (Deisenhofen)
- Bodipy-phalloidine Molecular probes Fluka (Neu-Ulm)
- Cardiolipin from bovine heart (Kat.Nr. C5646) Sigma (Deisenhofen)
- Chloroform pro analysi Merck (Darmstadt)
- Diethylentriaminpentaessigsäure
DETAPAC (Kat.Nr.D6518) Sigma (Deisenhofen)
- 1,2-Dioleoyl-sn-Glycerol (Kat.Nr. B21876) Sigma (Deisenhofen)
- Dithiothreitol (DTT) Sigma (Deisenhofen)
- Ethylendiamintetraacetat (EDTA) Merck (Darmstadt)
- Ethylen-Glycol-Tetraacetat (EGTA) Sigma (Deisenhofen)
- Essigsäure pro analysi Merck (Darmstadt)
- Glycin pro analysi Roth (Karlsruhe)
- Glycerin; wasserfrei Merck (Darmstadt)
- Imidazol Sigma (Deisenhofen)
- Kanamycin Fluka (Neu-Ulm)
- Magnesiumdichlorid ($MgCl_2$) Merck (Darmstadt)
- Methanol pro analysi J.T. Baker (Holland)
- Mopso (Morpholino-2-hydroxy-propansulfonsäure) Fluka (Neu-Ulm)
- Mowiol 4-88 Sigma (Deisenhofen)
- Natriumchlorid pro analysi Merck (Darmstadt)
- n-Octyl- β -D-Glucopyranosid
ULTROL® Grade (Kat.Nr. B20129)
→ syn. n-Octylglucosid Calbiochem ®
- Natriumhydroxid (NaOH) Merck (Darmstadt)
- ^{32}P - γ - Adenosintriphosphat
(spez. Aktivität= 6.000 Ci/ mmol; 270 μ Ci; 25,0 μ l) Hartmann Analytic
(Braunschweig)
- Paraformaldehyd (PFA) Fluka (Neu-Ulm)
- Röntgenfilmentwickler Fuji (Düsseldorf)
- Röntgenfilmfixierer Fuji (Düsseldorf)

- Salzsäure 25 % (HCl) Merck (Darmstadt)
- Serva Blue R 100 mg Coomassie®
- Sodiumdodecylsulfat (SDS) Bio-Rad (München)
- Triton-X-100 Sigma (Deisenhofen)

2.1.4 Enzyme

- Trypsin 2,5 % Gibco BRL (Eggenstein)
- sn-1,2-Diacylglycerol-Kinase,
E. coli recombinant Calbiochem®

2.1.5 Nährmedien

- Minimal Essential Medium (MEM)
with EARLES Salts, with L-Glutamine Gibco BRL (Eggenstein)
- Fetal Calf Serum (FCS) Biochrom KG (Berlin)
- Tryptic Soy Broth (TSB) Fluka (Neu-Ulm)
- Luria-Bertani-Medium (LB) Fluka (Neu-Ulm)

2.1.6 Bestandteile verwendeter Reagenzien

Nachfolgend sind die Zusammensetzung und die Herstellung der erforderlichen Versuchsreagenzien beschrieben.

2.1.6.1 Antibiotika

Die in fester Form vorliegenden Antibiotika Ampicillin und Kanamycin werden zu Vorratslösungen verarbeitet. Dazu werden 1000 mg Ampicillin bzw. 100 mg Kanamycin in 5,0 ml A. bidest aufgenommen und anschließend ad 10,0 ml antibiotische Lösung mit A. bidest verdünnt. Abschließend wird steril filtriert. Die entstandenen Lösungen enthalten dadurch 100,0 µg Ampicillin bzw. 10,0 µg Kanamycin pro µl Vorratslösung. Die Lagerung der Vorratslösungen erfolgt bei +4 °C.

2.1.6.2 Medien

2.1.6.2.1 Flüssigmedien

- Nährmedium für HeLa-Zellen:

Zur Kultivierung der HeLa-Zellen wird für diese Versuchsreihe ein Nährmedium bestehend aus MEM und FCS gewählt. Der FCS-Anteil liegt im Regelfall bei 10 % bzw. 0,5 % unter "serum-starved" Bedingungen.

- Nährmedium für SC300:

30 g Tryptic Soy Broth (TSB) Trockenpulver werden in 1,0 l A. bidest gelöst und bei 121 ° C für 15 min autoklaviert. Die Lagerung erfolgt bei Rt. Vor jeder Inokulation mit SC300 wird dem TSB-Medium Ampicillinlösung hinzugegeben, so dass Ampicillin in einer Konzentration von 100 µg/ ml TSB-Medium vorliegt.

- Nährmedium für SC301:

Die Herstellung erfolgt analog dem SC300 Medium. Zusätzlich wird Kanamycinvorratslösung beige-mengt. Pro ml Nährmedium liegen 50 µg Kanamycin vor.

2.1.6.2.2 Feste Medien

- LB-Agarplatten für SC300:

30 g Luria-Bertani-Trockenmedium (LB), bestehend aus Trypton, Hefeextrakt und NaCl, sowie 15 g Agarose, ein aus D-Galactose und 3,6- Anhydro-L-Galactose Disaccharideinheiten linear aufgebautes Polysaccharid verschiedener Rotalgenarten werden in einem Liter A. bidest gelöst und im Anschluss für 15 min bei 121 ° C autoklaviert. Nach Abkühlung des Nährmediums wird Ampicillin (c=100 µg/ ml) hinzugefügt. Das resultierende Gemisch wird unter sterilen Bedingungen auf Agarplatten ausgegossen, bis zur Verfestigung bei Rt abgekühlt und anschließend bei 4 ° C gelagert.

- LB-Agarplatten für SC301

Zubereitung ist gleich der von SC300 mit Ausnahme einer weiteren Beimengung von Kanamycin (c= 50 µg/ ml) vor dem Ausgießen.

2.1.6.3 Puffer und Lösungen

- ATP-Vorratslösung 20,0 mM ATP; 100,0 mM Imidazol; 1,0 mM DETAPAC;
Solvens: A. bidest; pH 6,6 einstellen und Molarität des ATP durch Messung der Absorption bei 259 nm verifizieren (mol. Extinktionskoeffizient=15,4);
Lagerung bei -80° C
- DAG-Kinase-Lösung 10,0 µl 1,0 M Imidazol; 10,0 µl 100,0 mM DETAPAC;
0,5 mg sn-1,2-DAG-Kinase von Calbiochem
ad 1,0 ml A. bidest; Herstellung von 100,0 µl Aliquoten;
Lagerung bei -80° C
- DETAPAC-Lösung (100 mM) 393,3 mg Diethyltriaminpentaessigsäure (DETAPAC)
ad 10,0 ml A. bidest; pH 7,0 einstellen; Lagerung bei -80° C
- DAG-Lösung (10 µg/ µl) 2,0 mg 1,2-Dioleoyl-sn-Glycerol (C 18:1, (Cis)-9) von Sigma
ad 200,0 µl 1:1 Chloroform-Methanol-Gemisch,
Aliquotierung zu je 50,0 µl; Lagerung bei -80° C
- DTT-Lösung 20,0 mM DTT; 1,0 mM DETAPAC; Lösungsmedium:
A. bidest; (vor jedem Experiment neu herstellen)
- 10X EDTA (Salzlösung) für die Trypsinierung der HeLa-Zellen 2,0 mg/ ml EDTA; 80 mg/ ml NaCl; 2,0 mg/ ml KCl;
11,5 mg/ ml Na₂PO₄; 2,0 mg/ ml KH₂PO₄ ad 100 ml
A. bidest; pH 7,5; steril filtrieren bzw. autoklavieren
- 7,5 % n-Octyl-β-Glucopyranosid 250 mg n-Octyl-β-D-Glucopyranosid von Calbiochem zu
3,37 ml 1,0 mM DETAPAC-Lösung geben; starkes Vortexen bis zur Schaumbildung (**Indikator für Lösung**);
Aliquotierung zu je 100 µl; Lagerung bei -80° C
- Imidazol (1,0 M) 680,0 mg Imidazol ad 10,0 ml A. bidest; pH 6,6 einstellen;
Lagerung bei -80° C
- Mowiol 6,0 g Glycerol; 2,4 g Mowiol 4-88 von Sigma ad 6,0 ml
A. bidest lösen und 2 h bei Rt inkubieren; 10 ml 0,2 M Tris-HCl (pH= 8,5) zugeben; Inkubation: 10 min, 50° C;
Zentrifugation: 15 min, 7500 rpm (2830 g), Eppendorf Zentrifugen; Lagerung bei -20° C
- Mopso (Morpholino-2-hydroxypropansulfonsäure) 0,5 M Lösung; Solvens A. bidest
- 0,2 M Natriumchloridlösung 1,16 g NaCl ad 100,0 ml A. bidest

- 7,5 % Octyl- β -Glucosid/
5,0 mM Cardiolipin-Lösung 5,0 mg N₂-getrocknetes Cardiolipin von Sigma;
250 mg n-Octyl- β -Glucosid von Calbiochem; 3,37
ml 1,0 mM DETAPAC-Lösung zugeben; starkes Vor-
exen bis zur Schaumbildung (**Indikator für Lösung
der Reagenzien**); Aliquotierung zu je 100,0 μ l,
Lagerung bei -80 °C
- ³²P- γ -ATP-Lösung 2,0 μ l (ca. 20,0 μ Ci) in 48,0 μ l A. bidest lösen
- Paraformaldehyd 3,7 %
(PFA-Lösung) 3,7 g PFA in 20 ml A. bidest lösen; Erwärmung auf
ca. 60 °C; Zugabe von 10 M NaOH bis zur
vollständigen Lösung des PFA; Abkühlung auf Rt;
10,0 ml 10X PBS hinzupipettieren und pH 7,6
einstellen; ad 100,0 ml A. bidest verdünnen;
Lagerung bei -20 °C
- 10X PBS 80,0 g/l (1,36 M) NaCl; 2,0 g/l (27 mM) KCl; 14,4 g/l
(101 mM) Na₂HPO₄; 2,4 g/l (18 mM) KH₂PO₄; ad 1,0 l
A. bidest; pH 7,4 einstellen; autoklavieren
- 2X Reaktionspuffer 100 mM Imidazol; 25,0mM MgCl₂; 100 mM NaCl; 2,0 mM
EGTA; Lösungsmedium: A. bidest; pH 6,6 einstellen;
Lagerung bei -80 °C
- 0,2% SDS-Lösung Herstellung einer 10 %igen Vorratslösung
(100 mg SDS/ ml A. bidest) und anschließend 50-fach
verdünnen; Lagerung bei Rt
- stock solution nach Bradford 100 ml Ethanol p. A.; 200 ml 85 % H₃PO₄; 350 mg
Serva Blue R von Coomassie (Kat.Nr.35051);
Lagerung bei 4 °C
- 1X Trypsin-Lösung Herstellung von 1X EDTA (1 Vol. 10X EDTA
+ 9 Vol. A. bidest);
Herstellung von 1X Trypsin (1 Vol. 2,5 % 10X Trypsin
+ 9 Vol. 1X EDTA)
- working buffer nach Bradford 15,0 ml Ethanol p. A.; 30,0 ml 85 % H₃PO₄; 30,0 ml stock
solution nach Bradford; 425 ml A. bidest; Filtrieren;
Lagerung bei Rt

2.1.7 Sonstige Materialien

- Parafilm "M" American National Com TM
- Scientific Imaging Film
(20,3x25,4 cm) Kodak
- DC-Platten (20x20 cm) Sigma Aldrich (Kat. Nr. Z 292893)
- BioMax Tran Screen-HE
Intensifying Screen Kodak
- Whatman-Papier

2.2 Methoden

2.2.1 Zellbiologische Methoden

Im Folgenden sind die Arbeitsmethoden aufgeführt, die auf zellulärer Grundlage basieren.

2.2.1.1 Anlegen einer HeLa-Zellkultur mit definierter Zellzahl

Vor Anlegen einer Zellkultur muss geprüft werden, ob ausreichend Zellmaterial für die Versuche zur Verfügung steht. Dies kann durch den lichtmikroskopischen Nachweis eines konfluenten Zellrasens auf dem Boden der Zellkulturflaschen festgestellt werden. Zum Zweck der Ablösung adhärenter HeLa-Zellen vom Boden einer 500 ml Zellkulturflasche erfolgt die Trypsinierung mit 1X Trypsin (s. 2.1.6.3). Dazu wird zunächst das die HeLa-Zellen bedeckende MEM aspiriert und verworfen. Im Anschluss daran werden die HeLa-Zellen kurz mit 3,0 ml 1X Trypsin gewaschen, um restliches MEM und abgestorbene Zellen zu entfernen. Zur vollständigen Lösung des Zellrasens werden erneut 4,0 ml 1X Trypsin in die Zellflasche pipettiert und einige Minuten bei 37° C inkubiert. Danach müssen 9,0 ml MEM in die Zellflasche gegeben werden. Diese 13,0 ml Zellsuspension werden dann in ein 15,0 ml Zentrifugationsröhrchen überführt und für 4 min bei 2675 rpm (800 g) und Rt zentrifugiert (Labofuge 400 R). Nach abgeschlossener Zentrifugation wird das Medium oberhalb des Zellpellets aspiriert und verworfen. Das Pellet wird dann in 3,0 ml MEM resuspendiert, wobei auf eine vollständige Resuspension der Zellen zu achten ist. Anschließend wird die Zellkonzentration mit Hilfe der Neubauer Zählkammer bestimmt.

Quantifizierungsbeispiel :

Neubauer Zählkammer: Die Oberfläche ist aus diversen Quadraten von $0,0025 \text{ mm}^2$ zusammengesetzt. Bei einer Kammertiefe von $0,1 \text{ mm}$ entspricht jedem Oberflächenquadrat ein Volumen von $0,00025 \text{ }\mu\text{l}$. 16 Quadrate sind in einem durch Tripellinien abgegrenzten 16-er Feld zusammengefasst.

Ermittlung der in der Zellsuspension vorhandenen Zellen:

Lichtmikroskopische Auszählung der Zellen in vier 16-er Feldern mit anschließender Bildung des arithmetischen Mittels.

n Zellen/ 4= Mittelwert eines 16-er Feldes (MW)

c= MW/ 16/ $0,00025 \text{ }\mu\text{l} \times 1000$ [n Zellen/ ml]

Ermittlung des benötigten Zellsuspensionsvolumen:

$$Z_1:V_1 = Z_2:V_2$$

Z_1 = Zellzahl in der Suspension [n Zellen]

V_1 = gesuchtes Volumen [ml Suspension]

Z_2 = gewünschte Zellzahl [n Zellen]

V_2 = gewünschtes Volumen je Zellkultur [ml]

Die Konzentration der Zellkulturen soll 3×10^5 HeLa-Zellen pro ml Medium betragen, das entspricht einer Zellmenge von $4,5 \times 10^6$ bei einem Volumen von $15,0 \text{ ml}$ pro Kultur. Zur Vereinfachung und Gewährleistung einer konstanten Anzahl von Zellen in den einzelnen Kulturen wird eine Suspensionslösung folgender Zusammensetzung benutzt:

n sei die Anzahl benötigter Zellkulturen, dann enthält die Suspension $n \times 15 \times 3 \times 10^5$ Zellen und $n \times 15,0 \text{ ml}$ Volumen.

Die Zellsuspension wird dann gemäß der Anzahl benötigter Kulturen auf entsprechende 100 mm Kulturschalen aufgeteilt, die dann wiederum 20 bis 24 h bei 37° C in einem mit $10\% \text{ CO}_2$ angereicherten Umgebungsmilieu inkubiert werden. Ist eine Infektion mit Shigella vorgesehen, wird am Vorabend das 10% ige FCS/ MEM durch $0,5\%$ iges FCS/ MEM Nährmedium ersetzt. Durch diese "serum-starved" Bedingungen soll eine Sensibilisierung der HeLa-Zellen erreicht werden. Letztlich ist durch diese Manipulation, eine Beeinflussung des Signaltransduktionsprozesses im Sinne einer verstärkten Reaktion auf den Stimulus der Shigelleninvasion zu erhoffen.

2.2.1.2 Anfärbung des zytoskelettalen F-Aktins durch Bodipy markiertes Phalloidin

Diese Methode dient in dieser Versuchsreihe zur Kontrolle der Infektion von HeLa-Zellen durch SC301. Für den nicht-invasiven Stamm SC300 ist dies nicht sinnvoll. Erfolgreich ist eine Infektion, wenn sich das charakteristische Bild der Membrankräusel zeigt. Diese sind eine das Bakterium umgebende Membranstruktur mit diversen zellulären, pfeilerartigen Ausstülpungen, sogenannten Protrusionen. Diese Protrusionen verschmelzen miteinander, wodurch die Bakterie internalisiert wird, was letztlich zur Infektion der entsprechenden Zelle führt. Zugrunde liegen diesem Prozess zytoskelettale Re- und Umformierungen. Das hierbei maßgeblich beteiligte F-Aktin lässt sich indirekt durch Verwendung spezieller Antikörper und des Farbstoffes Phalloidin im Fluoreszenzlicht mikroskopisch darstellen (s. Tabelle 1). Beim Anlegen der Zellkulturen (s.2.2.1.1) ist in jede 100 mm Kulturplatte ein steriles 22x22 mm Deckgläschen zu legen. Im weiteren Verlauf wird nur noch eine mit SC301 infizierte Zellkultur, die stellvertretend für alle involvierten Kulturen steht, hinsichtlich des Infektionserfolges überprüft. Die Infektion erfolgt bei 37° C für 20 min. Vor der Färbung sind die in tabellarischer Form aufgezählten Prozeduren erforderlich.

Tabelle 1: Vorbereitung der Hela-Zellen für die Aktinfärbung

Prozedur	Bedingungen	Bemerkungen
Aspiration des Zellmediums, viermalige Waschung in 1X PBS	Rt	Gewährleistung einer bakterienfreien Zelloberfläche
Inkubation in 3,7% PFA, anschließende dreimalige Waschung in 1X PBS	20 min, Rt	Fixierung, Solvens 1X PBS
Deckgläschen in 30 mm Kulturplatte überführen		Zellrasen muss zur freien Oberfläche zeigen
2 x Inkubation in 0,1 M Glycin, anschließende zweimalige Waschung in 1X PBS	5 min, Rt	Sättigung von Aldehydgruppen und somit Verhinderung unspezifischer AK-Bindungen, Solvens 1X PBS
Inkubation in 0,2 % Triton X-100, anschließende Waschung in 1X PBS	5 min, Rt	Permeabilisation der Zellmembran, Solvens 1X PBS

Hieran schließt sich die Inkubation mit speziellen Antikörpern und Farbstoffen an. Verwendet werden ein Primärantikörper (P5D4 anti-vsv, monoklonal, Maushybridom) und ein fluoreszenzmarkierter Sekundärantikörper (Ziegenantikörper anti-Maus IgG), die jeweils in sterilem 1X PBS verdünnt werden. 40 µl Primärantikörperlösung (1:200 in 1X PBS) werden auf Parafilm pipettiert und 20 min bei Rt in

lichtgeschützter, feuchter Umgebung mit den nach oben beschriebener Prozedur behandelten Deckgläschen inkubiert. Hierbei ist auf direkten Kontakt von Antikörper und infizierten HeLa-Zellen zu achten. Nach dreimaligem Waschen mit 1X PBS erfolgt die Inkubation für 20 min bei Rt in feuchter Umgebung mit dem sekundären Antikörper und Phalloidin zur Färbung des F-Aktins. Solvens ist steriles 1X PBS. Der Antikörper wird 1:100, das in Methanol gelöste Phalloidin nach vorheriger Lufttrocknung 1:50 verdünnt. Vor dem abschließenden Eindecken in Mowiol wird dreimal mit 1X PBS gewaschen.

2.2.1.3 Eindecken der Deckgläschen auf einen Objektträger

Zunächst wird ein Tropfen auf 37° C erwärmtes Mowiol auf jeden Objektträger pipettiert. Dann werden die Deckgläschen mit der bewachsenen Seite auf den Objektträger gelegt, so dass sich das Mowiol dazwischen ausbreiten kann. Zur Trocknung müssen die Objektträger für ca. 10 min bei 37° C inkubiert werden. Die langfristige Lagerung erfolgt bei 4° C.

2.2.2 Bakteriologische Methoden

2.2.2.1 Stammhaltung

Die Stammhaltung erfolgt mittelfristig auf LB-Agarplatten mit antibiotischen Zusätzen bei 37° C. Langfristig werden die Bakterien bei -80° C jedoch ohne Antibiotika gelagert. Zur Anzucht einer großen Bakterienpopulation werden antibiotisch beimpfte TSB-Flüssigmedien verwendet (s. 2.1.6.2.1).

2.2.2.2 Inokulation

Die Inokulation erfolgt derart, dass mittels steriler Öse SC300 bzw. SC301 in 10,0 ml TSB-Flüssignährmedium (s. 2.1.6.2.1) übertragen und im Anschluss ca. 17 h bei 37° C geschüttelt werden.

2.2.2.3 Herstellung infektiöser Lösungen mit definierter Anzahl Bakterien

Für die Durchführung eines Experimentes zur Aufklärung der Signaltransduktionsprozesse der Stämme SC300 und S301 wird eine Menge von 9×10^8 Shigellen pro HeLa-Zellkultur mit $4,5 \times 10^6$ Zellen gewählt. Dies entspricht einer Konzentration von $c = 1,8 \times 10^8$ S300 bzw. S301 je ml Medium. Das *E. coli* Flexneri Suspensionvolumen für die Infektion einer HeLa-Kultur beträgt 5,0 ml. Damit ist eine ausreichende Bedeckung der Zellkultur mit Bakterienmedium als Grundlage einer hohen Infektionsrate gewährleistet. Um eine solche Anzahl von SC300 bzw. SC301 zu erhalten, werden die am Vorabend inokulierten Bakterien 1:20 in den vorgesehenen Flüssigmedien (s. 2.1.6.2.1) verdünnt und für weitere zwei Stunden bei 37° C geschüttelt. Photometrisch wird im Anschluss die Absorption von 1,0 ml der SC300- bzw. SC301-Suspensionen bestimmt. Gemessen wird bei 600 nm gegen 1,0 ml TSB als

Leerwert. Zur Ermittlung der tatsächlich vorhandenen Bakterienanzahl in den entsprechenden Suspensionen wird sich in diesen Experimenten auf den Standardwert $4,0 \times 10^8$ SC300 bzw. SC301 entsprechend einer optischen Dichte (1 OD) bezogen. Die über eine einfache Verhältnisgleichung errechneten Bakteriensuspensionsvolumina werden zum Zwecke der Pelletierung zentrifugiert (4500 rpm, 2260 g, 10 min und 4°C , Labofuge 400 R). Die absolute Bakterienanzahl für diese Experimente soll $39,6 \times 10^8$ für jeden Stamm betragen. Nach Beendigung der Zentrifugierung wird der Überstand abgenommen und verworfen. Das Pellet jedes Stammes wird in 22,0 ml MEM resuspendiert. Zuletzt erfolgt eine Aufteilung der Resuspensionen in viermal 5,0 ml pro Stamm. Dies entspricht exakt der Anzahl zu infizierender HeLa-Zellkulturen. Die Bakteriensuspensionen werden bis zum Beginn des Experiments auf Eis gestellt, um die Anzahl weiterer Teilungsvorgänge zu minimieren.

2.2.2.4 Infektion der HeLa-Zellkulturen mit SC300 und SC301

Die Infektion erfolgt für alle HeLa-Kulturen nach dem im Folgenden beschriebenen gleichen Algorithmus. Unterschiedlich sind jedoch die Infektionszeiten, d. h. die Zeit vom Beimpfen der Kulturplatten mit SC300- bzw. SC301-Suspensionen (s. 2.2.2.3) bis zur Aspiration derselben. Sie betragen fünf, 15 und 30 min. Zusätzlich wird je eine Zellkultur pro Stamm mit Bakteriensuspension beimpft, welche sofort wieder aspiriert wurde. Dieser wird als Null- oder Kontrollwert bezeichnet.

Arbeitsschritte :

- Mediumwechsel der HeLa-Kulturen: Ersatz des 10 %igen bzw. bei *serum starved* Bedingungen 0,5 %igem FCS in MEM durch 37°C warmes MEM ohne FCS,
- Inkubation der HeLa-Zellen bis zur Infektion bei 37°C ,
- Erwärmung der auf Eis stehenden SC300- bzw. SC 301-Suspensionen auf 37°C im Wasserbad,
- Aspiration des den HeLa-Zellrasen bedeckenden MEM und unmittelbar folgende Infektion durch Zugabe der 5,0 ml SC300- bzw. SC 301-Suspensionen in die Kulturplatte,
- Inkubation der Zellkulturen im 37°C Wasserbad entsprechend der vorgesehenen Infektionsdauer,
- Stoppen der Infektion durch Absaugen der Bakteriensuspensionen, Lagerung der infizierten Zellkultur auf Eis und Waschen der Zellkultur mit eiskaltem 1X PBS,
Kommentar: Durch die kalten Temperaturen ist die Geschwindigkeit enzymatischer Reaktionen so gering, dass der Metabolismus von Zelle und Bakterie als vernachlässigbar angenommen werden kann.
- gründliches Abpipettieren des 1X PBS,
- Zugabe von 665,0 μl des auf Eis gelagertem 0,2 %igem SDS und Abkratzen der Zellen mit Zellschaber und Überführen des Zelllysates mittels Pipette in 15,0 ml PP-Röhrchen,
- Wiederholung des vorangegangenen Schrittes,
- Mehrmaliges Aspirieren des SDS-Zelllysates bis eine relativ dünnflüssige Lösung erscheint,

- Lagerung der in SDS lysierten HeLa-Zellen auf Eis.

Die weitere Verwendung der lysierten HeLa-Zellen wird weiter unten beschrieben, schließt sich jedoch im Experiment unmittelbar an.

2.2.3 Bestimmung des Proteingehaltes

Die Proteindetektion wird im Rahmen der für den Versuch notwendigen Normalisation durchgeführt (s. 2.2.9). Zur besseren Auswertung der Messdaten erfolgt die Proteinmessung im Doppelansatz. Die Proteinprobe wird dem SDS-Lysat entnommen. Die photometrische Proteinbestimmung wird bei 595 nm durchgeführt. Gemessen wird in Einwegküvetten gegen den in der Tabelle 2 skizzierten Leerwert (s. Tabelle 2).

Tabelle 2: Pipettierung der für Proteinnormalisation vorgesehenen Proben

Reagenzien (in μl)	SDS-Lysat der HeLa-Zellen (in μl)	Leerwert (in μl)
Probenvolumen	5,0	0
1X PBS	95,0	95,0
Working buffer nach Bradford	1000,0	1000,0
0,2 % SDS	0	5,0

2.2.4 Phospholipidgewinnung durch Chloroformextraktion

Die Fettextraktion erfolgt nach einem abgewandelten Protokoll von Bollag und Griner [166]. Abweichend von Bollag und Griner wird auf eine ein- bis zweistündige Inkubationszeit während der ersten Chloroformextraktion auf Eis verzichtet. Nachdem aus dem SDS-Lysat Proteinproben entnommen worden sind, erfolgt die Phasentrennung durch Hinzupipettieren von 1,625 ml CHCl_3 und 3,25 ml CH_3OH in jedes 15,0 ml PP-Röhrchen (s. 2.2.2.4, 2.2.3). Dieses Gemisch wird im Anschluss mit der Hand ca. 10 s gut geschüttelt und ca. 15 min auf Eis inkubiert. Nachfolgend werden die Proben mit jeweils 1,625 ml CHCl_3 und 1,6 ml 0,2 M NaCl verdünnt. Alternativ können dem SDS-Lysat direkt 3,25 ml CHCl_3 in jedes 15,0 ml PP-Röhrchen hinzupipettiert werden. Dieses Gemisch wird im Anschluss mit der Hand ca. 10 s gut geschüttelt. Nachfolgend werden 3,25 ml CH_3OH und 1,6 ml 0,2 M NaCl in jedes 15,0 ml Probenröhrchen pipettiert. Danach wird jede Probe 10 s mit dem Vortexgerät bei maximaler Stärke geschüttelt und dann 5 min bei 4° C und bei 4500 rpm (2260g) zentrifugiert (Labofuge 400 R). Im Anschluss wird die untere CHCl_3 -Phase in ein neues 15,0 ml PP- Röhrchen überführt. Hierauf erfolgt eine zweite Extraktion mit dem Ziel, restliche polare Bestandteile auszuwaschen. Dafür ist es notwendig 1,6 ml CH_3OH und 1,6 ml 0,2 M NaCl der CHCl_3 -Phase jedem Probenröhrchen hinzuzufügen. Es folgen Vortexen und Zentrifugieren wie oben beschrieben. Danach wird die untere CHCl_3 -Phase nochmals in ein neues Gefäß überführt. Abschließend muss das CHCl_3 mittels N_2 einge-

dampft werden. Die PL erscheinen dann als krustiges Material am Boden des PP-Gefäßes. Bis zur weiteren Verwendung der PL-Proben werden selbige bei -20°C gelagert, um eine Degeneration der PL zu verhindern. Eine Lagerung der PL ist unter diesen Bedingungen bis zu drei Tagen vertretbar [167].

2.2.5 Solubilisation und Aktivierung der Phospholipide

Die Solubilisation der PL wird durch das Detergens n-Octyl- β -Glucosid/ Cardiolipin realisiert. Pro PL-Probe werden 20,0 μl eingesetzt. Durch gründliches Spülen der Ränder des PP-Gefäßes wird versucht, möglichst alle PL in den Assay miteinzubeziehen. Das sich anschließende intensive Schütteln mit dem Vortexgerät über 20 s ermöglicht eine ausreichende Mizellbildung aus dem verwendeten Detergens, in welchen letztlich die PL gelöst sind. Es folgt eine Inkubation von 15 min bei Rt.

2.2.6 Herstellung eines Reaktionsansatzes für die enzymatische Phosphorylierung des Diakylglycerols

Der Reaktionsansatz besteht aus Einzelkomponenten, die entsprechend der Probenanzahl **n** n-mal im Ansatz vorhanden sein müssen. (s.2.1.6.3)

Tabelle 3: Zusammensetzung des Reaktionsansatzes

<u>Reagenz</u>	<u>n x in μl</u>
2X Reaktionspuffer (s. 2.1.6.3)	
(Pufferlösung für enzymatische Reaktion)	50,0
DAG-Kinase-Lösung (s. 2.1.6.3)	5,0
ATP-Vorratslösung (s.2.1.6.3)	5,0
DTT-Lösung (s. 2.1.6.3)	10,0
^{32}P - γ -ATP-Lösung (s. 2.1.6.3)	5,0

2.2.7 Enzymatische Reaktion: Initiation, Termination und Phospholipidextraktion

Um die Kinasereaktion zu initiieren, werden 80,0 µl des Reaktionsansatzes zu jeder PL-Probe pipetiert. Nach 30 min Inkubationszeit bei Rt wird diese gestoppt, indem 2,0 ml 1:2 CHCl₃/ CH₃OH Gemisch und 1,0 ml 0,2 M NaCl in die Probenröhrchen gegeben und kurz mit dem Vortexgerät geschüttelt wird. Dann sind 2,0 ml CHCl₃ hinzuzugeben, noch einmal zu vortexen und mit 4000 rpm (1350 g) bei 4° C für 1 min zu zentrifugieren (Hettich Zentrifuge). Die Extraktion der PL erfolgt durch Überführen der unteren CHCl₃-Phase in je ein neues PP-Röhrchen und anschließende Eindampfung des CHCl₃ durch N₂.

2.2.8 Dünnschichtchromatographie

2.2.8.1 Mobile Phase und Dünnschichtchromatographiekammer

Die mobile Phase hat ein Gesamtvolumen von 95,0 ml und enthält folgende Bestandteile:

- 50,0 ml Chloroform p. a.,
- 20,0 ml Aceton p.a.,
- 10,0 ml Methanol p. a.,
- 10,0 ml Essigsäure p. a.,
- 5,0 ml A. bidest.

Diese überwiegend organische Lösung wird dann in eine mit 1,0 mm starkem Whatman-Papier ausgekleidete DC-Kammer gegossen. Die DC-Kammer wird mittels eines Silikongels und einer Glasplatte abgedichtet, so dass eine übermäßige Evaporation der mobilen Phase vermieden werden kann.

2.2.8.2 Dünnschichtchromatographieplatten

Die 20x20 cm DC-Platten von Sima Aldrich (Kat. Nr. Z 292893) werden vor ihrer Verwendung zur Lipidauftrennung ca. 60 min bei ca. 110° C hitzeaktiviert. Nach der Hitzeaktivierung sind die Platten 24 h für eine Dünnschichtchromatographie verwendbar. Sinn der Aktivierung ist die Schaffung freier Hydroxidgruppen an der Oberfläche der Kieselgelplatten, an die dann entsprechend polare Substanzen über Wasserstoffbrücken gebunden werden können.

2.2.8.3 Chromatographische Auftrennung der Phospholipide

Zur Separation der einzelnen Phospholipide, insbesondere des DAG, wird während der gesamten Versuchsreihe das Verfahren der Dünnschichtchromatographie gewählt. Um eine Identifizierung des DAG möglich zu machen, läuft parallel ein Standard über die Platte, der dann als separate Bande erscheint. Dazu wird der Standard folgendermaßen radioaktiv markiert.

Markierung des DAG-Standards:

- 50,0 µl DAG-Lösung (s. 2.1.6.3) mit N₂ in 15,0 ml PP-Röhrchen trocknen,
- Zugabe von 100,0 µl n-Octyl-β-Glucopyranosid/ Cardiolipin (dann 20 s vortexen und 15 min bei Rt inkubieren),
- Hinzupipettieren von 250,0 µl 2X Reaktionspuffer; 50,0 DTT-Lösung; 25,0 µl ³²P-γ-ATP-Lösung; 25,0 µl ATP-Vorratslösung; 30,0 µl DAG-Kinase-Lösung (s.2.1.6.3),
- 30 min Inkubation bei Rt,
- Zugabe von 2,0 ml eiskaltem 1:2 CHCl₃ / CH₃OH Gemisch und 1,0 ml 0,2 M NaCl (Stopreagenz),
- Vortexen,
- Zugabe von 2,0 ml CHCl₃,
- Vortexen, Zentrifugation (4000 rpm (1350 g), 1 min, 4° C, Hettich Zentrifuge),
- Überpipettieren des CHCl₃ in ein neues 15,0 ml Polypropylenröhrchen,
- Aliquotieren zu je 200,0 µl, Aliquote mit Stickstoff trocknen und bei -20° C einfrieren.

Zur Auftrennung der einzelnen Lipidfraktionen werden die Lipidproben in je 70,0 µl eines 2:1 CHCl₃/CH₃OH Gemisches solubilisiert. In Abhängigkeit vom Proteingehalt der einzelnen Proben werden im Rahmen der Normalisation (s. 2.2.9) unterschiedliche Mengen des Ausgangsvolumens als stationäre Phase aufgetragen. Als Standard wird eine Masse von ca. 50,0 µg radioaktiv markiertes DAG aufgetragen. Dies entspricht der Menge, die in einem Aliquot vorhanden ist. Nachdem das Solubilisationsgemisch aus CHCl₃ und CH₃OH vollständig evaporiert ist, werden die Platten in die DC-Kammer gestellt. Die Dünnschichtchromatographie wird beendet, wenn die mobile Phase noch 2,0 bis 3,0 cm vom oberen DC-Plattenrand entfernt ist.

2.2.9 Normalisation

Die Einstellung der Lipide erfolgt indirekt über die Proteine. Dabei wird davon ausgegangen, dass ein relativer Proteinüberschuss einer Probe gegenüber dem arithmetischen Mittel aller Proben ebenfalls einen relativen Lipidüberschuss dieser Probe bedeuten würde. Als Maßzahl für den Proteingehalt dient die optische Dichte oder OD. Ziel ist es, dass sich die absolute Menge an Lipiden in den Proben untereinander gleicht, denn nur so ist es möglich, die Proben in ihren relativen Lipidmengen, insbesondere DAG, miteinander zu vergleichen. Realisiert wird dies wie folgt: Die Proteinmessung wird im Doppelansatz durchgeführt, so dass für jede Probe 2 OD-Messwerte zur Verfügung stehen, aus de-

nen dann der Mittelwert dieser Probe gebildet wird. Die OD-Werte der einzelnen Proben werden dann addiert und durch den Probenumfang dividiert, woraus sich der OD-Mittelwert der Gesamtprobe ergibt. Abweichungen der Einzelprobe vom Mittelwert zu höheren OD-Werten bedeuten einen höheren Protein- bzw. Lipidgehalt. Abweichungen zu kleineren OD-Werten werden gegenteilig bewertet. Festgelegt wird, dass der OD-Mittelwert aller Proben einem Volumen von 50,0 µl solubilisierter PL entspricht. Da zwischen den Messwerten der Proteine bzw. Lipide der einzelnen Proben und dem aufzutragenden Volumen solubilisierter PL eine umgekehrte Beziehung besteht, wird bei einem relativ zum OD-Mittelwert erhöhten bzw. verringerten OD-Wert der Einzelprobe ein geringeres bzw. höheres Volumen als 50,0 µl auf die DC-Platte aufgetragen.

2.2.10 Identifizierung in den Proben enthaltener Phospholipide

Die dünnschichtchromatographisch aufgetrennten PL, die in den einzelnen Proben enthalten sind, können auf einem Röntgenfilm qualitativ ermittelt werden. Dazu werden die Chromatographieplatten nach abgeschlossener DC an der Luft getrocknet und in Cellophanfolie gewickelt. Anschließend wird in der Dunkelkammer ein Röntgenfilm auf die silikatbeschichtete Seite der DC-Platte gelegt. Um das Bandenmuster zu verstärken, wird ein speziell für ^{32}P -Isotope geeigneter Intensivierungsschirm benutzt. Die Exposition des Filmes erfolgt in einer Fotomappe bei -80°C für mindestens 3 h.

2.2.11 Herstellung eines Zellpools

Bei entsprechenden Fragestellungen ist die Anlage eines Zellpools sinnvoll. Hierbei werden die HeLa-Zellen analog 2.2.1.1 ausgesät. Die Zellen jeder einzelnen Kultur werden jedoch im weiteren Versuchsablauf zu einer gesamten Zellmasse zusammengefasst und auch in ihrer Gesamtheit bearbeitet. Das Splitting des Pools wird erst wieder vor der chromatographischen Auftrennung der PL notwendig. Die genaue Arbeitstechnik zur Herstellung eines solchen Zellpools ist im Folgenden beschrieben:

- Anlage der benötigten Anzahl HeLa-Kulturen 24 h vor Experimentbeginn,
- Waschen der Zellen jeder Zellkulturschale mit je 15,0 ml MEM und Absaugen des MEM,
- Spülen mit je 15,0 ml 1X PBS und Absaugen des 1X PBS,
- zweimaliges Abkratzen des auf dem Kulturschalenboden gewachsenen HeLa-Zellrasens mit je 500,0 µl 1X PBS und Überführung der Suspension in ein 50 ml PP-Röhrchen,
- Zentrifugieren der Zellsuspension (2670 rpm (800 g), 4 min, 24°C , Labofuge 400 R),
- Abnahme und Verwerfen des Überstandes,
- Zellpellet in $n \times 1,33$ ml 0,2 %iges SDS gut suspendieren, der Faktor n entspricht der entsprechend 2.2.1.1 angelegten HeLa-Zellkulturen,
- Zugabe von $n \times 3,25$ ml CHCl_3 , $n \times 3,25$ ml CH_3OH und $n \times 1,6$ ml 0,2 M NaCl in das Gefäß mit dem SDS-Zelllysate (n : Anzahl angelegter HeLa-Zellkulturen),

- Vortexen und Zentrifugieren (5 min, 4° C, 4500 rpm (2260 g), Labofuge 400 R),
- Überpipettieren der unteren CHCl₃-Phase in ein sauberes Polypropylengefäß,
- n x 1,6 ml CH₃OH und n x 1,6 ml 0,2 M NaCl zu der CHCl₃-Phase in dem Polypropylengefäß hinzupipettieren (n: Anzahl angelegter HeLa-Zellkulturen),
- Vortexen und Zentrifugieren (5 min, 4° C, 4500 rpm (2260 g), Labofuge 400 R),
- Überpipettieren der unteren CHCl₃-Phase in ein sauberes Polypropylengefäß,
- N₂-Trocknung der PL.

Auf die in 2.2.9 beschriebene Normalisation der PL kann dann verzichtet werden, da die Anlage eines Pools Pipettierungenauigkeiten und ähnliche Fehlerquellen relativ gut kompensiert.

2.2.12 Phospholipidanteil bakterieller Membranen

Getestet wird eine absolute Menge von 9×10^8 Bakterien. Diese entspricht der Anzahl an Bakterien, die üblicherweise für die Infektion von $4,5 \times 10^6$ HeLa-Zellen, der für die Versuche üblichen Zellanzahl einer Zellkultur, eingesetzt wird. Zusätzlich wird parallel die Hälfte der Bakterienanzahl untersucht. Die Versuche werden analog den in oben beschriebenen Prozeduren durchgeführt (s. 2.2.2, 2.2.3, 2.2.4, 2.2.5, 2.2.6, 2.2.7, 2.2.8, 2.2.9, 2.2.10). Die Infektion (s. 2.2.2.4) wurde simuliert, indem die Suspensionen aus SC300 und SC301 30 min bei 37° C inkubiert wurden.

2.2.13 Abhängigkeit der DAG-Kinase von der Reaktionszeit

Analog 2.2.1.1 werden vier HeLa-Zellkulturen hergestellt und ohne vorherige Infektion mit *E. coli* Flexneri nach dem in 2.3.11 beschriebenen Muster als Zellpool weiterverwendet (s. 2.2.11).

Die Lösung der getrockneten PL erfolgt in 96,0 µl n-Octyl-β-Glucosid/ Cardiolipin. Nach 15 min andauernder Inkubation bei Rt werden die gelösten PL in Eiswasser gestellt, und 344,0 µl des Reaktionsansatzes hinzugegeben (s. 2.2.6). In einem geeigneten PP-Röhrchen erfolgt die Zentrifugierung (2 min, 0° C, 4000 rpm (1340 g), Hettich Zentrifuge). Dann wurden je 100,0 µl des Überstandes auf insgesamt vier 15,0 ml PP-Gefäße verteilt. Eine Probe wurde ohne Inkubationszeit lt. 2.2.7 weiterverarbeitet. Die anderen drei Proben wurden bei 20° C im Wasserbad inkubiert. Die Inkubationszeiten sollten 10, 30 und 60 min betragen. Nach abgelaufener Inkubation entsprach der weitere experimentelle Ablauf 2.2.7, 2.2.8 und 2.2.10.

2.2.14 Abhängigkeit der DAG-Kinase von der Reaktionstemperatur

Es werden Temperaturen zwischen 17° C und 30° C als Inkubationstemperatur gewählt, die der Schwankungsbreite der Raumtemperatur entsprechen. Weiterhin werden in jedem Experiment Negativkontrollen, die nicht mit der DAG-Kinase über 30 min inkubiert werden, durchgeführt. Zu Beginn

werden acht HeLa-Zellkulturen hergestellt. Eine Infektion findet nicht statt. Die Bearbeitung der Zellkulturen erfolgt wie 2.2.11 beschrieben. Die getrockneten PL werden im Anschluss in 192,0 μl n-Octyl- β -Glucosid/ Cardiolipin-Lösung gut solubilisiert und für 15 min bei Rt inkubiert. Nach abgelaufener Inkubationszeit wird diese PL-Suspension in Eiswasser gestellt. Der Reaktionsansatz wird entsprechend 2.2.6 hergestellt und 688,0 μl desselben zu der PL-Suspension hinzupipettiert. 840,0 μl dieses Gemisches aus PL, Detergens und Reaktionsansatz werden in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß pipettiert und zentrifugiert (2 min, 0° C, 4000 rpm (1018 g) Eppendorf Zentrifuge). Der Überstand ist dann in ein weiteres 1,5 ml Eppendorf-Gefäß zu überführen und zu je 95,0 μl auf acht 15,0 ml Polypropylenröhrchen zu verteilen. Bei allen Arbeitsschritten, die nach der Inkubation der PL im Detergens bis zur enzymatischen Reaktion stattfinden, muss eine Temperatur von 0° C gewährleistet sein. Die Enzymreaktion wird in auf die Wunschttemperatur eingestellte Wasserbäder durchgeführt. Die Enzyminkubation der Proben erfolgt für jede Temperatur im Doppelansatz. Der weitere Versuchsablauf entspricht den bereits beschriebenen Prozeduren (s. 2.2.7, 2.2.8, 2.2.10).

2.2.15 Solubilisierung der Phospholipide in unterschiedlichen Chloroform/ Methanol-Gemischen

Geprüft werden neben dem konventionellen Chloroform/ Methanol-Mischungsverhältnis vier zusätzliche, die, wie in der folgenden Tabelle aufgezeigt, zusammengesetzt sind (s. Tabelle 4).

Tabelle 4: Mischungsverhältnisse $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$

<u>Mischungsverhältnis</u> <u>$\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$</u>	<u>CHCl_3 in μl</u>	<u>CH_3OH in μl</u>
1:0	200,0	0
3:1	150,0	50,0
1:1	100,0	100,0
1:3	50,0	150,0
2:1	133,0	67,0

Als Indikator für eine qualitativ bessere Lösung wird eine intensivere Bandenschwärzung des mit der DC-Platte exponierten Röntgenfilmes angenommen (s. 2.2.10). Es können jedoch nur Bandenmuster einzelner Proben miteinander verglichen werden, wenn vorausgesetzt werden kann, dass die Expositionszeit des Röntgenfilmes mit der DC-Platte gleich ist.

Benötigt werden für diesen Versuch fünf HeLa-Zellkulturen, die entsprechend 2.2.1.1 hergestellt und anschließend nach dem in 2.2.11 skizzierten Schema gepoolt verwendet werden. Die PL werden dann in 100,0 µl n-Octyl-β-Glucosid/ Cardiolipin-Lösung gelöst, 20 s gevortext, 15 min bei Rt inkubiert und danach in Eiswasser gestellt. Jetzt sind 350,0 µl des nach 2.2.6 hergestellten Reaktionsansatzes zu den PL und dem Detergens hinzuzupipettieren. Diese Lösung wird dann in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß überführt und zentrifugiert (2 min, 0° C, 4000 rpm (1018 g), Eppendorf Zentrifuge). 400,0 µl des Überstands werden im Anschluss in ein 50,0 ml Polypropylengefäß pipettiert und für 30 min in einem auf 20° C erwärmtem Wasserbad inkubiert. Die Beendigung der enzymatischen Reaktion und die Phasentrennung erfolgt entsprechend dem in 2.2.7 beschriebenen Schema. Die Chloroformphase, inklusive der gelösten PL, wird dann zu jeweils 500,0 µl auf fünf 15,0 ml PP-Gefäße aufgeteilt. Schließlich werden die PL mit N₂ getrocknet. Die chromatographische Separation der PL geschieht analog 2.2.8 mit dem Unterschied, dass jede einzelne PL-Probe in einem jeweils anderen Solubilisationsmedium aufgenommen wurde (s. Tabelle 4). Die Identifikation der PL ist oben beschrieben (s. 2.2.10).

2.2.16 Suche nach ungelösten Phospholipiden

Zwei HeLa-Zellkulturen werden lt. 2.2.1.1 gezüchtet und wie in 2.2.11 beschrieben weiter behandelt. Die PL werden dann in 40,0 µl n-Octyl-β-Glucosid/ Cardiolipin gelöst und analog 2.2.5 weiter verwendet. Dieses Gemisch wird in ein 1,5 ml Eppendorf-Röhrchen überführt, anschließend mit 180,0 µl des lt. 2.2.6 pipettierten Reaktionsansatzes versetzt und zentrifugiert (2 min, 0° C, 4000 rpm (1018 g)). Nach der Zentrifugierung sind ein Sediment und ein Überstand klar zu unterscheiden. Sowohl das Sediment als auch der Überstand werden im weiteren auf ihren Gehalt an PL, insbesondere an DAG, hin untersucht. Je 90,0 µl des Überstandes werden dazu auf zwei 15,0 ml PP-Gefäße verteilt, welche sofort auf Eis zu stellen sind. Das Pellet ist, nachdem der restliche Überstand verworfen worden ist, erneut in 40,0 µl n-Octyl-β-Glucosid/ Cardiolipin-Lösung aufzunehmen, gut zu lösen und wieder mit 180,0 µl des nach 2.2.6 pipettierten Reaktionsansatzes zu mischen. Auch hier werden je 90,0 µl auf zwei 15,0 ml Polypropylen Gefäße verteilt. Es folgen 30 min Inkubationszeit bei 20° C. Das Stoppen der Reaktion und die PL-Extraktion sind gleich den in 2.2.7 erläuterten Arbeitsschritten. Die Separation bzw. die Identifizierung der PL entsprechen 2.2.8 und 2.2.10.

2.2.17 Negativkontrolle

Benötigt werden drei nach 2.2.11 hergestellte Zellkulturen. Die Gewinnung der PL erfolgt lt. 2.2.4 und deren anschließende Aktivierung nach 2.2.5. Proteinbestimmung bzw. Normalisation verlaufen nach 2.2.3 und 2.2.9. Der Reaktionsansatz wird entsprechend 2.2.6 pipettiert und bis zum Einsatz in Eiswasser aufbewahrt. Die drei PL-Proben werden dann wie folgt weiter verwendet (s. Tabelle 5). Eine vierte Probe, die keine zelluläre Komponente enthält, wird in das Experiment miteinbezogen.

Tabelle 5: Negativkontrolle

Probe	Arbeitsschritte
1	Es erfolgt die Zugabe von 80,0 µl des Reaktionsansatzes. Unter Beachtung einer minimalen Kontaktzeit der PL mit der DAG-Kinase wird die Reaktion sofort gestoppt und die PL extrahiert (s. 2.2.7).
2	Die im Detergens gelösten PL werden nach verstrichener Inkubationszeit 10 min in Eiswasser abgekühlt (s. 2.2.5). Die weiteren Schritte entsprechen Probe 1.
3	Zu den im Octyl-β-Glucosid/ Cardiolipin gelösten PL wird vor Zugabe des Reaktionsansatzes 2,0 ml 1:2 CHCl ₃ / CH ₃ OH Gemisch, 1,0 ml 0,2 M NaCl und 2,0 ml CHCl ₃ in das Probenröhrchen pipettiert. Dann werden 80,0 µl Reaktionsansatz hinzugegeben, die Reaktion ohne Karenz gestoppt und die Lipide extrahiert (s. 2.2.7).
4	Probe enthält keine PL. 20,0 µl Detergens werden mit 80,0 µl Reaktionsansatz gemischt und lt. 2.3.7. weiter verwendet (s. 2.2.7)

Die im Anschluss durchgeführte Chromatographie und deren Auswertung entspricht den in 2.2.8 und 2.2.10 gemachten Angaben.

2.2.18 Untersuchung der Substratkonkurrenz zwischen "kaltem" und "heißem" ATP am Enzym DAG-Kinase

Untersucht werden vier unterschiedliche Mengen ATP zwischen 0 und 100 nmol, die mit einer jeweils konstanten Menge ³²P-γ-ATP verglichen werden. 1,0 µl DAG-Lösung (=10 µg Diolelylglycerin) wird je Probe in geeigneten Polypropylenröhrchen mit N₂ gasgetrocknet. Jede der vier PL-Proben wird dann in 20,0 µl Octyl-β-Glucosid/ Cardiolipin gelöst, 20 s gevortext und abschließend 15 min bei Rt inkubiert. Der in 2.2.6 beschriebene Reaktionsansatz wird derart modifiziert, dass er außer ATP-Vorratslösung alle Komponenten enthält. Jetzt werden ATP-Lösungen mit c= 20,0 mM, 10,0 mM und

4,0 mM hergestellt. Dann wird nach dem Pipettierschema der Tabelle 6 vorgegangen und sofort 30 min bei Rt inkubiert.

Tabelle 6: ATP-Versuch

Probe 1	5,0 µl Aqua bidest, 75,0 µl modifizierter Reaktionsansatz
Probe 2	5,0 µl 4,0 mmol ATP, 75,0 µl modifizierter Reaktionsansatz
Probe 3	5,0 µl 10,0 mmol ATP, 75,0 µl modifizierter Reaktionsansatz
Probe 4	5,0 µl 20,0 mmol ATP, 75,0 µl modifizierter Reaktionsansatz

Zu beachten ist, dass der modifizierte Reaktionsansatz als letztes in die Plastikröhrchen pipettiert wird. Das weitere Vorgehen ist den Ausführungen in 2.2.7, 2.2.8 und 2.2.10 zu entnehmen.

2.2.19 Untersuchung aller Bestandteile des Reaktionsansatzes zum Ausschluss möglicher DAG-Kontaminationen

Für alle im Anschluss beschriebenen Versuche wird davon ausgegangen, dass das Enzym DAG-Kinase selbst keiner Kontamination unterliegt. Um durch unsauberes Pipettieren evtl. hervorgerufene Kontaminationen der Reagenzien ausschließen zu können, werden alle Vorratslösungen neu hergestellt (s. 2.1.6.3). In den Experimenten, in denen der aus Imidazol, MgCl₂, NaCl und EGTA zusammengesetzte 2X Reaktionspuffer zu ersetzen ist, wird 0,5 M Mopso als Puffer eingesetzt (s. 2.1.6.3). Größtenteils wird, falls nicht anders ausgewiesen, nur ³²P-γ-ATP als Substrat für die DAG-Kinase eingesetzt. Auf das nicht radioaktive 20,0 mM ATP kann verzichtet werden, da die enzymatische Reaktion trotzdem gut funktioniert.

2.2.19.1 Untersuchung des 20,0 mM ATP und des ³²P-γ-ATP

5,0 µCi der ³²P-γ-ATP-Stammlösung werden ad 15,0 µl A. bidest verdünnt und zu jeweils 6,0 µl auf zwei 15,0 ml Polypropylenröhrchen verteilt, so dass in den Testlösungen 2,0 µCi zur Verfügung stehen. Dies entspricht der in einem lt. 2.2.6 hergestellten Reaktionsansatz üblichen Menge. Die weiteren Pipettierschritte sind folgender Tabelle zu entnehmen (s. Tabelle 7).

Tabelle 7: Kontaminationsausschluß ATP

<u>Testlösung 1</u>	10,0 µl 0,5 M Mopso, pH= 7,0 3,0 µl DAG-Kinase-Lösung 83,0 µl A. bidest
<u>Testlösung 2</u>	10,0 µl 0,5 M Mopso, pH = 7,0 3,0 µl DAG-Kinase-Lösung 77,0 µl A. bidest 6,0 µl 20,0 mM ATP-Vorratslösung

Anmerkung: Die folgenden Arbeitsschritte sind in den Experimenten 2.19.1,2,3,4,5 identisch und werden dort nicht beschrieben.

Anschließend wird 30 min bei Rt inkubiert. Das Stoppen der Reaktion und die PL-Extraktion werden lt.2.2.7 durchgeführt. Die folgende Chromatographie und die PL-Identifizierung sind in 2.2.8 und 2.2.10 beschrieben.

2.2.19.2 Additionsexperiment zum Ausschluss einer DAG-Kontamination

Hinsichtlich einer DAG-Kontamination werden in den nachstehend aufgelisteten Lösungsansätzen im Reaktionsansatz enthaltene Chemikalien überprüft.

Lösungsansatz 1: Test des Puffers,

Lösungsansatz 2: Test des Detergens (Octyl-β-Glucosid/ Cardiolipin-Lösung),

Lösungsansatz 3: Test des 0,02 M DTT.

Pro Lösungsansatz sollen etwa 2,0 µCi zur Verfügung stehen. Dazu wird 1,0 µl der ³²P-γ-ATP-Stammlösung (spez. Aktivität 6000 Ci/ mmol; 270,0 µCi; 25,0 µl) in 49,0 µl A. bidest aufgenommen, so dass eine Verdünnung mit 0,2 µCi/ µl entsteht.

Pipettierung :

Tabelle 8: Additionsexperiment

Lösungsansatz	2X Reaktionspuffer in μl	Detergens in μl	0,02 M DTT Lösung in μl	^{32}P - γ -ATP-Verdünnung in μl	DAG-Kinase Lösung in μl	0,5 M Mopso in μl	A. bidest in μl
1	50,0	0	0	10,0	3,0	10,0	27,0
2	0	0	10,0	10,0	3,0	10,0	67,0
3	0	20,0	0	10,0	3,0	10,0	57,0

2.2.19.3 Subtraktionsexperiment zum Ausschluss einer DAG-Kontamination

Nacheinander wird je ein Bestandteil einer Positivkontrolle, die alle evtl. kontaminierten Chemikalien enthält, weggelassen. Das fehlende Volumen wird durch A. bidest ersetzt. Eine zusätzliche Positivkontrolle, die neben dem 2X Reaktionspuffer 50,0 mM Mopso enthält wird in das Experiment eingebunden, um einen eventuellen Einfluss des Mopso auf den Phosphorylierungsassay mit der DAG-Kinase nachweisen bzw. ausschließen zu können.

Lösungsansatz 1: Positivkontrolle,

Lösungsansatz 2: Test des Detergens (Octyl- β -Glucosid/ Cardiolipin Lösung),

Lösungsansatz 3: Test des Puffers *,

Lösungsansatz 4: Test des DTT,

Lösungsansatz 5: Positivkontrolle mit 50,0 mM Mopso.

Pro Lösungsansatz sollen etwa 2,0 μCi zur Verfügung stehen. Entsprechend wird vorverdünnt:

- 1,5 μl der ^{32}P - γ -ATP-Stammlösung (spez. Aktivität 6000 Ci/ mmol; 270,0 μCi , 25,0 μl),
- 73,5 μl A. bidest.

Pipettierung :

Tabelle 9: Subtraktionsexperiment

Lösungsansatz	Detergens in μl	2X Puffer in μl	0,02 M DTT Lösung in μl	^{32}P - γ -ATP-Verdünnung in μl	DAG-Kinase Lösung in μl	Aquabidest in μl	0,5 M Mopso in μl	0,3 M DTT in μl
1	20,0	50,0	10,0	10,0	3,0	0	0	0
2	0	50,0	10,0	10,0	3,0	20,0	0	0
3	20,0	0	10,0	10,0	3,0	40,0	10,0	0
4	20,0	50,0	0,0	10,0	3,0	5,0	0	0
5	20,0	50,0	0,0	10,0	3,0	10,0	9,3	0,7

* Um eine Katalyse der Reaktion durch die DAG-Kinase gewährleisten zu können, muss der 2X Reaktionspuffer durch ein entsprechendes Äquivalent ersetzt werden. Dafür wird Mopso benutzt, welches im Reaktionsansatz ebenfalls in 50,0 mM Konzentration zur Verfügung steht (s 2.1.6.3).

2.2.19.4 Untersuchung der einzelnen Bestandteile des 2X Reaktionspuffers

Zuerst werden Lösungen mit den einzelnen Bestandteilen des 2X Reaktionspuffers hergestellt. Die Konzentrationen stimmen mit dem in 2.1.6.3 beschriebenen 2X Reaktionspuffer überein. Solvens ist Aquabidest. Anschließend wird für jede Lösung ein pH-Wert von 6,6 eingestellt. Daraus folgen fünf Lösungsansätze mit den jeweiligen Einzelkomponenten und eine Positivkontrolle:

Lösungsansatz 1: 100,0 mM Imidazol,

Lösungsansatz 2: 25,0 mM MgCl_2 ,

Lösungsansatz 3: 100,0 mM NaCl,

Lösungsansatz 4: 2,0 mM EGTA,

Lösungsansatz 5: 2X Reaktionspuffer (Positivkontrolle).

Pro Lösungsansatz soll etwa 1,0 μCi Radioaktivität zur Verfügung stehen. Entsprechend wird vorverdünnt:

- 1,0 μl der ^{32}P - γ -ATP-Stammlösung (spez. Aktivität 6000 Ci/ mmol; 270,0 μCi , 25,0 μl)
- 99,0 μl A. bidest

Pipettierung :

Tabelle 10: Kontaminationsausschluß 2X Reaktionspuffer

Lösungsansatz 1 bis 5	DAG-Kinase Lösung	^{32}P - γ -ATP-Verdünnung	A. bidest
50,0 μl	3,0 μl	10,0 μl	37,0 μl

2.2.19.5 Untersuchung des Cardiolipins als ein mögliches Substrat der DAG-Kinase

Für diesen Versuch werden 10,0 mg Cardiolipin in 2,0 ml Chloroform aufgenommen. Daraus werden sechs Aliquote zu je 300,0 μl entsprechend 1500 μg Cardiolipin Trockensubstanz hergestellt und in 1,5 ml Polypropylen-Gefäßen mit Stickstoff getrocknet. Die Lagerung erfolgt bei -80°C . Im Experiment werden vier PL-Konstellationen folgender Zusammensetzung miteinander verglichen (s. Tabelle 11). Die Menge Cardiolipin Trockensubstanz entspricht dabei der normalerweise in 20,0 μl Detergens gelösten Masse. Die DAG Menge wird willkürlich festgelegt.

Tabelle 11: Massenverhältnisse Cardiolipin und DAG

Konstellation	DAG in μg	Cardiolipin in μg
1	50,0	150,0
2	50,0	0,0
3	0,0	150,0
4	0,0	0,0

Dazu werden folgende Arbeitsschritte durchgeführt:

- Pipettierung von je 5,0 μl DAG-Lösung (=50,0 μg DAG) in zwei von vier Probegefäßen und anschließender N_2 -Trocknung,

- Herstellung von 1,0 mM DETAPAC (10,0 µl 100,0 mM DETAPAC Lösung + 990,0 µl A. bidest),
- Aufnahme eines Aliquots Cardiolipin in 200,0 µl 1,0 mM DETAPAC (somit entspricht die Konzentration 7,5 µg Cardiolipin/ µl 1,0 mM DETAPAC),
- Pipettierung der ^{32}P - γ -ATP-Vorverdünnung (1,0 µl ^{32}P - γ -ATP-Stammlösung, spez. Aktivität 6000 Ci/mmol, 270,0 µCi, 25,0 µl + 99,0 µl A. bidest).

Pipettierung der Testlösungen entsprechend den in Tabelle 12 beschriebenen Konstellationen in Polypropylenteströhrchen.

Pipettierschema:

Anmerkung: Die Nummerierung der Testlösungen in Tabelle 12 und der PL-Konstellationen in Tabelle 11 stimmen überein.

Tabelle 12: Testlösungen Cardiolipinversuch

Test-lösung	2X Puffer in µl	0,02 M DTT-Lösung in µl	DAG-Kinase-Lösung in µl	$\text{P}^{32}\text{-}\gamma\text{-ATP}$ -Vorverdünnung in µl	Cardiolipin in 1,0 mM DETAPAC in µl	getrocknetes DAG in µg	1,0 mM DETAPAC in µl
1	50	10	3	10	20	50,0	0
2	50	10	3	10	0	50,0	20
3	50	10	3	10	20	0	0
4	50	10	3	10	0	0	20

3 Ergebnisse

3.1 Ausschluss bakterieller Störfaktoren

Es stellte sich heraus, dass der in Teil 2 beschriebene Enzymassay nicht die erwarteten Resultate hinsichtlich eines DAG-Anstiegs bei fortschreitender Infektion mit SC301 erbrachte. Eine Infektion mit SC300 zeigte ebenfalls keine positive Reaktion. Diese war jedoch auch nicht zu erwarten, da dieser Stamm nicht das für die Invasionsfähigkeit des SC301 verantwortliche 140 MDa Plasmid pWR 110 enthält. Hieraus ergab sich die Notwendigkeit zu einer systematischen Fehlersuche.

Zuerst musste jetzt überprüft werden, ob eine ausreichende Infektion der HeLa-Zellen, insbesondere mit dem invasiven Stamm SC301, stattgefunden hatte. Dies konnte in insgesamt vier Experimenten hinreichend bestätigt werden. Es zeigte sich, dass mit dem gewählten Infektionsmodus zu allen Messzeitpunkten eine Infektion stattfindet, und die Infektionsrate der HeLa-Zellen mit der Zeit zunimmt.

Des Weiteren war die Frage zu beantworten, welchen DAG-Anteil die Bakterienmembranen von SC300 und SC301 enthalten. Es wurde jedoch in den durchgeführten Versuchen deutlich, dass die für die Infektion einer HeLa-Zellkultur mit $4,5 \times 10^6$ Zellen eingesetzten 9×10^8 Bakterien kein chromatographisch nachweisbares DAG enthalten (Abb. 1).

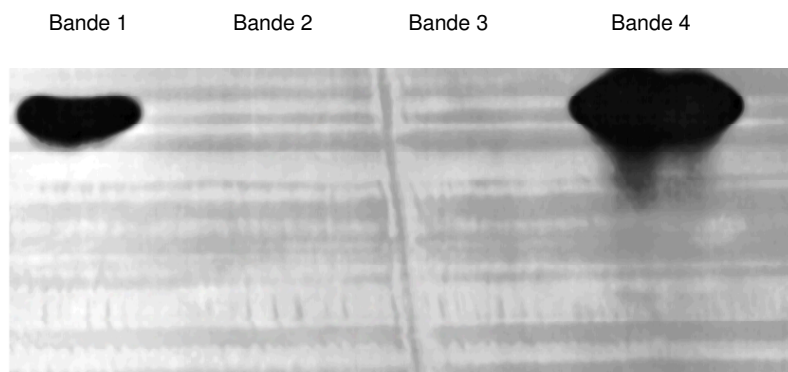


Abb. 1: Bakterienmembran

Abb. 1: Gezeigt ist die chromatographische DAG-Analyse der Membranen einer HeLa-Zellkultur (1), SC300 (2), SC301 (3), DAG-Standard (4)

Auf Höhe des Standards markiert sich für SC300 und SC301 keine Bande. Es findet keine Phosphorylierungsreaktion statt, was durch das nicht vorhandene Enzymsubstrat DAG zu erklären ist. Daraus ist zu schließen, dass die bakteriellen PL-Membranen kein nachweisbares DAG enthalten. In den Membranen der HeLa-Zellen ist aber ein nicht unerheblicher Anteil an DAG auszumachen.

3.2 Charakterisierung des Enzyms DAG-Kinase

3.2.1 Zeitabhängigkeit der DAG-Kinase-Reaktion

Die Phosphorylierung des DAG zu DAG-³²P durch die DAG-Kinase befindet sich bereits am ersten Messzeitpunkt nach 30 min im chemischen Gleichgewicht. Offenbar wird kein weiteres DAG in DAG-³²P umgesetzt, so dass auch nach weiteren 30 Minuten Inkubation am Messzeitpunkt 60 min kein höherer Anteil an DAG-³²P visuell zu registrieren ist. Deutlich wird dies durch die gleiche Intensität der Banden, die direkt mit der Menge des umgesetzten DAG zu DAG-³²P korreliert.

Weiterhin ersichtlich wird, dass selbst ein minimaler Kontakt der Kinase mit ihrem Substrat DAG ausreicht, um eine, wenn auch geringfügige Synthese von DAG-³²P zu garantieren, da sich auch auf Höhe der vermeintlichen Nullprobe eine Bande markiert. Dies verdeutlicht einerseits die hohe Aktivität der Kinase, andererseits wird klar, wie schwer sich die Etablierung einer Nullprobe gestalten würde. Hinsichtlich der notwendigen Inkubationszeit lässt sich folgende Aussage treffen: Eine mehr als 30 Minuten andauernde Reaktionszeit verändert den Anteil des in DAG-³²P umgesetzten DAG nicht (Abb. 2)

Bande 1 Bande 2 Bande 3 Bande 4 Bande 5

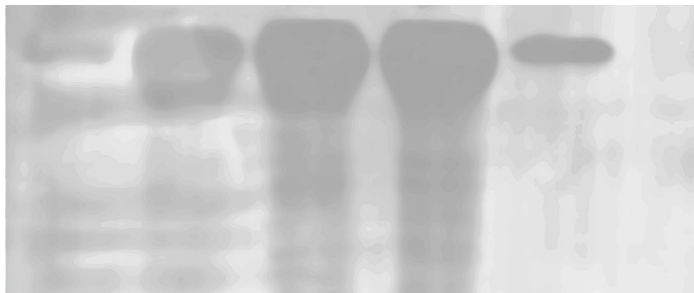


Abb. 2: Zeitabhängigkeit der DAG-Kinase Reaktion

Abb. 2: Die Inkubationszeit steigt von links nach rechts: 0 min (1), 10 min (2), 30 min (3), 60 min (4), DAG Standard (5)

3.2.2 Temperaturabhängigkeit der DAG-Kinase-Reaktion

In Bezug auf die Temperatur ist festzustellen, dass die Aktivität der DAG-Kinase im Bereich zwischen 17° C und 30° C keine Unterschiede aufweist. Die DAG-³²P Ausbeute ist im überprüften Temperaturintervall unter visuellen Maßstäben als identisch anzusehen.

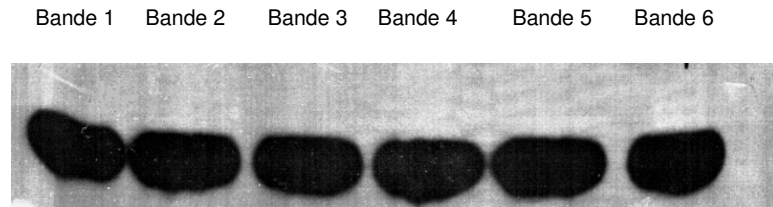


Abb. 3: Temperaturabhängigkeit der DAG-Kinase (17° C, 20° C, 23° C)

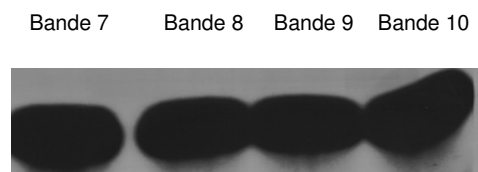


Abb. 4: Temperaturabhängigkeit der DAG-Kinase (25° C, 30° C)

Abb. 3 und 4: Gezeigt ist das Phosphorylierungsprodukt DAG-³²P der DAG-Kinase bei Temperaturen von 17° C (1, 2), 20° C (3, 4), 23° C (5, 6), 25° C (7, 8), 30° C (9, 10)

3.2.3 Abhängigkeit der DAG-Kinase Reaktion von der Ausgangsmenge an Kosubstrat ³²P-γ-ATP

Der Phosphattransfer von ³²P-γ-ATP auf DAG durch die Kinase ist abhängig von der ATP-Konzentration im Reaktionsansatz. Dies konnte gezeigt werden, indem eine konstante Menge von 0,18 nmol ³²P-γ-ATP und 10 µg DAG in jeder Probe des Versuchs zur Verfügung stand. Parallel dazu wurde in den einzelnen Proben die Menge an nicht-radioaktivem ATP gesteigert. In der Abb. 5 ist zu erkennen, dass die Kinase unter ausschließlicher Verwendung von ³²P-γ-ATP als Kosubstrat des Enzyms die größte Menge von an DAG-³²P synthetisiert (Bande 1). Ist dagegen eine Menge von 100 nmol nicht-radioaktivem ATP an der Reaktion beteiligt, kann nur eine sehr geringe Synthese von DAG-³²P nachgewiesen werden, was an der sehr schwachen Bande zu erkennen ist (Bande 4).

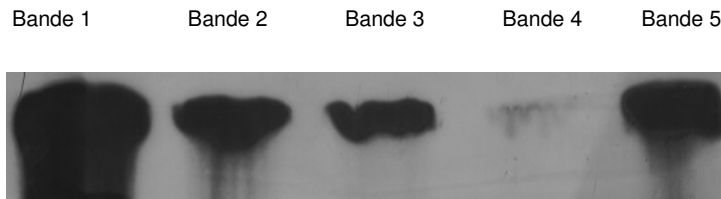


Abb. 5: Phosphattransfer auf DAG in Abhängigkeit von der Menge nicht radioaktiven ATP

Abb. 5: (1) 0,18 nM A, kein B ; (2) 0,18 nM A , 20 nM B ; (3) 0,18 nM A, 50 nM B; (4) 0,18 nM A, 100 nM B; (5) DAG-Standard

A: ^{32}P γ -ATP

B: nicht-radioaktives ATP

3.2.4 Reaktivität der DAG-Kinase

Zur Beantwortung der Frage, unter welchen Bedingungen eine positive Kinasereaktion unmöglich wäre, wurde ein Nullprobenexperiment simuliert. Das bedeutet, dass die Kontaktzeit zwischen Kinase und Substrat minimiert wird. Sie entspricht der benötigten Zeit für das Pipettieren des Stopreagenz und liegt im Bereich von wenigen Sekunden. Zusätzlich wurden Umgebungstemperatur und Temperatur der Reagenzien auf 0° C eingestellt, so dass die Temperatur einen möglichst geringen Einfluss auf die Reaktionsgeschwindigkeit hatte (s. 2.2.17).

Es zeigte sich, dass das Enzym DAG-Kinase eine sehr hohe Kälteresistenz und eine hohe Aktivität besitzt. Es wurde festgestellt, dass im Bereich von 0° C trotz minimaler Kontaktzeit, welche die Pipettierung des Stopreagenz umfasste (s. 2.2.7), noch ein erheblicher Umsatz von DAG zu DAG- ^{32}P stattfand. Wurde jedoch das Chloroform/ Methanol/ 0,2 M NaCl-Stopreagenz vor Zugabe des Reaktionsansatzes und der DAG-Kinase den gelösten PL hinzugegeben, fand keine enzymatische Reaktion statt. Das zeigte sich an der ausbleibenden Bandenbildung nach der chromatographischen Auftrennung und sprach für eine Denaturierung des Enzyms in dem oben beschriebenen organischen Lösungsansatz.

Ein erstaunlicher Zufallsbefund lässt sich aus einer Probe, die nur die Bestandteile des Reaktionsansatzes enthielt, erheben. Dabei zeigte sich eine Bande, die als ein Indiz für eine Kontamination mit DAG im Reaktionsansatz oder im Detergens interpretiert werden kann. Daraus ergibt sich die Notwendigkeit, dieser Vermutung nachzugehen (Abb. 6).

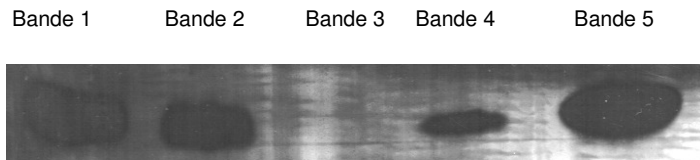


Abb. 6: Negativkontrolle

Abb. 6: Gezeigt ist, dass die Aktivität des Enzyms DAG-Kinase trotz Kältezufuhr noch sehr hoch ist (1, 2). Ein Umgebungsmilieu von Methanol und Chloroform wirkt inhibierend auf das Enzym (3). Spuren von DAG finden sich auch in einer Probe, die nur Reaktionsansatz und Detergens enthält (4). DAG-Standard (5)

3.3 Nachweis einer DAG-Kontamination

Um ausschließen zu können, dass es sich bei der vermuteten Verunreinigung um eine durch unsauberes Arbeiten selbst herbeigeführte Kontamination handelt, wurden vor Beginn der Experimente der 2X Reaktionspuffer, das DTT, das ATP und das Detergens neu hergestellt. Bezüglich der Reinheit des Enzyms musste auf die Angaben des Herstellers vertraut werden, da ein Nachweis einer Enzymkontamination unter den technischen Möglichkeiten des Labors nicht möglich war.

3.3.1 Ausschluss einer Kontamination von ATP und ^{32}P - γ -ATP

In drei durchgeführten Versuchen konnte bestätigt werden, dass weder die 20 mM ATP-Lösung noch die ^{32}P - γ -ATP-Lösung durch DAG kontaminiert waren. In der Abb. 7 zeigt sich auf Höhe des DAG-Standards für die beiden Reagenzien eine negative Reaktion, d.h. es fand sich kein Substrat in Form von DAG für die enzymatische Reaktion der Kinase.

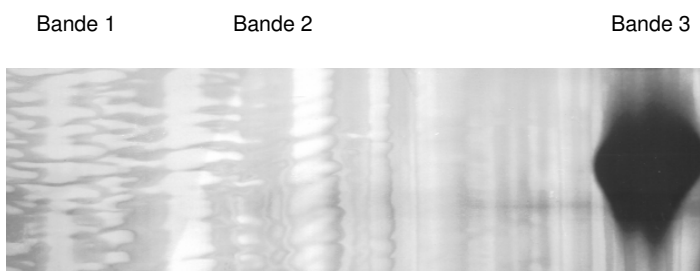


Abb. 7: Kontaminationsausschluss des ATP

Abb. 7: (1) Kinasereaktion mit A und ohne B, (2) Kinasereaktion mit A und B, (3) Standard

A: ^{32}P γ -ATP-Lösung;

B : 20 mM ATP-Lösung

3.3.2 Das Additionsexperiment

Bei dem entsprechend 2.2.19.2 durchgeführten Versuch konnten keine Verunreinigungen eines der Bestandteile des Reaktionsansatzes mit DAG festgestellt werden. In der Abb. 8 sind für die überprüften Reagenzien n-Octyl- β -Glucosid/Cardiolipin, 2X Reaktionspuffer und DTT keine eindeutig positiven Markierungen auf Höhe des DAG zu registrieren, so dass nicht auf eine Kontamination mit DAG rückgeschlossen werden konnte. Die schwach positive Bande des DTT ist am ehesten ein Artefakt. Ein Einfluss auf den Assay als mögliches Substrat der Kinase ist unter Berücksichtigung der nur schwachen Bandenintensität nicht anzunehmen.

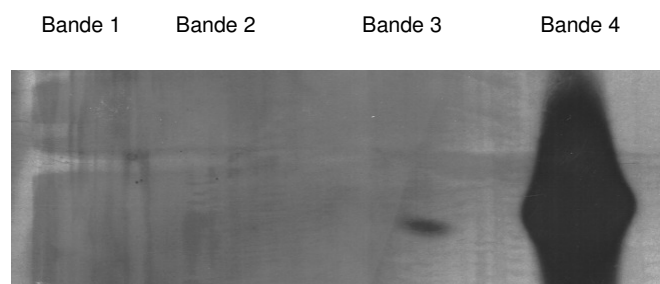


Abb. 8: Additionsexperiment

Abb. 8: (1) n-Octyl- β -Glucosid/ Cardiolipin (Detergens), (2) 2X Reaktionspuffer, (3) DTT, (4) DAG-Standard

3.3.3 Das Subtraktionsexperiment

Aus fünf Experimenten ging hervor, dass bei einer enzymatischen Reaktion in Abwesenheit des Detergens n-Octyl- β -Glucosid/Cardiolipin kein DAG- 32 P nachgewiesen werden konnte. Gleiches galt für eine DAG-Kinase-Reaktion ohne Beteiligung des 2X Reaktionspuffers.

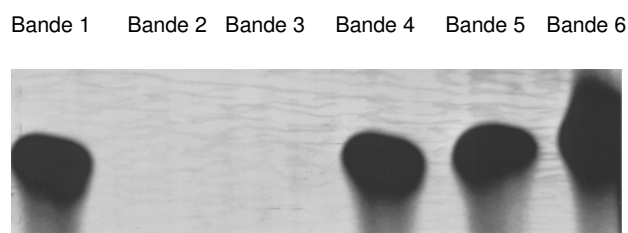


Abb. 9: Subtraktionsexperiment

Abb. 9: Der Positivkontrolle (1) wurden nachfolgende Reagenzien entzogen: (2) Detergens, (3) 2X Reaktionspuffer, (4) DTT, (5) Positivkontrolle mit 50,0 mM Mopso, (6) DAG-Standard

Die Probe 1 in der Abb. 9 zeigt die Positivkontrolle, in der alle Komponenten des Reaktionsansatzes enthalten waren, einen positiven Nachweis für DAG- 32 P. Die Probe 2 war ein Reaktionsansatz ohne Detergens, die Probe 3 enthielt kein 2X Reaktionspuffer. Durch Fehlen des Detergens bzw. des 2X Reaktionspuffers konnte kein DAG durch die Kinase zu DAG- 32 P phosphoryliert werden, was sich im Chromatogramm als eine ausbleibende Bandenbildung widerspiegelt. Aufgrund dieses Befundes konnte nicht ausgeschlossen werden, dass entweder das Detergens n-Octyl- β -Glucosid/Cardiolipin

oder der 2X Reaktionspuffer mit DAG kontaminiert waren. Ebenso war es möglich, dass Einzelkomponenten beider Reagenzien oder aber das Reagenz als Gesamtheit ein mögliches Substrat der DAG-Kinase sind. DTT (Bande 4) zeigte sich als nicht verantwortlich für DAG-Verunreinigungen im Reaktionsansatz. Zum Einen boten die fehlenden Banden in Höhe der DTT enthaltenden Proben 2 und 3 keinen Hinweis darauf. Allerdings ist hier einschränkend zu erwähnen, dass die Kinase in Abwesenheit des Detergens und des Puffers allenfalls eine geringe Aktivität entfalten kann. Zum Zweiten fällt der DAG-³²P-Nachweis in der Probe positiv aus, die kein DTT enthält.

Mopso schien die Phosphorylierung des DAG durch die Kinase nicht zu beeinflussen. So zeigte die Probe, die neben allen Bestandteilen der Positivkontrolle zusätzlich 50,0 mM Mopso enthielt, keinerlei Auffälligkeiten (Bande 5).

3.3.4 Ausschluss einer Kontamination des 2X Reaktionspuffers

Der 2X Reaktionspuffer wurde hinsichtlich einer Verunreinigung mit DAG untersucht. Der Versuchsaufbau richtete sich nach den Angaben lt. 2.2.19. Dabei konnten keine Banden, die für DAG gesprochen hätten, nachgewiesen werden (s. Abb. 10), so dass insgesamt davon auszugehen ist, dass der 2X Reaktionspuffer nicht die Grundlage für eine DAG-Kontamination darstellt. Die schwach positive Reaktion im Falle des 100 mM NaCl ist nicht plausibel, so dass hier ein Artefakt anzunehmen ist.

Bande 1 Bande 2 Bande 3 Bande 4 Bande 5 Bande 5

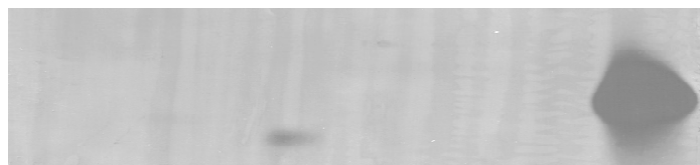


Abb. 10: Kontaminationsausschluss des 2X Reaktionspuffers

Abb. 10: (1) 100 mM Imidazol, (2) 25 mM MgCl₂, (3) 100 mM NaCl, (4) 2,0 mM EGTA, (5) Positivkontrolle= 2X Puffer, (6) DAG-Standard

3.3.5 Nachweis der Kontaminierung des Detergens

Das Detergens wurde nach dem in 2.2.19.5 erklärten Schema aufgetrennt und auf eine etwaige Verunreinigung mit DAG untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass Cardiolipin offenbar ein Substrat der DAG-Kinase ist. Es war eine Bande im Chromatogramm (s. Abb. 11) auf Höhe des DAG-Standards in Probe 3 zu sehen, obwohl in dieser Probe nur Cardiolipin enthalten war. Somit war davon auszugehen, dass Cardiolipin verantwortlich für die aus den vorhergehenden Versuchen vermuteten Verunreinigung des Reaktionsansatzes gewesen ist.

Weiterhin war aus dem qualitativen Vergleich der Banden von Probe 2 und Probe 3 anzunehmen, dass aus den in diesem Versuch eingesetzten 150,0 µg Cardiolipin eine größere Menge an DAG-³²P entsteht als aus 50,0 µg DAG. Sind weder Cardiolipin noch DAG an der Reaktion mit der DAG-Kinase

beteiligt (Probe 4), zeigte sich auf Höhe des DAG-Standards kein Bandenmuster. Damit war in dieser Probe kein Substrat enthalten.

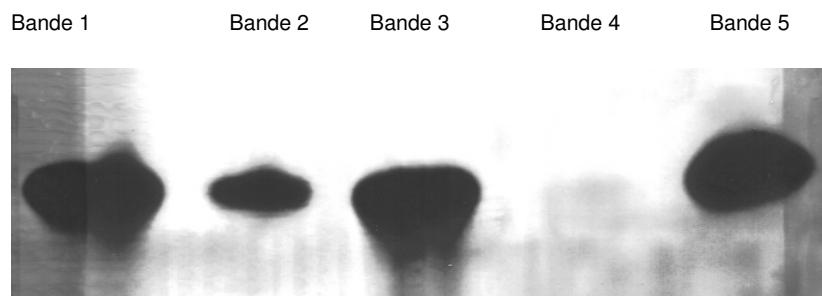


Abb. 11: Cardiolipin als Substrat der DAG-Kinase

Abb. 11: (1) 150 µg Cardiolipin, 50 µg DAG, (2) kein Cardiolipin, 50 µg DAG, (3) 150 µg Cardiolipin, kein DAG, (4) kein DAG, kein Cardiolipin, (5) DAG-Standard

3.4 Aussagen zur Phospholipidfraktion

Vor der chromatographischen Determinierung der mit Stickstoff getrockneten PL mussten diese resubtilisiert werden. Zur Beantwortung der Frage, ob es evtl. ein günstigeres Solubilisationsgemisch als das für die Experimente verwendete 2:1 Chloroform/ Methanol-Gemisch gibt, wurden vier zusätzliche Chloroform/ Methanol-Zusammensetzungen überprüft (s. 2.2.15). Ziel war es, den Anteil der in Lösung gehenden getrockneten PL, speziell des DAG, zu erhöhen.

Die Auswertung im optischen Vergleich ergab keine Unterschiede im Vergleich der verschiedenen Banden auf Höhe des DAG-Standards, die stellvertretend als Maß für die gelösten PL standen. So war nicht davon auszugehen war, dass man die Masse der in Lösung gehenden PL durch Verwendung eines anderen Chloroform/ Methanol-Gemisches relevant verändern könnte.

Die Abb. 12 gibt diesen Sachverhalt wieder. Die Banden zeigen keine visuell fassbaren Unterschiede, was für einen etwa gleichen DAG-³²P Gehalt sprach.

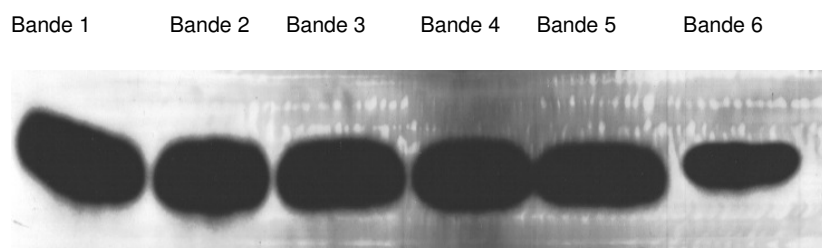


Abb. 12: Einfluss des CHCl₃/ CH₃OH-Mischungsverhältnisses auf die Aktivität der DAG-Kinase

Abb. 12: Bande (1) bis (5) zeigen, dass durch Verwendung eines anderen Solubilisationsgemisches die Ausbeute des DAG-³²P nicht verändert wird. Chloroform/ Methanol-Gemische: (1) 1:3, (2) 3:1, (3) 2:1, (4) 1:1, (5) 1:3, (6) DAG-Standard

In Bezug auf das Spektrum der durch den Assay extrahierten PL wurden ein Überstand und ein Pellet untersucht (s. 2.2.16). Dabei zeigten sich im Pellet neben der DAG-³²P Bande noch vier zusätzliche Banden, die jede für sich für eine weitere PL-Fraktion standen. Eine genaue Charakterisierung dieser PL erfolgte jedoch nicht. Der Überstand ist in Bezug auf die DAG-P-Fraktion als reiner zu bezeichnen. Zusätzliche Banden markieren sich hier nur schwach, was für ein quantitativ geringeres Vorkommen dieser PL spricht. Die Abb. 13 zeigt den Überstand im Vergleich zum Pellet. Die obere Bande entspricht dem DAG-³²P.

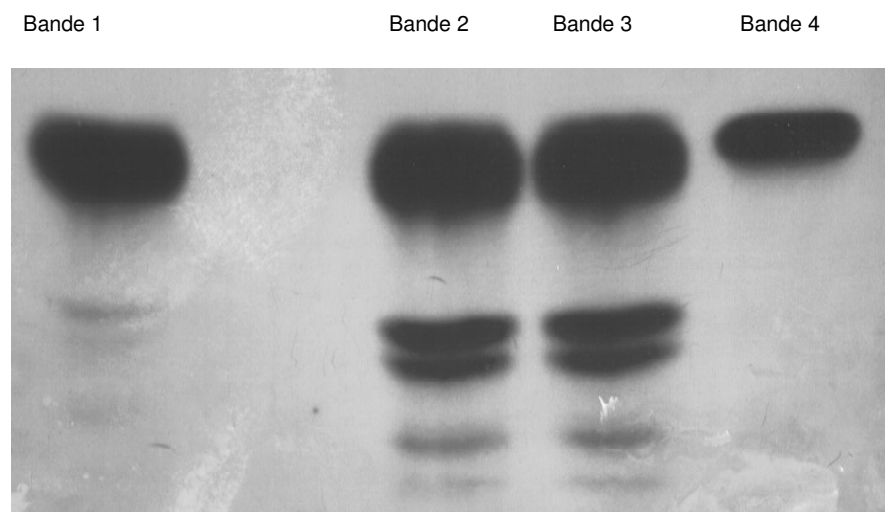


Abb. 13: PL- Fraktionen im Pellet und im Überstand

Abb. 13: PL im Überstand und im Pellet: (1) Überstand, (2) u. (3) Pellet, (4) DAG-Standard

3.5 Infektionskinetik

Cardiolipin wurde wegen des in 3.3.5 geschilderten Sachverhaltes nicht mehr als Detergens benutzt. Ersetzt wurde das ursprüngliche Detergens durch eine 7,5 % n-Octyl- β -Glucosid-Lösung. Solvens war in diesem Fall 1,0 mM DETAPAC.

Aus den Chromatogrammen wurde ersichtlich, dass trotz Beseitigung des Fehlers keine Aussagen zur Kinetik der Infektion von HeLa-Zellen durch SC300 oder durch SC301 zu formulieren waren. So sind im optischen Vergleich der Abbildungen, die den DAG-³²P Gehalt einer infizierten HeLa-Kultur nach null und fünf (s. Abb. 14) bzw. nach 15 und 30 min Infektion (s. Abb. 15) mit SC300 bzw. SC301 wiedergeben, keine deutlichen Unterschiede in der Bandenintensität zu sehen. Der Gehalt an DAG-³²P schien in allen acht Proben einschließlich der Negativkontrolle (Banden 1 und 2 in Abb. 14) gleich zu sein.

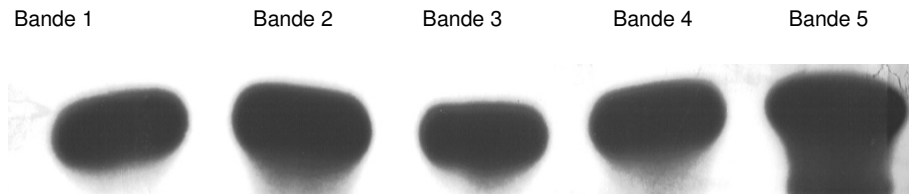


Abb. 14: Infektionskinetik 1

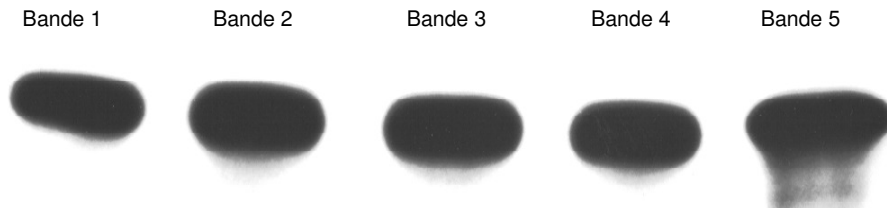


Abb. 15: Infektionskinetik 2

Abb. 14 u. 15: Die Abbildungen zeigen zwei Chromatogramme eines Infektionsexperimentes. Infiziert wurden HeLa-Zellkulturen mit je $4,5 \times 10^6$ Zellen. Untersucht wurde der DAG- ^{32}P Gehalt einer mit SC300 bzw. mit SC301 infizierten Kultur in Abhängigkeit von der Infektionsdauer.

Abb. 14: (1) SC300, 0 min Inf.; (2) SC301, 0 min Inf.; (3) SC300, 5 min Inf.; (4) SC301, 5 min Inf.; (5) DAG-Standard

Abb. 15: (1) SC300, 15 min Inf.; (2) SC301, 15 min Inf.; (3) SC300, 30 min Inf.; (4) SC301, 30 min Inf.; (5) DAG-Standard

4 Diskussion

4.1 Diskussion der Methoden

4.1.1 Zellkulturelle Methodik

Im Vordergrund standen bei der Wahl eines geeigneten zellulären Mediums ein technisch einfach durchführbarer Infektionsmodus sowie eine hohe Effizienz der Zellinvasion durch *E. coli* Flexneri. Mit HeLa-Zellen konnte gezeigt werden, dass sich durch eine 30 min andauernde Inkubation mit Suspensionen von *E. coli* Flexneri, Serovar 2a bzw. 5, eine 95 %ige Infektionsrate erreichen lässt [40, 168]. Es ist jedoch zu berücksichtigen, dass HeLa-Zellen nicht konfluent wachsen und keine tight junctions ausbilden. Des weiteren fehlt die polare Organisation des Zellrasens. Insofern besteht hier eine Differenz gegenüber den in vivo Verhältnissen des Kolons. Hinsichtlich der beabsichtigten Untersuchung des PL-Metabolismus im Rahmen signaltransduktiver Prozesse ist jedoch nur entscheidend, dass es zur Infektion der Zellen kommt. Hierfür sprechen die anhand von HeLa-Zellen gewonnenen indirekten Hinweise auf eine vermehrte zelluläre Invasion durch Shigellen als Folge einer DAG-Akkumulation (T. Adam, E. Far unveröffentlichte Daten).

4.1.2 Infektion

Die Anzahl infizierter Zellen ist unter anderem abhängig von der Konzentration an Bakterien in der zur Infektion verwendeten Bakteriensuspension, vom pH-Wert und von der Temperatur.

Betrachtet man den Verlauf der natürlichen Wachstumskurve von Bakterienpopulationen, invadieren *E. coli* Flexneri Stämme, die sich in der exponentiellen Wachstumsphase befinden, am effizientesten. Verglichen mit Bakterien, die sich vor der Infektion bereits in der stationären Wachstumsphase befinden, zeigt SC301 nach Mounier et al. eine etwa sechsfache intrazelluläre Präsenz, wenn sich die Bakterienkultur vor der Zellinfektion in der exponentiellen Phase befindet [78].

Bei einer Umgebungstemperatur von 37° C ist die Zahl durch Shigella infizierter HeLa-Zellen am höchsten [39], da es bei dieser Temperatur zur Aktivierung des *mxi-spa*-Operons und des *ipa-ipg*-Operons kommt. Konsekutiv werden der Typ III-Sekretionsapparat formiert und die Ipa-Proteine intrabakteriell akkumuliert [71, 89]. Eine nach unten abweichende Temperatur würde dementsprechend die Bildung von Ipa-Proteinen und des Sekretionsapparates verhindern. Höhere Temperaturen führen möglicherweise zur Denaturierung an der Invasion beteiligter Enzyme.

Ipa-Proteinen, insbesondere IpaC und IpaB, wird ein wesentlicher Einfluss auf die Zellinfektion durch Shigella zugeschrieben. Der Komplex aus IpaC und IpaB induziert zum einen die Internalisierung des Bakteriums innerhalb eines entsprechenden Phagosoms. Zum anderen sind beide Proteine an der

anschließenden Lyse des Phagosoms und somit an der intrazellulären Freisetzung der Bakterien beteiligt [89, 169]. De Geyter et al. berichten über eine pH-Wert-abhängige Steuerung dieser Prozesse durch die Ipa-Proteine [170, 171]. Insofern ist auf eine Konstanz der pH-Verhältnisse während der Infektion zu achten.

Wünschenswert ist eine Stagnation sowohl zellulärer als auch bakterieller Stoffwechselreaktionen nach abgeschlossener Inkubation der HeLa-Zellen mit *Shigella*. Durch Aspirieren der infektiösen Bakteriensuspension und nachfolgendes Waschen der Zellkultur mit 1X PBS kann relativ sicher erreicht werden, dass keine weiteren Zellen durch *E. coli* Flexneri infiziert werden.

Schwieriger ist es, die bereits intrazellulär befindlichen, weiter stoffwechselaktiven Bakterien, zu beeinflussen. Das sollte durch Abkühlung des umgebenden Milieus eine Verlangsamung des Metabolismus erreicht werden. Effektiver und letztlich irreversibel ist die unmittelbar folgende Lyse mit 0,2 %igem SDS. Dieses negativ geladene Detergens ist der Sulfatester des Dodekanols und bindet mit seinen hydrophoben Fettsäureanteilen an die lipophilen Abschnitte der Proteine und führt damit zu deren Entfaltung bzw. Denaturierung. Durch diese Schritte ist insgesamt davon auszugehen, dass es zu keiner relevanten DAG-Biosynthese nach Beendigung der Infektion kommt. Die theoretisch vorhandene Restaktivität der beteiligten Enzyme im SDS-Lysat wird durch die sich anschließende Chloroform/Methanol-Extraktion beseitigt.

4.1.3 Isolierung der Phospholipide

Um einen während der Extraktionsschritte wesentlichen Verlust von Lipiden zu vermeiden, wurde das von Bligh et al. vorgeschlagene Mischungsverhältnis von Chloroform, Methanol und wässriger Phase von 1:2:0,8 vor bzw. 2:2:1,8 nach Verdünnung übernommen [172]. Sie fanden in ihren Versuchen heraus, dass genau diese Proportionen eine maximale Lipidausbeute in der Chloroformphase bei gleichzeitig minimalem Lipidgehalt in der polaren Phase garantieren [172]. Abweichungen von diesem Schema hätten eine Durchmischung der Chloroformphase mit Methanol und dem wässrigen Anteil zur Folge. Dadurch käme es zur Verunreinigung mit polaren zellulären Bestandteilen. Das könnte vor allem dann von Nachteil sein, wenn die absolute Masse der Lipide durch Wägung bestimmt werden soll, da sich hier durch den Massenanteil der Nichtlipide, beispielsweise durch Proteine, falsch hohe Werte ergeben könnten. Dieser Effekt kann aber durch das von Preiss et al. entwickelte Verfahren weitestgehend vernachlässigt werden, da hierbei das DAG mittels radioaktiver Markierung durch die DAG-Kinase relativ spezifisch bestimmt werden kann [167]. Der oben beschriebene Verlust von Lipiden, bzw. von DAG in die polare Schicht kann mittels dieses Verfahrens allerdings nicht ausgeschlossen werden. Um einen solchen Verlust verifizieren zu können, wäre es denkbar, jenen sowohl nach der ersten, als auch nach der zweiten Chloroformextraktion hinsichtlich eines signifikanten DAG-Bestandes nach der bei Preiss et al. beschriebenen Methode zu überprüfen [167]. Alternativ ließen sich nicht extrahierte Phospholipide durch Bestimmung des organischen Phosphates nach der von Van Veldhoven et al. skizzierten Methodik bestimmen [173]. Allerdings kann hierdurch nur die Gesamtmenge der PL bestimmt werden. Eine Unterscheidung einzelner PL-Fractionen würde weiterfüh-

rende Untersuchungen erfordern. Beide Methoden sind letztlich sehr arbeitsaufwendig und erscheinen aufgrund der von Bligh et al. gemachten Angaben, die einen Verlust von geringer als ein Prozent in die wässrige Phase beschreiben, nicht gerechtfertigt [172].

Die zweite Chloroformextraktion ist bei der hier verwendeten SDS-Lyse, als obligat anzusehen, da dadurch das restliche SDS aus der Lipidphase gewaschen wird. SDS tritt als Proteininhibitor auf, was sich möglicherweise auf die bei der radioaktiven Markierung des DAG verwendeten DAG-Kinase auswirken könnte.

4.1.4 Solubilisierung der Phospholipide

Voraussetzung für eine enzymatische Reaktion im Bereich von v_{\max} ist die optimale Annäherung des Substrates an das aktive Zentrum des Enzyms. Die DAG-Kinase ist ein amphipathisches Enzym, besitzt also hydrophile und hydrophobe Molekülanteile [174]. Ihr Substrat DAG dagegen ist ein hydrophobes Molekül. Für die Synthese von DAG-P durch die Kinase muss demzufolge ein Reaktionsmilieu vorhanden sein, in welchem hydrophile und hydrophobe Wechselwirkungen mit der DAG-Kinase ausgewogen sind. Gleichzeitig ist die Lösung des ausgesprochen lipophilen Substrates DAG erforderlich. Diese beiden Bedingungen erfüllen gemischte Mizellen.

Erwähnung in der Literatur finden unter anderem die zur Mizellbildung befähigten elektrisch neutralen Detergenzien Triton X-100 (chem. tert-Oktylphenylpolyoxyethylen) und n-Octylglucosid (chem. n-Octyl- β -D-Glucopyranosid) [175-177]. Die Konformation von Proteinen beruht auf hydrophoben Wechselwirkungen. Änderungen des Ladungsmuster im Umgebungsmilieu, die bei elektrisch geladenen Detergenzien entstehen, beeinflussen die räumliche Struktur und führen in der Regel zu einem reversiblen Funktionsverlust des Eiweißes. Die elektrische Neutralität beider Detergenzien ist insofern günstig, da eine Proteindenaturierung respektive Denaturierung der DAG-Kinase insbesondere für n-Octylglucosid ausgeschlossen werden kann [178].

Nachteilig hinsichtlich des Triton X-100 ist die von Gayle et al. beobachtete Phosphorylierung des Triton X-100 in Abwesenheit von DAG durch die Kinase. Allerdings wurde eine Synthese von Triton X-100- ^{32}P nur bei Mangel des eigentlichen Substrates DAG festgestellt. Substratkonkurrenz ist aber aufgrund der im Vergleich 300-fachen Affinität der Kinase für DAG, im Normalfall nicht anzunehmen [176].

Weiterhin ist die relativ niedrige kritische Mizellbildungskonzentration (CMC) des Triton X-100 von 0,24 mM im Vergleich zu der hohen CMC des n-Octylglucosids von 25 mM ungünstig [179, 180]. Die CMC entspricht der Konzentration an Monomeren, ab welcher Mizellen gebildet werden. Unterhalb der CMC zerfallen Mizellen in die Monomere des jeweils verwendeten Detergens. Damit einhergehend ist das Freiwerden der innerhalb der Mizelle gelösten hydrophoben Moleküle, die erst dann als freie Moleküle detektiert werden können. Konkret bedeutet dies, dass eine niedrige CMC hohe Verdünnungsvolumina, die einen Zerfall des Detergens in seine Monomere bedingen, erfordert. Im Gegenzug

kommt es aber zur schnelleren Mizellbildung, was bei speziellen Fragestellungen von Bedeutung sein kann.

In der Konklusion erschien das n-Octylglucosid aufgrund der einfacheren Entfernung nach erfolgter Enzyminkubation bei gleichzeitig vorhandener elektrischer Neutralität als das am besten geeignete Detergens.

Die Mizellbildung lässt sich an der nachlassenden Trübung der Lösung erkennen. Dieses ist durch 15 s Ultraschallapplikation im Wasserbad oder durch 20 s intensives Schütteln mit dem Vortexschüttler zu erreichen. Beide Methoden sind praktikabel und können je nach Verfügbarkeit eingesetzt werden [166, 167].

4.1.5 Enzymatische Reaktion

Die DAG-Synthese durch die DAG-Kinase ist als chemische Reaktion grundsätzlich durch die äußeren Reaktionsbedingungen beeinflussbar. Der Druck entspricht dem Atmosphärendruck und kann als konstant betrachtet werden. Die Reaktionstemperatur sollte wegen der direkt proportionalen Beziehung zur Reaktionsgeschwindigkeit kritisch betrachtet werden. Insbesondere in nicht klimatisierten Räumen besteht eine Varianz der Außentemperatur.

Schneider et al. untersuchten die Substratspezifität der Kinase. Neben DAG sind Ceramid und N-Dodekanoyl-2-Amino-1-Butanol potente Substrate, die ca. ein Drittel der Aktivität des Enzyms im Vergleich zum DAG bedingen können. Interessanterweise wird die zehnfache Menge S-Ceramid gegenüber dem R-Isomer durch die Kinase umgesetzt [176]. Insofern kann nicht ausgeschlossen werden, dass während der Enzyminkubation andere Phospholipide neben DAG durch die Kinase phosphoryliert werden.

Um das Phosphorylierungsprodukt DAG sicher identifizieren zu können, wurde ein radioaktiv markierter DAG-Standard in den Versuchsablauf eingebunden. Insbesondere wurde eventuell gleiches Laufverhalten im Rahmen der chromatographischen Auftrennung von DAG und Ceramid durch eigens dazu durchgeführte Experimente ausgeschlossen.

Essenziell für eine erfolgreiche Enzymreaktion der DAG-Kinase sind Lipidkofaktoren, die eine Aktivierung des Enzyms bedingen. Die Abwesenheit entsprechender Lipide hat eine fehlende Produktsynthese zur Folge. Des weiteren dienen sie als Enzymstabilisatoren und verhindern eine schnelle Inaktivierung des Enzyms als Folge eines negativen Feedback durch das Substrat [177, 181]. Als Kofaktoren werden unter anderem Dioleoylglycerin und Cardiolipin genannt. Cardiolipin gilt als stärkster Enzymaktivator [181]. Spezielle Experimente zur Untersuchung der Substratspezifität mit DAG und Cardiolipin bei sowohl gemeinsamer als auch separater Enzyminkubation im Rahmen dieser Arbeit hatten aber gezeigt, dass Cardiolipin offenbar auch als Substrat der Kinase fungieren kann. Gleichzeitig führt eine Enzyminkubation ohne Beimischung von Cardiolipin in den Reaktionsansatz zur Phosphorylierung des DAG, so dass dessen Identifizierung möglich war (s. Abb. 11). Insofern wurde auf Cardiolipin verzichtet. Hieraus ergeben sich allerdings zwei Risiken:

1. Eine schnelle Inaktivierung der Kinase ist möglich.
2. Im Phospholipidextrakt sind keine geeigneten Lipidkofaktoren, so dass keine Enzymaktivierung stattfindet.

In diesem Zusammenhang ist jedoch anzumerken, dass Walsh et al. für viele Lipide aktivierende Eigenschaften hinsichtlich der DAG-Kinase zeigen konnten [181]. Trotz sicherlich deutlich höherer erforderlicher Konzentrationen entsprechender Lipide im Vergleich zum Cardiolipin, ist ein Lipidkofaktormangel unter Berücksichtigung der vielfältigen Komposition zellulärer Membranen unwahrscheinlich. Für diese Annahme sprechen auch die erfolgreich durchgeführten Enzyminkubationen ohne Cardiolipin im Reaktionsansatz (s. 3.3.5).

4.1.6 Chromatographie und Detektion der Phospholipide

Die Auftrennung der einzelnen PL-Fractionen wurde mittels Dünnschichtchromatographie durchgeführt. Das Prinzip der Chromatographie besteht in der unterschiedlichen Affinität der zu eluierenden Stoffe zur stationären und zur mobilen Phase. Sie ist preiswert und einfach durchführbar.

4.1.7 Auswertung

Die Auswertung der gewonnenen Daten erfolgte in dieser Versuchsreihe rein qualitativ durch visuell vergleichende Begutachtung der Röntgenfilme. Dies erscheint zur Beantwortung der Frage, ob sich der beabsichtigte Versuchsaufbau prinzipiell eignet, ausreichend. Entscheidend ist, dass ein Signal entsteht, denn damit kann klar festgestellt werden, dass das System für die hier beabsichtigten Zwecke geeignet ist. Diese sehr einfache Ergebnisauswertung ist für den Fall kinetischer Betrachtungen, bei denen DAG-Massen in Abhängigkeit von einer vorgegebenen Infektionszeit zu bestimmen sind, nicht mehr ausreichend. Hier könnte das DAG-³²P mittels Flüssigkeitsszintillationsmessung quantifiziert werden, was bei einem hochenergetischen β -Strahler wie ³²P problemlos funktioniert. Auf den DAG-Gehalt der Probe lässt sich dann anhand vorher ermittelter Eichkurven schließen. Verglichen wird der DAG-Gehalt einer mit dem invasiven Stamm SC301 infizierten HeLa-Zellkultur und einer mit dem nicht-invasiven Stamm SC300 infizierten HeLa-Zellkultur. Eine Differenz zugunsten der invasiven Mutante SC301 wäre beweisend für eine DAG-Synthese im Verlauf einer fortschreitenden Infektion.

4.2 Diskussion der Ergebnisse

4.2.1 Theoretische Betrachtungen zur Rolle des Diacylglycerins während der Infektion von Zellkulturen durch *E. coli* Flexneri

Arbeitshypothese der hier vorliegenden Arbeit war, dass die Infektion von HeLa-Zellen mit *E. coli* Flexneri, Stamm SC301, zu einer Erhöhung der DAG-Konzentration führt. Um diese Hypothese untersuchen zu können, wurde der im Teil 2 skizzierte Invasionsassay etabliert. Eine Untermauerung dieser Hypothese gelang allerdings nicht.

Einerseits wäre es möglich, dass keine endogene DAG-Produktion stattfindet. Dagegen sprechen aber die im Labor T. Adam durchgeführten Invasionsexperimente mit SC301 unter Verwendung von Inhibitoren der PLC und der PPH, die eine Synthese von DAG aus Phosphatidsäureestern durch enzymatische Katalyse der PLD und der PPH vermuten lassen.

Andererseits kann es aber sein, dass die Zunahme der DAG-Konzentration nicht nachweisbar ist.

- Ursächlich könnte eine mit dem gewählten Versuchsaufbau nicht erfassbare Kinetik des Konzentrationsanstieges sein. Das heißt, DAG könnte zum einen erst nach 30 min ansteigen und wäre damit außerhalb des hier betrachteten Zeitfensters. Das ist aber eher unwahrscheinlich, da die Infektion, die als Auslöser der Transduktionskaskade anzusehen ist, bereits nach 20 min nahezu komplett vollzogen ist [38]. Eine erhebliche zeitliche Verzögerung der Reaktionskette Infektionsstimulus → PLD-Reaktion → PPH-Reaktion → nachweisbarere DAG-Moleküle wäre ebenso möglich. Dagegen spricht, dass Signaltransduktionen i. d. R. eine schnelle Antwort auf einen Stimulus hin realisieren. Werden beispielsweise Blutplättchen mit Thrombin stimuliert, ist schon nach 30 s ein 2- bis 3-facher DAG-Anstieg regelmäßig zu beobachten [167].
- Wäre mit einer sehr geringen Enzymaktivität der PLD und der PPH, die ja nach unserer Arbeitshypothese als Katalysatoren der DAG-Synthese aus Phosphatidsäureestern angesehen werden, zu kalkulieren, könnte es ebenfalls sein, dass DAG nur in sehr kleinen und eventuell schwer messbaren Mengen entsteht. Dem widerspricht allerdings, dass aufgrund der vorhandenen Kinetikuntersuchungen davon auszugehen ist, dass bei 37 °C Inkubationstemperatur innerhalb von 30 min nach Stimulation eine hohe enzymatische Aktivität entfaltet wird [182, 183]. Hinsichtlich der Messbarkeit ist zu konstatieren, dass mit der gewählten Methodik Stoffmengen im pikomolaren Bereich erkannt werden [166].
- Ebenso ist vorstellbar, dass DAG schon am ersten Messpunkt nach fünf Minuten nicht mehr detektierbar ist. Dieses könnte dadurch bedingt sein, dass DAG in den ersten fünf Minuten nach Infektion der HeLa-Zellkultur mit Shigella ein Maximum durchläuft, welches dann recht schnell abklingt und am Messpunkt wieder die DAG-Werte der Negativkontrolle widerspiegelt. Seishima et al. führten DAG-bezogene Kinetikuntersuchungen mit Pemphigus-IgG stimulierten DJM-1-Zellen durch. Dort zeigte sich ein biphasischer Verlauf des DAG. Eine erste Spitze konnte nach 30 s nachgewiesen werden, gefolgt von einem steilen Abfall innerhalb von zwei Minuten auf

den Ausgangswert und einem erneuten plateauförmigen Anstieg [184]. Diese Resultate führten sie auf eine kombinierte Aktion von PtdIns-PLC und PtdCho-PLC zurück, d. h. der erste Peak ist durch eine PtdIns-, der zweite einschließlich Plateau durch eine PtdCho- spezifische Lipase hervorgerufen [184]. Es ist also denkbar, dass das Zusammenspiel von PLD und PPH einen dem ersten Teil der skizzierten Kinetik entsprechenden DAG-Verlauf hervorrufen kann. Bedingt durch die im Versuchsprotokoll festgelegte Latenzzeit von 5 min bis zur ersten Messung wäre in diesem Fall kein DAG-Anstieg verifizierbar. Wiederum wäre es dann unwahrscheinlich, dass die Phospholipide eine zentrale Rolle im Fortschreiten der Invasion von HeLa-Zellen durch *Shigella* einnehmen, da die Anzahl internalisierter Bakterien auch nach den ersten 5 min kontinuierlich zunimmt. Unter diesem Gesichtspunkt wäre hinsichtlich einer Zellinfektion durch *Shigella* allenfalls eine noch näher zu untersuchende Initiatorfunktion des PL-Stoffwechsels denkbar. Konkret ausschließen ließe sich diese Variante durch engere Messintervalle am Beginn des Invasionsassays.

Wird das DAG sehr schnell metabolisiert, kann infolge der Verstoffwechslung weniger DAG in den Einzelproben nachgewiesen werden.

- Vorstellbar ist eine DAG-Kinase-Aktivität der verwendeten Shigellenstämmen SC300 bzw. SC301. Das Genom von *E. coli* Flexneri ist komplett entschlüsselt. Venkatesan et al. sequenzierten das Virulenzplasmid pWR501 von *E. coli* Flexneri 5a [185]. Insgesamt konnten 293 ORF (open-reading-frames) gefunden werden, 286 hiervon waren dem Genom von *Shigella* zuzuordnen. Die übrigen 7 ORF entsprachen dem aus der Kreuzreaktion mit dem *E. coli* Plasmid pMT999 entstammenden Transposon Tn501. 19% der ORF verschlüsseln bekannte Proteine von *Shigella*, unter anderem Mxi, Spa, Ipa und VirG. Vier ORF zeigten Sequenzhomologien mit bekannten Virulenzvermittelnden Proteinen. Eine DNA-Sequenz der DAG-Kinase wurde allerdings nicht gefunden [185]. Nie et al. verglichen die Sequenz des Bakterienchromosoms von *E. coli* Flexneri 2a und 5b untereinander und mit *E. coli* K12 Stamm MG1655 [186]. Beide *Shigella* Stämme besitzen ein zirkuläres Chromosom von ca. $4,6 \times 10^6$ Basenpaaren. Das Chromosom von *E. coli* Flexneri 5b ist etwas kürzer, was durch eine Deletion des Oberflächenantigens SHI-1 bedingt ist. Die Genomsequenz beider Stämme ist zu 97 % identisch. 74 % des Proteoms stimmen mit dem Proteom des *E. coli* K12 Stammes MG1655 überein. Die *Shigella* Flexneri Stämme 2 a und 5 b weisen beide in ihrem Genom ein DAG-Kinase Gen auf [186, 187].
- Des Weiteren sind bisher zehn Isoformen der DAG-Kinase bei Mammaliern bekannt, die in fünf Subklassen unterteilt werden [188, 189]. Neben den klassischen Isoformen sind durch alternatives Spleißen entstandene Varianten der β -, γ -, δ -, η -, ι - und ξ -Formen bekannt [189]. Hier ist eine Metabolisierung in den für den Assay benutzten HeLa-Zellen durchaus vorstellbar. Relativ wenig bekannt ist über die kürzlich entdeckte κ -Isoform. Man nimmt für dieses in der Membranfraktion lokalisierte Enzym eine regulative Funktion im Zusammenhang mit oxidativem Stress an [190]. Gut untersucht sind die Isoformen α und ζ . Die DAG-Kinase α , eine Klasse 1-Isoform, ist die am meisten vorkommende Isoform in T-Lymphozyten. Nach Aktivierung des T-Zell-Rezeptors erfolgt eine Tyrosinkinase- und Calcium-abhängige Translokation des Enzyms vom Zytosol zur Plasmamembran [191]. In negativer Korrelation mit der gesteigerten Kinaseaktivität in der Plasma-

membran befindet sich die Aktivität des G-Proteins Ras. Dieser Umstand ist durch die nachlassende Aktivität des GTP-Austauschproteins Ras-GRP bedingt. Ras-GRP wird durch Bindung von DAG in der C1-Domäne des Proteins aktiviert. Die zunehmende Synthese von Phosphatidsäure durch die DAG-Kinase führt allerdings zum Mangel an DAG. In der Folge wird das inaktive Ras-GRP aus der Membranfraktion ins Zytosol transloziert [192]. Die DAG-Kinase ζ , eine unter anderem im Zellkern vorkommende DAG-Kinase, wird durch Phosphorylierung infolge der PKC α -Aktivität inaktiviert und konsekutiv aus dem Nukleus transloziert. Dadurch kommt es zur Abnahme der intranukleären DAG-Konzentration, wodurch zellproliferative Prozesse beeinflusst werden [193, 194].

- Waggoner et al. beschrieben eine in vielen humanen Geweben nachweisbare Phospholipidkinase. Ungewöhnlich ist die für tierische Zellen fehlende Substratspezifität. So konnte eine Phosphorylierungspotenz der Kinase gegenüber DAG, Ceramid und Monoacylglycerin gezeigt werden. Dieser Fakt ergab den Namen Multisubstrat-Lipidkinase (MuLK). Möglicherweise ist DAG aber das bevorzugte Substrat, so zeigte MuLK gegenüber DAG die höchste v_{\max} [195]. Die Aktivität der MuLK ließ sich durch Membrankomponenten wie Cardiolipin und ionischen Zusätze (Ca^{2+} , Mg^{2+}) modulieren, so dass die bevorzugte Substratspezifität möglicherweise vom Umgebungsmilieu bzw. der jeweiligen zellulären Lokalisation abhängt [195].
- Wurden Endothelzellen mittels Acetylcholin stimuliert, konnte eine Freisetzung von Arachidonsäure aus Phosphatidylcholin und Phosphatidylethanolamin beobachtet werden. Involviert in diesen Stoffwechselfpfad ist die DAG-Lipase, die mittels Hydrolyse 2-Arachidonyl-Glycerin und Arachidonsäure synthetisiert [196]. Eine Abspaltung der Carbonsäuren via Diglycerin- bzw. Monoglycerin-Lipase führt zur Bildung von Glycerin, das unter anderem in die Glycolyse eingeschleust werden könnte.
- Cardiolipin, welches ein häufiger Bestandteil bakterieller Membranen ist, entsteht in einem mehrstufigen Syntheseprozess aus CDP-DAG und α -Glycerophosphat und wäre eine andere denkbare Variante.

Zur Überprüfung dieser theoretischen Varianten wäre der Einsatz von entsprechenden spezifischen Enzyminhibitoren denkbar. Damit könnte ein vorzeitiger Abbau des DAG durch die o. g. Enzyme verhindert werden. Bei der Verwendung von Enzyminhibitoren muss aber berücksichtigt werden, dass der Einsatz solcher Hemmer unerwünschte direkte und indirekte Einflüsse auf andere Stoffwechselwege ausüben können. So könnte die Verwendung des DAG-Kinase Inhibitors R59949 eine Akkumulierung von DAG und eine Verminderung von Phosphatidsäure bedeuten. DAG wiederum ist neben Ca^{2+} und Phosphatidylserin als potenter Aktivator der PKC, insbesondere der konventionellen Isoformen PKC α, β, γ , bekannt [197]. Die PKC ihrerseits wird mehrfach als Aktivator der PLD erwähnt [134].

4.2.2 Biomembranen als Ressourcen

Um eine Aussage über mögliche Einflüsse der in den Bakterienmembranen vorhandenen Substratmengen für die DAG-Kinase formulieren zu können, wurde in eigens dazu hergestellten Bakteriensus-

pensionen nach DAG gefahndet. Dieser Test fiel für die im Rahmen der Infektionsexperimente verwendeten Bakterienzahl pro HeLa-Zellkultur (9×10^8 Bakterien) negativ aus. Dies bedeutet, dass sich kein Substrat für die DAG-Kinase in den Membranen von SC300 und SC301 mit der in der vorliegenden Arbeit benutzten Methode nachweisen lässt. Auch hier gibt es zwei mögliche Varianten:

- In den Membranen kommt kein oder wenig DAG vor.
- Das vorhandene DAG lässt sich nicht nachweisen.

In diesem Fall ist aber die erste Möglichkeit wahrscheinlich, da erstens die prinzipielle Funktionsfähigkeit des Versuchs im Falle einer positiven DAG-Probe durch eigene Experimente unter den hiesigen Bedingungen mehrfach nachgewiesen wurde. Deshalb wäre auch im Falle einer signifikanten DAG-Akkumulation in bakteriellen Membranen ein positiver Bandennachweis zu erwarten gewesen.

Zweitens ist DAG bisher nicht als relevanter Strukturbaustein bakterieller Membranen beschrieben. Raetz et al. konnten einen Anteil von 0,5 % in den Membranen des *E. coli* Wildtyps nachweisen [198]. Dies erscheint zunächst verwunderlich, wenn man bedenkt, dass Phosphatidsäure die entscheidende Vorstufe für die Synthese aller PL in Bakterien darstellt [199]. Zusätzlich kann Phosphatidsäure durch die DAG-Kinase von *E. coli* aus DAG synthetisiert werden [200, 201]. Dieser stellt jedoch allenfalls eine Nebenroute dar. Der Hauptweg ergibt sich aus der 2-Schritt-Alkylierung von α -Glycerophosphat durch eine Transferase [202].

Betrachtet man die Zusammensetzung der Membranen von *E. coli* genauer, lässt sich zeigen, dass Phosphatidylethanolamin (Ptdetn) den Hauptanteil am PL-Gesamtpool mit 70 bis 80 % bildet. Phosphatidylglycerol (PtdG) ist mit 15 bis 20 %, Cardiolipin mit maximal 5 % vertreten [203, 204]. Wesentliche Unterschiede in der Phospholipidzusammensetzung zwischen der inneren und äußeren Membran bestehen nicht. Der Anteil der äußeren Membran am Gesamtpool der PL ist mit 60 % allerdings höher. Weitere Unterschiede sind die komplexere Proteinvielfalt der inneren Membran, u. a. Syntheseproteine, Transportproteine sowie Enzyme der ATP-Generierung und die nur in der äußeren Membran gramnegativer Bakterien vorkommenden Lipopolysaccharide [205].

DAG ist eine Struktureinheit der aufgezählten PL. Es wäre also denkbar, dass durch enzymatischen Umsatz unspezifischer oder spezifischer Esterasen DAG anfällt. Ptdetn als wichtigstes PL ist sehr stabil und zeigt lediglich eine Fluktuation von 5 % je Generation [204]. Es ist daher nicht als Quelle für DAG beispielsweise durch eine Esterhydrolyse am C₃-Atom vorstellbar. PtdG dagegen hätte mit 25 % Umsatz zu DAG und Glycerophosphat innerhalb einer Generationszeit das Potenzial, eventuell nachweisbare DAG-Mengen hervorzubringen. Diese beiden Metabolite werden aber von *E. coli* in anderen Stoffwechselreaktionen weiterverwendet. Das DAG wird zur Lipoproteinsynthese, das Glycerophosphat zur Synthese sogen. MDO (engl.: membrane-derived-oligosaccharides) benötigt. Die MDO sind eine erstmals 1973 von van Golde et al. beschriebene negativ geladene Substanzklasse aus acht bis zehn verzweigten, mit Glycerophosphat oder Phosphoethanolamin veresterten Glucosemolekülen. Sie kommen im periplasmatischen Raum vor und werden mit osmoregulatorischer Anpassung von *E. coli* an das Umgebungsmilieu in Zusammenhang gebracht [206, 207].

Obwohl in den durchgeführten Experimenten mit *Shigella* gearbeitet wurde, ist es aufgrund der bei Pupo et al. aufgezeigten Parallelen von *E. coli* und *Shigella* zulässig, dass die hinsichtlich der Membranzusammensetzung an Kolibakterien gewonnenen Erkenntnisse auf *Shigella* übertragen werden können [4].

4.2.3 Verlängerte Inkubationszeiten ergeben keine höhere DAG-Utilisation

Die Phosphorylierung von DAG durch die DAG-Kinase verlief als Funktion der Zeit. Innerhalb der ersten 30 Minuten ließ sich eine ansteigende Menge an radioaktiv markierter Phosphatidsäure nachweisen. Eine verlängerte Enzyminkubation auf 60 Minuten ergab im visuellen Vergleich keine zusätzliche DAG-P Synthese. Das stimmt mit dem von Kennerly et al. beschriebenen Sachverhalt überein, die während ihrer kinetischen Untersuchungen feststellen konnten, dass die DAG-P Synthese aus mittels Säulenchromatographie gereinigten DAG-Extrakten roter Blutzellen über die ersten 15 min linear anstieg und nachfolgend abflachte. Zwischen der dreißigsten und sechzigsten Minute betrug die Phosphorylierungsrate gerade einmal 20 bis 25 % des Ausgangswertes [208]. Als Grund vermuteten sie Inaktivierung der Kinase durch enzyminhibitorische Effekte des $MgCl_2$ und des Detergens Cuts-cum.

Die für die Enzyminkubation eingesetzten $MgCl_2$ -Mengen lagen jedoch mit 12,5 mM im Reaktionsansatz deutlich unter denen von o. g. Autoren als enzymbehindernd genannten Konzentrationen, die jenseits der 30 mM lagen. Walsh et al. schrieben dem ionisierten Mg^{2+} oberhalb 5,0 mM eine aktivitätssteigernde Komponente durch direkte Interaktion mit der Kinase zu, die zwischen 10 und 20 mM maximal wird und dann abebbt [175]. Insofern ist $MgCl_2$ als mitverantwortlicher Faktor für den Aktivitätsverlust der Kinase weitestgehend auszuschließen. Für eine Inaktivierung des Enzyms durch das Detergens n-Octylglucosid, durch freies ATP und weitere Bestandteile des Reaktionsansatzes boten sich keine Hinweise.

Weiterhin zu berücksichtigen ist die Reaktionswärme. Hinsichtlich einer möglichen Inaktivierung des Proteins ist bekannt, dass 37° C Umgebungstemperatur zu einer 50 %-igen Inaktivierung der Kinase innerhalb von 30 min führen [181]. Bei der für unsere Experimente gültigen Reaktionstemperatur von 25° C verlängert sich die Inaktivationshalbwertszeit auf 70 min, so dass von einem stabileren Enzym und somit von einer über die Reaktionszeit konstanten Aktivität ausgegangen werden kann [175].

Daraus ergibt sich aber gleichzeitig, dass hier ein anderes Phänomen für die Stagnation der DAG-³²P Synthese nach 30 Minuten verantwortlich gemacht werden muss. Untersuchungen mit Derivaten des sn-1,2-Diacylglycerol zeigten, dass sich die Kettenlänge der Carbonsäuren und die Modifikationen der sn-2-Veresterung nicht auf die Maximalgeschwindigkeit v_{max} , sondern vielmehr steigernd auf die Michaeliskonstante K_M auswirkten. Veränderungen des sn-1-Esters, des sn-3-Methylens und der sn-3-Hydroxylgruppe wirken hingegen hemmend auf v_{max} und zeigen kaum Einfluss auf K_M , so dass sie als nicht-kompetitive Antagonisten die Aktivität beeinflussen können [209]. So ist es vorstellbar, dass die verschiedenen Lipidfraktionen der Membranextrakte auch solche inhibitorischen Derivate des DAG aufweisen. Diese könnten dann die abnehmende Aktivität der DAG-Kinase bedingen.

DAG ist daneben als Inaktivator der DAG-Kinase beschrieben. Die Inaktivierung verläuft nach einer Kinetik erster Ordnung, d. h. ausschließlich die Substratmenge bestimmt den Grad der Inaktivierung [181]. Auch wenn sich MgATP und einige Lipidaktivatoren wie Phospholipide, Sulfolipide oder auch Neutralfette protektiv auswirken [181], sind Inaktivierung und Inhibition der Kinase die wahrscheinliche Ursache für die allenfalls nichtsignifikante DAG-P Genese nach 30 Minuten.

Mögliche pH-Wert-Verschiebungen im Bereich von 6,5 bis 7,5 im Reaktionsansatz sollten angesichts der nur geringen Auswirkungen des pH-Wertes auf die DAG-Phosphorylierung ohne Bedeutung für die beobachtete Abnahme der katalytischen Aktivität sein [208].

Selbstverständlich ist auch Substratmangel in einem kausalen Kontext mit der herabgesetzten Enzymaktivität zu sehen. In dem zur Bearbeitung der Aufgabenstellung gewählten Assay ist die Gesamtaktivität der Kinase auf die einzelnen Mizellen konzentriert und abhängig vom DAG-Angebot vor Ort, welches jedoch ausreicht und die Aktivität nicht limitiert [175].

4.2.4 Inkubationstemperatur unter Berücksichtigung enzymkinetischer Aspekte

Ungewöhnlich erscheint unter Berücksichtigung des bereits von Arrhenius beschriebenen Prinzips, wonach eine exponentielle Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Reaktionstemperatur besteht ($RG \sim e^{-\delta G/RT}$), dass trotz Temperaturdifferenz von 13 K kein vermehrter Umsatz von DAG zu DAG-P beobachtet werden konnte (s. 3.2.2). Insbesondere erscheint dies unter Berücksichtigung der weiteren Annäherung an das Temperaturoptimum von 37° C ungewöhnlich [210]. Dieses kann damit zusammenhängen, dass sich die Reaktion bereits bei 17° C Inkubationstemperatur im chemischen Gleichgewicht befindet, d. h. die Geschwindigkeit der Hinreaktion und Rückreaktion befinden sich auf gleichem Niveau. Es findet demnach keine Nettoproduktion von DAG-P statt.

Eine andere Variante zur Erklärung wäre, dass das Enzym aufgrund der Distanz zwischen der im Versuch festgeschriebenen und der optimalen Temperatur nur einen Teil seiner vollen Aktivität entfalten kann. Das ist aber wegen der Herstellerangaben nicht nachvollziehbar, weil danach bei 25° C und pH=6,85 12 Units pro mg Protein umgesetzt werden. Bezogen auf die in einer Probe befindlichen Enzymmenge von 2,5 µg ergäbe sich ein Minutenumsatz von 0,03 µmol DAG, was 18,6 µg Diolelylglycerol gleichkommt. 90 % der maximalen Umsatzgeschwindigkeit können bei einer 10-fachen, bzw. 99 % bei einer 100-fachen Substratkonzentration bezogen auf die Michaeliskonstante K_M erreicht werden, die bei 25° C 0,92 mol% beträgt [175]. Aus der molaren Masse des Diolelylglycerols von 620 g/ Mol folgt, dass der K_M -Wert einer Substratkonzentration von 5,7 µg/ µl DAG entspricht. Dementsprechend wären bei zehnfachen DAG-Konzentrationen von 57,0 µg/ µl im Reaktionsansatz (=90% Enzymaktivität) lediglich 10,8 U pro mg DAG-Kinase erreichbar. Insofern ist die Substratkonzentration, nicht die Enzymaktivität, als limitierender Faktor einzuschätzen.

Temperatursteigerungen über 25° C sind allerdings nur wenig einflussnehmend auf die DAG-Ausbeute und führen stattdessen zur nachteiligen Inaktivierung des Enzyms infolge von Denaturierungsprozessen, so dass die Enzymaktivität im Verlauf der 30 min Inkubation stark abfällt und den Vorteil der an-

fänglich höheren Umsatzrate von DAG zu DAG-P, die bis 28 $\mu\text{mol}/\text{min}$ betragen kann, aufhebt [209]. In diesem Sinn sind die suboptimalen Temperaturen der Kompromiss zugunsten einer möglichst langen katalytischen Tätigkeit der Kinase.

Das in den Abb. 3 und Abb. 4 im Ergebnisteil dargestellte Resultat ist in Bezug auf die kinetischen Daten so zu verstehen, dass die Enzymaktivität im suboptimalen Temperaturbereich vermutlich gleich ist. Die Inaktivierung des Enzyms scheint erst in Temperaturbereichen jenseits der 30° C bzw. bei erheblich verlängerter Inkubationszeit wichtig zu werden.

4.2.5 Interaktionen zwischen ATP und ^{32}P - γ -ATP als Kosubstrate der DAG-Kinase

Wurden 10,0 μg sn-1,2-Diolelylglycerol mit konstanten Mengen ^{32}P - γ -ATP und ansteigenden Mengen nichtradioaktiven ATPs mit der DAG-Kinase für 30 min inkubiert, zeigte sich eine negative Korrelation zwischen der verwendeten Menge nichtradioaktiven ATPs und der Synthese des radioaktiven DAG- ^{32}P . MgATP ist ein negativ geladener Metallionkomplex, welcher sich in der Anwesenheit freier Mg^{2+} -Ionen bei annähernd neutralen pH-Werten bildet. MgATP ist ein direktes Substrat der DAG-Kinase. Es wird in Anwesenheit von DAG durch direkten Phosphattransfer zu MgADP umgesetzt [211]. Insofern kann angenommen werden, dass es zur Konkurrenz zwischen Mg^{32}P - γ -ATP und nicht-radioaktivem MgATP um Bindungsplätze innerhalb des aktiven Enzymzentrums kommt. Die Phosphorylierung des DAG bzw. die DAG-P-Synthese fände hierbei im gleichen Ausmaß statt, sie ist aber wegen des verminderten Einbaus des ^{32}P -Isotops in das DAG-P auf dem Röntgenfilm nicht sichtbar.

Badola und Sanders beschreiben einen Faktor α , der die Michaeliskonstante K_M so korrigiert, dass die gegenseitige Beeinflussung von DAG und MgATP berücksichtigt wird. Die durch den Faktor α korrigierte Michaeliskonstante K_M beträgt $0,58 \pm 0,25$ mM [211].

Im Experiment 3.2.3 konnte gezeigt werden, dass höhere Mengen nicht-radioaktiven ATPs bei konstanter Menge radioaktiven ATPs nach 30 min Inkubation von 10 μg DAG mit der DAG-Kinase zu einer verminderten Synthese von DAG- ^{32}P führen. Das zeigte sich anhand der schwächeren Bandenintensität im Chromatogramm (s. Abb. 5). Nimmt man die von Badola und Sanders angegebene Michaeliskonstante $K_M = 0,58$ mM zur Grundlage, müssten 0,29 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ATP für das Erreichen der halbmaximalen Geschwindigkeit der Kinasereaktion zur Verfügung stehen [211]. Unter der Annahme, dass ATP als Substratkonzentration in die von Michaelis und Menten aufgezeigte Funktion zwischen Substratkonzentration und Reaktionsgeschwindigkeit eingetragen wird, ist die ausschließlich ^{32}P - γ -ATP enthaltende Probe am weitesten links zu suchen, was letztlich eine geringe Reaktionsgeschwindigkeit bedeutet. In den weiteren Proben wird mit ansteigenden Mengen von nicht-radioaktivem ATP kombiniert, so dass aufgrund größerer Substratmengen höhere Umsatzgeschwindigkeiten im Vergleich zur alleinigen Verwendung von ^{32}P - γ -ATP erreicht werden. Allerdings sind die vermehrten Syntheseraten zu Ungunsten des radioaktiv markierten Phosphatids. Das ist wiederum dadurch begründet, dass die Stoffmenge "kaltes" ATP 111 bis 555 mal größer ist. Dieser Umstand kommt vor allem dann zum Tragen, wenn DAG als Reaktionspartner nur in geringer Konzentration vorkommt. Dann ist

natürlich auch die Zahl enzymatischer Reaktionen begrenzt und wegen des ungleichen Mengenverhältnisses stehen die "kalten" Phosphorylierungen im Vordergrund, was sich letztlich in der nachlassenden Bandenintensität ausdrückt. Ist DAG dagegen im Sättigungsbereich vorhanden, werden absolut mehr radioaktive Phosphate auf DAG übertragen, wobei sich das Verhältnis "heiße" zu "kalte" Phosphorylierung nicht ändert. Dies hängt ursprünglich mit der höheren Zahl ablaufender Reaktionen zusammen, so dass auch zahlenmäßig mehr radioaktives Phosphat mit DAG verestert werden kann (Abb. 5).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit war dieses Ergebnis vor allem für die Kontaminationsversuche verwertbar, da es sich hierbei um Ausschlussresultate handelte. Der Vorteil liegt in der Verwendung geringerer Mengen ^{32}P - γ -ATP, der hauptsächlich arbeitsschutztechnisch und preislich zu sehen ist. Der Nachteil der langsamen Reaktionsgeschwindigkeit sollte hierbei durch die relativ lange Inkubationszeit in Bezug auf die erwarteten Reaktionsprodukte kompensiert werden.

4.2.6 Cardiolipin ist ein Kofaktor und Substrat der DAG-Kinase

Im Abschnitt 3.2.4 des Ergebnisteils ist beschrieben, dass ohne das Enzymsubstrat DAG eine Bande auf dem Röntgenfilm nachweisbar ist (s.3.2.4, Abb. 6). Dieser Zufallsbefund kann in zweierlei Weise gedeutet werden:

Erstens kann dieses Phänomen durch einen Artefakt bedingt sein. Loomis und Walsh gehen allerdings von einem maximal 2%-igen Hintergrundanteil an der messbaren Gesamtaktivität aus, d. h. 98 % sind tatsächlich entstandenem DAG-P zuzuordnen [174]. Auch wenn hier im Gegensatz zu den genannten Autoren nur der visuelle Vergleich herangezogen wurde, erscheint die gesehene Bande relativ zum DAG-Standard (50 μg) und den Proben 1 und 2 (Membranpräparation von $4,5 \times 10^6$ Zellen) stärker als der o.g. Prozentsatz, so dass nicht nur Hintergrund zu vermuten ist.

Zweitens kann tatsächlich DAG-P entstehen. Das würde den Verdacht auf eine unbekanntes DAG-Ressource, am ehesten bedingt durch eine Kontaminierung des Reaktionsansatzes oder des Detergens, lenken. Dafür kamen zahlreiche Analoga des sn-1,2-DAG in Frage, da sie von der Kinase mit jeweils unterschiedlicher Affinität als mögliche Substrate phosphoryliert werden können [209]. Aufgrund des unterschiedlichen chromatographischen Laufverhaltens im Vergleich zum Standard sn-1,2-Diolelylglycerol kann durch Vergleich der Rf-Werte schon ein Großteil der potenziellen Enzymsubstrate ausgeschlossen werden [209]. Da zusätzlich eine Verunreinigung, beispielsweise durch unsaubere Arbeitsweise, möglich war, wurden alle Reagenzien neu hergestellt und die bis dahin verwendeten verworfen. Die separate Analyse der an der Enzymreaktion beteiligten Einzelkomponenten ließ keinen Rückschluss auf endogen vorkommendes Enzymsubstrat zu (s. Abschnitt 3.3, Abb. 7, Abb. 8).

Wurden einer Positivkontrolle einzeln die Substrate des Reaktionsansatzes (Detergens, 2X Puffer, DTT) entzogen, zeigte sich jedoch, dass keine dem DAG entsprechende Bande in den Proben ohne 2X Puffer oder Octyl- β -Glucosid/Cardiolipin nach Dünnschichtchromatographie und Filmexposition sichtbar wurde (s. 3.3.3, Abb. 9). Das konnte heißen, dass der verwendete 2X Puffer oder das Deter-

gens mögliche Substrate des Enzyms darstellen. Der 2X Puffer bzw. eines seiner Bestandteile war als Substratquelle unwahrscheinlich. Dementsprechend fiel der Nachweisversuch auch negativ aus (s. 3.3.4, Abb. 10).

Wie war die negative Kinasereaktion nach Weglassen des Puffers dann zu erklären? Verbunden mit dem fehlenden Puffer hätten pH-Wert-Instabilitäten auftreten können, die sich dann eventuell aktivitätsmindernd auswirkten. Entscheidender ist jedoch der Fakt, dass im Puffer unter anderem 25,0 mM MgCl_2 gelöst sind. In Lösung dissoziiert das Salz Magnesiumdichlorid in die ionischen Komponenten. Die freiwerdenden Mg^{2+} Ionen können so an ATP binden. Das entstehende MgATP ist essenziell, da freies ATP nicht als Kosubstrat der Kinase fungieren kann [211]. Fehlt der Reaktionslösung also freies Magnesium, ist die Phosphorylierung des DAG nicht möglich.

In der Konsequenz musste das Detergens als Substrat der DAG-Kinase angenommen werden. Entsprechend zeigte die Inkubation mit 150,0 μg Cardiolipin (CL) nach 30-minütiger Inkubationszeit mit der Kinase eine positive Reaktion (s. 3.3.5, Abb. 11). Bekannt war bisher die Rolle des Lipidkofaktors, ohne den das Apoprotein keine katalytische Aktivität entfalten kann. Diese Funktion konnten aber auch andere Lipide übernehmen, auch wenn CL am effizientesten wirkt [175, 212]. Betrachtet man die chemische Strukturformel von CL, fällt ein Glyceringrundkörper auf, an dessen C_1 - und C_3 -Position je ein Phosphatidylrest verestert ist. Die einzige freie Hydroxidgruppe wäre die an C_2 -Position des Glycerolgrundgerüsts.

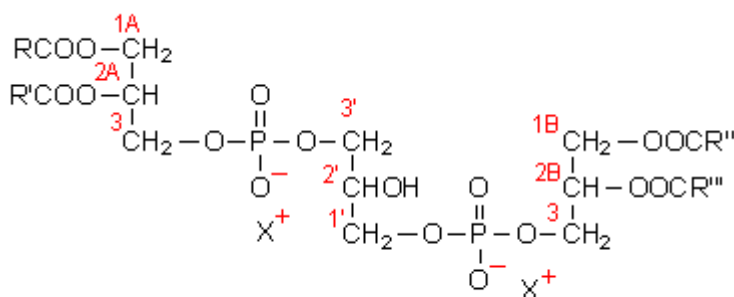


Abb. 16: Strukturformel Cardiolipin

Genau diese alkoholische Gruppe scheint es zu sein, die letztlich die Esterbrücke zum in der enzymatischen Reaktion angenäherten γ -Phosphat des ATP aufbaut. Walsh et al. negieren zwar 1,3-Dioleylglycerolester als mögliche Substrate der DAG-Kinase [175]. Möglicherweise sind aber aufgrund der unterschiedlichen Polarität der Phosphatidylreste im Cardiolipinmolekül gegenüber den Alkylresten im 1,3-Dioleylglycerol die Wechselwirkungen zwischen Protein und Substrat derart optimiert, dass ein direkter Phosphattransfer realisierbar wird. Reaktionsprodukt dieser Enzymkatalyse wäre das radioaktiv markierte Diphosphatidylglycerolphosphat, das sich chromatographisch ähnlich dem DAG zu verhalten scheint und deswegen eine Bande auf gleicher Höhe hervorrufen kann.

Zusammenfassend scheint aufgrund unserer Beobachtungen, dem CL neben seiner Rolle des aktivierenden Lipidkofaktors gleichzeitig eine Substratfunktion zuzukommen. Für das 1-Monooleoylglycerol ist ein solches Verhalten durch Bohnenberger und Sandermann bereits charakterisiert worden [212].

Da aufgrund der skizzierten Beobachtungen CL als Substrat der DAG-Kinase angenommen werden kann, wäre bei gemeinsamer Inkubation von DAG und CL eine Substratkonkurrenz denkbar. Die Begünstigung des DAG hierbei könnte durch die bessere Interaktion mit dem aktiven Zentrum oder auch thermodynamisch bedingt sein. Ist aber das eigentliche Substrat DAG nicht präsent, könnte dann beispielsweise auch das weniger affine CL phosphoryliert werden. Die enzymaktivierende Wirkung des CL ist etwa 5-fach und beruht auf einer Komplexbildung zwischen DAG und CL. Dieser Komplex führt durch optimale Enzym-Substrat-Wechselwirkung zu maximaler DAG-P Synthese [181]. Es muss auch die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, dass CL direkt an die Kinase bindet und so durch Konformationsvariation eine Aktivitätssteigerung hervorruft. Da CL parallel als Substrat zu dienen scheint, müsste die Bindung diskontinuierlich sein, oder nur ein geringer Teil der gelösten Menge wird an das Protein gebunden. Letzteres ist nicht auszuschließen, da schon etwa ein Drittel der sonst verwendeten CL-Konzentration von 3,5 mol% zu einer 50%igen Aktivierung der DAG-Kinase führen [181]. Möglicherweise ist die resultierende Aktivität ausreichend, um gelöstes CL in Abwesenheit von DAG in dem Maße zu phosphorylieren, dass sich eine Bande auf dem Röntgenfilm zeigt.

Irritierend ist die Beobachtung, dass nach 30 min Enzyminkubation DAG eine schwächere Bande als CL hervorruft (s. 3.3.5, Abb. 11). Hier ist denkbar, dass in Abwesenheit von CL die Aktivität der Kinase so schwach ist, dass nur geringe Mengen DAG phosphoryliert werden und insofern nur eine schwache Bande sichtbar ist. In Anwesenheit von CL dagegen könnte die Aktivität so stark zunehmen, dass letztlich sogar mehr Diphosphatidylglycerolphosphat aus CL als Diacylglycerolphosphat aus DAG ohne Lipidaktivator im Reaktionsansatz entsteht. Wegen des dann höheren ^{32}P -Transfers auf CL ergibt sich eine breitere Bande.

Zusammenfassend lässt sich formulieren: Cardiolipin ist in erster Linie als potenter Aktivator der DAG-Kinase zu sehen. Liegt aber Substratmangel vor, ist es nach unseren Daten möglich, dass CL auch Substrat des genannten Eiweißes wird. Wir haben CL deshalb nicht mehr für die Enzyminkubationen im Rahmen kinetischer Untersuchungen eingesetzt. Aufgrund der vorherigen Membranpräparation aus HeLa-Zellen erschien das auch nicht zwingend, da, wie schon genannt, neben dem CL auch andere in Membranen vorkommende aktivierende Lipidfaktoren existieren [209, 212].

4.3 Diskussion der Strategie

4.3.1 Der theoretische Ansatz

Für die Richtigkeit der Annahme, dass DAG im Verlauf einer zellulären Infektion durch *E. coli* Flexneri entsteht, sprechen einige Beobachtungen, die in der Arbeitsgruppe von T. Adam gewonnen wurden.

So führte die Präinkubation von HeLa-Zellen mit D609, einem spezifischen PLC-Inhibitor, zu einer erhöhten Shigellen-Invasion. Einen gegenteiligen Effekt hat die Einschleusung von Propranolol, einem spezifischen PPH-Hemmer und nicht-selektiven β -Blocker, in den Versuchsablauf (T. Adam, unveröffentlichte Daten).

Die geschilderten Beobachtungen legen nahe, dass DAG ein Mediator während des Fortschreitens einer Infektion mit *E. coli* Flexneri sein könnte. Seine Synthese erfolgt allerdings nicht über die Phospholipase C, sondern über eine Zwei-Schritt-Synthese über die PLD und die PPH. Gegen eine Beteiligung insbesondere der Phosphatidylinositolphosphat (PtdInsP)-spezifischen PLC spricht weiterhin die fehlende Calcium-Liberation, die Folge der Inositoltriphosphat (IP_3) Synthese, neben DAG ein Produkt der PtdInsP₂-Spaltung durch die PLC, ist [213].

Lediglich für *E. coli* Dysenteriae Typ I ist eine Shiga-Toxin vermittelte Modulation des intrazellulären Calciumhaushaltes beschrieben, die nach Kaur et al. neben der erhöhten PKC-Aktivität innerhalb der Membranfraktion einen wesentlichen Bestandteil bei der Pathogenese der resultierenden erhöhten Darmsekretion darstellt [214]. Die in unseren Experimenten verwendeten *E. coli* Flexneri-Isolate synthetisieren jedoch kein Shiga-Toxin.

4.3.2 Der experimentelle Ansatz

Zur Überprüfung unserer Hypothese waren unterschiedliche Ansätze möglich. Zum einen war der direkte Nachweis des DAG denkbar. Andererseits wäre aber auch vorstellbar gewesen, den intermediären Metaboliten, das PLD-Produkt Phosphatidat, nachzuweisen. Hier war aber zu bedenken, dass der Nachweis eine vorherige radioaktive Markierung der HeLa-Zellen notwendig macht, um letztlich die Phosphatidsäure chromatographisch nachweisen zu können. Dazu müssen Tritium oder ¹⁴C-Kohlenstoffisotope in die Phospholipidmembran während der Zellteilungen integriert werden. Der Nachteil ist, dass von Beginn an mit Radioaktivität gearbeitet werden muss. Nachteilig war das vor allem aufgrund der hiesigen Laborbedingungen, da im Isotopenlabor kein Brutschrank mit der Möglichkeit zur Kohlendioxidbegasung zur Verfügung stand. Das ist wiederum eine notwendige Voraussetzung für die Zellkultivierung.

Weiterhin ungünstig sind die langen Halbwertszeiten des ³H (12,3 Jahre) und ¹⁴C (5568 Jahre) gegenüber ³²P (14 Tage). Hieraus resultieren vor allem Entsorgungsschwierigkeiten. Die nachträgliche radioaktive Markierung des DAG mittels ³²P- γ -ATP ist insofern als vernünftige Alternative zu sehen. Offenkundige Nachteile ergeben sich nicht.

5 Zusammenfassung

Shigella wird zunehmend unter Berücksichtigung phylogenetischer Analysen als Klon der Spezies *Escherichia coli* betrachtet. Es können vier unterschiedliche Subformen *E. coli* Flexneri, Sonnei, Boydii und Dysenteriae unterschieden werden. Shigella ist der Erreger der bakteriellen Ruhr bzw. der Dysenterie beim Menschen. Insbesondere galt dem Invasionsprozess von *E. coli* Flexneri im Rahmen dieser Arbeit ein besonderes Interesse. Bekannt war, dass Shigella unter anderem durch die Sekretion von Proteinen, sogen. Ipa-Proteinen, die Zellinvasion in erheblichem Maß aktiv beeinflusst. Morphologisch zeigten sich elektronenmikroskopisch zytoskelettale Rearrangements, einhergehend mit der Ausbildung von Blüten-ähnlichen Membranprotrusionen, in deren Zentrum sich Shigella befand. Die Konfluenz dieser Protrusionen führte letztlich zur Internalisierung des Bakteriums. Auf molekularer Ebene ist die Aktinpolymerisation der entscheidende Faktor.

Aufgrund vorliegender Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe mit Propranolol, einem spezifischen Inhibitor der Phosphatidat Phosphohydrolase (PPH), und D609, einem spezifischen Inhibitor der Phospholipase C (PLC) konnte eine allerdings unbekannt Funktion des Diacylglycerols im Kontext mit dem Invasionsprozess von Shigella vermutet werden. Insbesondere führten die Invasionsexperimente mit D609 zu einer vermehrten, die Invasionsexperimente mit Propranolol hingegen zu einer verminderten Anzahl elektronenmikroskopisch verifizierbarer zytoskelettaler Rearrangements bzw. einer geringeren Infektion von HeLa-Zellen durch *E. coli* Flexneri. In der Konklusion war davon auszugehen, dass DAG die bakterielle Infektion von HeLa-Zellen positiv beeinflusst, der Syntheseweg jedoch eine zweimalige Hydrolyse eines Phospholipidesters, beispielsweise des Phosphatidylcholin, durch die PLD und die PPH darstellt.

Ziel dieser Arbeit war es zum einen, den direkten qualitativen Nachweis einer Beteiligung des DAG am Invasionsprozess von *E. coli* Flexneri in HeLa-Zellen zu erbringen. Zum anderen sollte der Hypothese, dass es mit fortschreitender Infektionsdauer zur Akkumulation von intrazellulärem DAG kommt, nachgegangen werden.

Zur Überprüfung dieser Annahme wurden HeLa-Zellen mit dem invasiven *E. coli* Flexneri Stamm SC301 und dem nicht invasiven Stamm SC300 infiziert. Die Infektion wurde nach fünf, 15 und 30 min gestoppt. Im Anschluss wurden die Phospholipide extrahiert. Zur Detektion des DAG erfolgte zunächst eine radioaktive Phosphorylierung durch die Enzymkatalyse der DAG-Kinase. Im Anschluss wurden die Phospholipide chromatographisch mittels Dünnschichtchromatographie aufgetrennt. Die Sichtbarmachung der Phosphatidsäure wurde durch Exposition auf einem Röntgenfilm realisiert.

Letztlich gelang es lediglich, DAG als Bestandteil der Membranpräparationen nachzuweisen, der sich jedoch im visuellen Vergleich der Chromatogramme trotz zunehmender Infektionsdauer für SC301 nicht unterschied. Des weiteren ergaben sich keine Unterschiede im Vergleich mit dem nicht invasiven Stamm SC300.

Wegen der insgesamt fehlenden Plausibilität dieses Resultates wurden Modifizierungen im experimentellem Ablauf mit dem Ziel unternommen, Aussagen zu den Versuchsbedingungen, zur DAG-Kinase selbst und zu den notwendigen Reagenzien treffen zu können.

Festgehalten werden kann, dass die DAG-Kinase geeignet ist, DAG sicher nachzuweisen. Die Reaktionswärme beeinflusst die Enzymaktivität im Bereich zwischen 17°C und 30°C nur unwesentlich. Eine Verlängerung der Inkubationszeit auf 60 min ergab keine vermehrte DAG-Synthese. Die erforderliche Menge radioaktiven ^{32}P - γ -ATP konnte bei gleicher Aussagekraft durch die Reduktion des nicht-radioaktiven ATP im Experiment und damit verminderter Substratkonkurrenz verringert werden. Cardiolipin konnte neben seiner bekannten Funktion als Aktivator der DAG-Kinase erstmalig als Substrat der Kinase nachgewiesen werden. Für die Phosphorylierung des DAG durch die Kinase ist es bei Vorhandensein anderer Lipidaktivatoren, die ausreichend in den Membranpräparationen vorkommen, entbehrlich.

Die möglichen Ursachen der gefundenen Ergebnisse werden im Kontext der vorhandenen Literatur ausführlich diskutiert.

Zusammenfassend konnte durch unsere Experimente ein geeignetes Versuchssystem zur Untersuchung der Funktion des DAG während der zellulären Invasion durch *E. coli* Flexneri etabliert werden.

Literaturverzeichnis

1. Konawalchuk, J., J.I. Spiers, and S. Starvic, *Vero response to a cytotoxin of Escherichia coli*. Infect Immun, 1977. **18**: p. 775-779.
2. Levine, M.M. and R. Edelmann, *Enteropathogenic Escherichia coli of classical serotypes associated with infant diarrhea: epidemiology and pathogenesis*. Epidemiol Rev, 1984. **6**: p. 31-51.
3. Pupo, G.M., et al., *Evolutionary relationships among pathogenic and nonpathogenic Escherichia coli strains inferred from multilocus enzyme electrophoresis and mdh sequence studies*. Infect Immun, 1997. **65**(7): p. 2685-92.
4. Pupo, G.M., R. Lan, and P.R. Reeves, *Multiple independent origins of Shigella clones of Escherichia coli and convergent evolution of many of their characteristics*. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A., 2000. **97**(19): p. 10567-10572.
5. Lan, R., et al., *Molecular evolution of large virulence plasmid in Shigella clones and enteroinvasive Escherichia coli*. Infect Immun, 2001. **69**(10): p. 6303-9.
6. Sansonetti, P.J., *Shigella plays dangerous games*. ASM News, 1999: p. 611-617.
7. Kayser, F.H., et al., *Medizinische Mikrobiologie*. 9 ed. 1998, Stuttgart: Georg Thieme Verlag. 285-287.
8. DuPont, H.L., et al., *Inoculum size in shigellosis and implications for expected mode of transmission*. J.Infect.Dis., 1989. **159**: p. 1126-1128.
9. Watermann, S.R. and P.L.C. Small, *Identification of σ^S -dependent genes associated with the stationary-phase acid-resistance phenotype of Shigella flexneri*. Mol.Microbiol., 1996. **21**(5): p. 925-940.
10. Pupo, G.M., et al., *Evolutionary relationships among pathogenic and nonpathogenic Escherichia coli strains inferred from multilocus enzyme electrophoresis and mdh sequence studies*. Infect.Immun., 1997. **65**: p. 2685-2692.
11. Mathan, V.I., et al., *Epidemic dysentery caused by the Shiga bacillus in a southern Indian village*. J.Diar.Dis.Res., 1984. **1**: p. 27-32.
12. Mata, L.J., A. Caceres, and M.F. Torres, *Epidemic shiga dysentery in Central America*. Lancet, 1971. **1**: p. 600-601.
13. Middlebrook, J.L. and R.B. Dorland, *Bacterial toxins: Cellular mechanism of Action*. Microbiol.Rev., 1984. **48**: p. 199-221.
14. Brown, J.E., et al., *Inhibition of protein synthesis by Shiga toxin: activation of the toxin and inhibition of peptide elongation*. FEBS Lett, 1980. **117**(1): p. 84-8.
15. Khan, M.U., et al., *Fourteen years of shigellosis in Dhaka: an epidemiological analysis*. Int.J.Epidemiol., 1985. **14**: p. 607-613.
16. Mhalu, F.S., W.K. Moshi, and I. Mbagi, *A bacillary dysentery epidemic in Dar es Salaam, Tanzania*. J.Diar.Dis.Res., 1984. **2**: p. 217-222.
17. Goren, A., S. Freier, and J.H. Passwell, *Lethal toxic encephalopathy due to childhood shigellosis in a developed country*. Pediatrics, 1992. **89**(6): p. 1189-1193.
18. Koster, F., et al., *Hemolytic-uremic syndrome after shigellosis*. N.Engl.J.Med., 1978. **298**: p. 927-933.
19. Raghupathy, P., et al., *Haemolytic-uraemic syndrome complicating shigella dysentery in south Indian children*. Br.Med.J., 1978. **1**: p. 1518-1521.
20. David, H., *Die Verdauungsorgane-Spezielle Krankheitsbilder-Bakterielle Ruhr*, in *Lehrbuch Der Speziellen Pathologie*. 1966, Gustav Fischer Verlag: Leipzig. p. 272-274.
21. Mathan, M.M. and V.I. Mathan, *Ultrastructural pathology of the rectal mucosa in Shigella dysentery*. Am.J.Pathol., 1986. **123**(1): p. 25-38.

22. Labrec, E.H., et al., *Epithelial cell penetration as an essential step in the pathogenesis of bacillary dysentery*. J.Bacteriol., 1964. **88**: p. 1503-1518.
23. Levine, M.M., H.L. DuPont, and S.B. Formal, *Pathogenesis of Shigella dysenteriae 1 (Shiga) dysentery*. J.Infect.Dis., 1973. **127**: p. 261-270.
24. DuPont, H.L., et al., *Immunity in shigellosis. I. Response of man to attenuated strains of Shigella*. J.Infect.Dis., 1972. **125**(1): p. 5-11.
25. Finlay, B.B. and S. Falkow, *Salmonella interaction with polarized human intestinal CaCo-2 epithelial cells*. J.Infect.Dis., 1990. **162**: p. 1096-1106.
26. Mounier, J., et al., *Shigella flexneri enters human colonic Caco-2 epithelial cells through the basolateral pole*. Infect.Immun., 1992. **60**(1): p. 237-248.
27. Hultgren, S.J., et al., *Pilus and nonpilus bacterial adhesins: assembly and function in cell recognition*. Cell, 1993. **73**(5): p. 887-901.
28. Neutra, M.R., A. Frey, and J.P. Kraehenbuhl, *Epithelial M cells: gateways for mucosal infection and immunization*. Cell, 1996. **86**(3): p. 345-348.
29. Sansonetti, P.J., et al., *Infection of rabbit Peyer's patches by Shigella flexneri: effect of adhesive or invasive bacterial phenotypes on follicle-associated epithelium*. Infect.Immun., 1996. **64**(7): p. 2752-2764.
30. Zychlinsky, A., M.C. Prevost, and P.J. Sansonetti, *Shigella flexneri induces apoptosis in infected macrophages*. Nature, 1992. **358**(6382): p. 167-169.
31. Sansonetti, P.J., et al., *Caspase-1 activation of IL-1 β and IL-18 are essential for Shigella flexneri-induced inflammation*. Immunity, 2000. **12**: p. 581-590.
32. Way, S.S., et al., *An Essential Role for Gamma Interferon in Innate Resistance to Shigella flexneri Infection*. Infect.Immun., 1998. **66**(4): p. 1342-1348.
33. Renesto, P., J. Mounier, and P.J. Sansonetti, *Induction of adherence and degranulation of polymorphonuclear leukocytes: a new expression of the invasive phenotype of Shigella flexneri*. Infect Immun, 1996. **64**(3): p. 719-23.
34. Sakaguchi, T., et al., *Shigella flexneri regulates tight junction-associated proteins in human intestinal epithelial cells*. Cell Microbiol, 2002. **4**(6): p. 367-81.
35. Jung, H.C., et al., *A distinct array of pro-inflammatory cytokines is expressed in human colon epithelial cells in response to bacterial invasion*. J.Clin.Invest., 1995. **95**: p. 55-65.
36. Sansonetti, P.J., et al., *Role of interleukin-1 in the pathogenesis of experimental shigellosis*. J.Clin.Invest., 1995. **96**(2): p. 884-892.
37. Perdomo, J.J., P. Gounon, and P.J. Sansonetti, *Polymorphonuclear leukocyte transmigration promotes invasion of colonic epithelial monolayer by Shigella flexneri*. J.Clin.Invest., 1994. **93**(2): p. 633-643.
38. Clerc, P. and P. Sansonetti, *Entry of Shigella flexneri into HeLa cells: evidence for directed phagocytosis involving actin polymerization and myosin accumulation*. Infect.Immun., 1987. **55**(11): p. 2681-2688.
39. Adam, T., et al., *Cytoskeletal rearrangements and the functional role of T-plastin during entry of Shigella flexneri into HeLa cells*. J Cell Biol, 1995. **129**(2): p. 367-81.
40. Sansonetti, P.J., et al., *Multiplication of Shigella flexneri within HeLa cells: lysis of the phagocytic vacuole and plasmid-mediated contact hemolysis*. Infect Immun, 1986. **51**(2): p. 461-9.
41. Mantis, N., M.C. Prevost, and P. Sansonetti, *Analysis of epithelial cell stress response during infection by Shigella flexneri*. Infect.Immun., 1996. **64**(8): p. 2474-2482.
42. Clark, C.S. and A.T. Maurelli, *Shigella flexneri inhibits staurosporine-induced apoptosis in epithelial cells*. Infect Immun, 2007. **75**(5): p. 2531-9.
43. Tattoli, I., et al., *Intracellular bacteriolysis triggers a massive apoptotic cell death in Shigella-infected epithelial cells*. Microbes Infect, 2008.
44. Bernardini, M.L., et al., *Identification of icsA, a plasmid locus of Shigella flexneri that governs bacterial intra- and intercellular spread through interaction with F-actin*. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A., 1989. **86**(10): p. 3867-3871.
45. Vasselon, T., et al., *Stress fiber-based movement of Shigella flexneri within cells*. Infect.Immun., 1991. **59**(5): p. 1723-1732.
46. Sansonetti, P.J., *Molecular and cellular bases of the virulence of Shigella flexneri*. Ann.Gastroenterol.Hepatol.(Paris), 1992. **28**(1): p. 44-47.

47. Suzuki, T., M.C. Lett, and C. Sasakawa, *Extracellular transport of VirG protein in Shigella*. J Biol Chem, 1995. **270**(52): p. 30874-80.
48. Suzuki, T., M.-C. Lett, and C. Sasakawa, *Extracellular transport of VirG protein in Shigella*. J.Biol.Chem., 1995. **270**: p. 30874-30880.
49. Leung, Y., S. Ally, and M.B. Goldberg, *Bacterial actin assembly requires toca-1 to relieve N-wasp autoinhibition*. Cell Host Microbe, 2008. **3**(1): p. 39-47.
50. Suzuki, T., et al., *Neural Wiskott-Aldrich syndrome protein is implicated in the actin-based motility of Shigella flexneri*. EMBO J., 1998. **17**: p. 2767-2776.
51. Suzuki, T., et al., *Rho Family GTPase Cdc42 Is essential for the Actin-based Motility of Shigella in Mammalian Cells*. J.Exp.Med., 2000. **191**(11): p. 1905-1920.
52. Laine, R.O., et al., *Vinculin Proteolysis Unmasks an ActA Homolog for Actin-based Shigella Motility*. Cell Biol., 1997. **138**(6): p. 1255-1264.
53. Makino, S., et al., *A genetic determinant required for continuous reinfection of adjacent cells on large plasmid in Shigella flexneri 2a*. Cell, 1986. **46**: p. 551-555.
54. Pal, T., et al., *Intracellular spread of Shigella flexneri associated with the kcpA locus and a 140-kilodalton protein*. Infect.Immun., 1989. **57**: p. 477-486.
55. Prevost, M.C., et al., *Unipolar reorganization of F-actin layer at bacterial division and bundling of actin filaments by plastin correlate with movement of Shigella flexneri within HeLa cells*. Infect.Immun., 1992. **60**(10): p. 4088-4099.
56. Maurelli, A.T., et al., *"Black holes" and bacterial pathogenicity: a large genomic deletion that enhances the virulence of Shigella spp. and enteroinvasive Escherichia coli*. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A., 1998. **95**: p. 3943-3948.
57. Sasakawa, C., et al., *Virulence-associated genetic regions comprising 31 kilobases of the 230-kilobase plasmid in Shigella flexneri 2a*. J.Bacteriol., 1988. **170**: p. 2480-2484.
58. Sansonetti, P.J., D.J. Kopecko, and S.B. Formal, *Involvement of a plasmid in the invasive ability of Shigella flexneri*. Infect Immun, 1982. **35**(3): p. 852-60.
59. Kopecko, D.J., O. Washington, and S.B. Formal, *Genetic and physical evidence for plasmid control of Shigella sonnei form I cell surface antigen*. Infect.Immun., 1980. **29**: p. 207-214.
60. Sansonetti, P.J., et al., *Alterations in the pathogenicity of Escherichia coli K-12 after transfer of plasmid and chromosomal genes from Shigella flexneri*. Infect.Immun., 1983. **39**(3): p. 1392-1402.
61. Page, A.L., et al., *The secreted IpaB and IpaC invasins and their cytoplasmic chaperone IpgC are required for intercellular dissemination of Shigella flexneri*. Cell Microbiol, 1999. **1**(2): p. 183-93.
62. Menard, R., et al., *Extracellular association and cytoplasmic partitioning of the IpaB and IpaC invasins of S. flexneri*. Cell, 1994. **79**(3): p. 515-25.
63. Niebuhr, K., et al., *Conversion of PtdIns(4,5)P2 into PtdIns(5)P by S. flexneri effector IpgD reorganizes host cell morphology*. EMBO J., 2002. **21**(19): p. 5069-5078.
64. Niebuhr, K., et al., *IpgD, a protein secreted by the type III secretion machinery of Shigella flexneri, is chaperonized by IpgE and implicated in entry focus formation*. Mol.Microbiol., 2000. **38**(1): p. 8-19.
65. Uchiya, K., et al., *Identification of a novel virulence gene, virA, on the large plasmid of Shigella, involved in invasion and intercellular spreading*. Mol.Microbiol., 1995. **17**(2): p. 241-250.
66. Demers, B., P.J. Sansonetti, and C. Parsot, *Induction of type III secretion in Shigella flexneri is associated with differential control of transcription of genes encoding secreted proteins*. EMBO J., 1998. **17**: p. 2894-2903.
67. Bahrani, F.K., P.J. Sansonetti, and C. Parsot, *Secretion of Ipa proteins by Shigella flexneri: inducer molecules and kinetics of activation*. Infect.Immun., 1997. **65**(10): p. 4005-4010.
68. Tamano, K., et al., *Supramolecular structure of structure of Shigella type III secretion machinery: the needle part is changeable in length and essential for delivery of effectors*. EMBO J., 2000. **19**(15): p. 3876-3887.
69. Allaoui, A., P.J. Sansonetti, and R. Menard, *MxiG, a membrane protein required for secretion of Shigella spp. Ipa invasins: involvement in entry into epithelial cells and in intercellular dissemination*. Mol.Microbiol., 1995. **17**: p. 461-470.

70. Allaoui, A., P.J. Sansonetti, and C. Parsot, *MxiD, an outer membrane protein necessary for the secretion of the Shigella flexneri Ipa invasins*. Mol.Microbiol., 1993. **7**: p. 59-68.
71. Blocker, A., et al., *The tripartite type III secretin of Shigella flexneri inserts IpaB and IpaC into host membranes*. J Cell Biol, 1999. **147**(3): p. 683-93.
72. Schuch, R. and A.T. Maurelli, *MxiM and MxiJ, Base Elements of the Mxi-Spa Type III Secretion System of Shigella, Interact with and Stabilize MxiD Secretion in the Cell Envelope*. J.Bacteriol., 2001. **183**(24): p. 6991-6998.
73. Schuch, R. and A.T. Maurelli, *The Mxi-Spa Type III Secretory Pathway of Shigella flexneri Requires an Outer Membrane Lipoprotein, MxiM, for Invasin Translocation*. Infect.Immun., 1999. **67**(4): p. 1982-1991.
74. Schuch, R. and A.T. Maurelli, *Spa33, a Cell Surface-Associated Subunit of the Mxi-Spa Type III Secretory Pathway of Shigella flexneri, Regulates Ipa Protein Traffic*. Infect.Immun., 2001. **69**(4): p. 2180-2189.
75. Tamano, K., et al., *Shigella Spa32 Is an Essential Secretory Protein for Functional Type III Secretion Machinery and Uniformity of Its Needle Length*. J.Bacteriol., 2002. **184**(5): p. 1244-1252.
76. Morita-Ishihara, T., et al., *Shigella Spa33 is an essential C-ring component of type III secretion machinery*. J Biol Chem, 2006. **281**(1): p. 599-607.
77. Blocker, A., K. Komoriya, and S. Aizawa, *Type III secretion systems and bacterial flagella: insights into their function from structural similarities*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(6): p. 3027-30.
78. Mounier, J., F.K. Bahrani, and P.J. Sansonetti, *Secretion of Shigella flexneri Ipa invasins on contact with epithelial cells and subsequent entry of the bacterium into cells are growth stage dependent*. Infect Immun, 1997. **65**(2): p. 774-82.
79. Menard, R., P. Sansonetti, and C. Parsot, *The secretion of the Shigella flexneri Ipa invasins is activated by epithelial cells and controlled by IpaB and IpaD*. Embo J, 1994. **13**(22): p. 5293-302.
80. Watarai, M., et al., *Contact of Shigella with host cells triggers release of Ipa invasins and is an essential function of invasiveness*. EMBO J., 1995. **14**: p. 2461-1470.
81. Skoudy, A., et al., *CD44 binds to the Shigella IpaB protein and participates in bacterial invasion of epithelial cells*. Cell Microbiol, 2000. **2**(1): p. 19-33.
82. Watarai, M., S. Funato, and C. Sasakawa, *Interaction of Ipa proteins of Shigella flexneri with alpha5beta1 integrin promotes entry of the bacteria into mammalian cells*. J Exp Med, 1996. **183**(3): p. 991-9.
83. Toyotome, T., et al., *Shigella protein IpaH(9.8) is secreted from bacteria within mammalian cells and transported to the nucleus*. J Biol Chem, 2001. **276**(34): p. 32071-9.
84. Menard, R., P.J. Sansonetti, and C. Parsot, *Non-polar mutagenesis of the ipa gene defines IpaB, IpaC and IpaD as effectors of Shigella flexneri entry into epithelial cells*. J.Bacteriol., 1993. **175**: p. 5899-5906.
85. High, N., et al., *IpaB of Shigella flexneri causes entry into epithelial cells and escape from phagocytic vacuole*. EMBO J., 1992. **11**: p. 1991-1999.
86. Okuda, J., et al., *Shigella effector IpaH9.8 binds to a splicing factor U2AF(35) to modulate host immune responses*. Biochem Biophys Res Commun, 2005. **333**(2): p. 531-9.
87. Hamiaux, C., et al., *Structural mimicry for vinculin activation by IpaA, a virulence factor of Shigella flexneri*. EMBO Rep, 2006. **7**(8): p. 794-9.
88. Tran Van Nhieu, G., A. Ben-Ze'ev, and P.J. Sansonetti, *Modulation of bacterial entry into epithelial cells by association between vinculin and the Shigella IpaA invasin*. Embo J, 1997. **16**(10): p. 2717-29.
89. Menard, R., et al., *The secreted Ipa complex of Shigella flexneri promotes entry into mammalian cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(3): p. 1254-8.
90. Espina, M., et al., *IpaD localizes to the tip of the type III secretion system needle of Shigella flexneri*. Infect Immun, 2006. **74**(8): p. 4391-400.
91. Picking, W.L., et al., *IpaD of Shigella flexneri is independently required for regulation of Ipa protein secretion and efficient insertion of IpaB and IpaC into host membranes*. Infect Immun, 2005. **73**(3): p. 1432-40.

92. Mackay, D.J.G. and A. Hall, *Rho GTPases*. J Biol Chem, 1998. **273**(33): p. 20685-88.
93. Mounier, J., et al., *Rho family GTPases control entry of Shigella flexneri into epithelial cells but not intracellular motility*. J Cell Sci, 1999. **112 (Pt 13)**: p. 2069-80.
94. Adam, T., et al., *Rho-dependent membrane folding causes Shigella entry into epithelial cells*. EMBO J., 1996. **15**(13): p. 3315-3321.
95. Alto, N.M., et al., *Identification of a bacterial type III effector family with G protein mimicry functions*. Cell, 2006. **124**(1): p. 133-45.
96. Hachani, A., et al., *IpgB1 and IpgB2, two homologous effectors secreted via the Mxi-Spa type III secretion apparatus, cooperate to mediate polarized cell invasion and inflammatory potential of Shigella flexneri*. Microbes Infect, 2008. **10**(3): p. 260-8.
97. Pomorski, T., et al., *Lipid distribution and transport across cellular membranes*. Cell & Developmental Biology, 2001. **12**: p. 139-148.
98. Berridge, M.J., *Inositol trisphosphate and diacylglycerol: two interacting second messengers*. Annu.Rev.Biochem., 1987. **56**: p. 159-193.
99. Balsinde, J., et al., *Distinct role in signal transduction for each of the phospholipases A₂ enzymes present in P388D₁ macrophages*. Annu.Rev.Pharmacol.Toxicol., 1999. **39**: p. 175-189.
100. Balsinde, J. and E.A. Dennis, *Bromo-enol lactone inhibits magnesium-dependent phosphatidate phosphohydrolase and blocks triacylglycerol biosynthesis in mouse P388D₁ macrophages*. J.Biol.Chem., 1996. **271**: p. 31937-31941.
101. McHowat, J. and M.H. Creer, *Calcium-independent phospholipase A₂ in isolated rabbit ventricular myocytes*. Lipids, 1998. **33**: p. 1203-1212.
102. Triggiani, M., et al., *Activation of human inflammatory cells by secreted phospholipases A₂*. Biochim Biophys Acta, 2006. **1761**(11): p. 1289-300.
103. Fukushima, N. and J. Chun, *The LPA receptors*. Prostaglandins, 2001. **64**(1-4): p. 21-32.
104. Fukushima, N., et al., *Dual regulation of actin rearrangement through lysophosphatidic acid receptor in neuroblast cell lines: actin depolymerization by Ca(2+)-alpha-actinin and polymerization by rho*. Mol Biol Cell, 2002. **13**(8): p. 2692-705.
105. Panther, E., et al., *The influence of lysophosphatidic acid on the functions of human dendritic cells*. J Immunol, 2002. **169**(8): p. 4129-35.
106. Kou, R., J. Igarashi, and T. Michel, *Lysophosphatidic acid and receptor-mediated activation of endothelial nitric-oxide synthase*. Biochemistry, 2002. **41**(15): p. 4982-8.
107. Taketo, M.M. and M. Sonoshita, *Phospholipase A₂ and apoptosis*. Biochim Biophys Acta, 2002. **1585**(2-3): p. 72-6.
108. Sapirstein, A., et al., *Cytosolic phospholipase A₂ (PLA₂) but not secretory PLA₂, potentiates hydrogen peroxide cytotoxicity in kidney epithelial cells*. J.Biol.Chem., 1996. **271**: p. 21505-21513.
109. Lee, C., et al., *Secretory phospholipase A₂ induces apoptosis through TNF-alpha and cytochrome c-mediated caspase cascade in murine macrophage RAW 264.7 cells*. Eur J Pharmacol, 2006. **536**(1-2): p. 47-53.
110. Salgo, M.G., F.P. Corongiu, and A. Sevanian, *Enhanced interfacial catalysis and hydrolytic specificity of phospholipase A₂ toward peroxidized phosphatidylcholine in kidney epithelial cells*. Arch.Biochem.Biophys., 1993. **304**: p. 123-132.
111. Fu, Y., J.X. Cheng, and S.L. Hong, *Characterization of cytosolic phospholipases C from porcine aortic endothelial cells*. Thromb Res, 1994. **73**(6): p. 405-17.
112. Ross, E.M., et al., *Structural determinants for phosphatidic acid regulation of phospholipase C-beta1*. J Biol Chem, 2006. **281**(44): p. 33087-94.
113. Litosch, I., *Regulatory GTP-binding proteins: emerging concepts on their role in cell function*. Life Sci, 1987. **41**(3): p. 251-8.
114. Litosch, I., *Phosphatidic acid modulates G protein regulation of phospholipase C-beta1 activity in membranes*. Cell Signal, 2002. **14**(3): p. 259-63.
115. Morrison, D.K., et al., *Platelet-derived growth factor (PDGF)-dependent association of phospholipase C-gamma with the PDGF receptor signaling complex*. Mol Cell Biol, 1990. **10**(5): p. 2359-66.
116. Hwang, S.C., et al., *Activation of phospholipase C-gamma by the concerted action of tau proteins and arachidonic acid*. J Biol Chem, 1996. **271**(31): p. 18342-9.

117. Falasca, M., et al., *Activation of phospholipase C gamma by PI 3-kinase-induced PH domain-mediated membrane targeting*. *Embo J*, 1998. **17**(2): p. 414-22.
118. Rebecchi, M.J. and S.N. Pentyala, *Structure, function, and control of phosphoinositide-specific phospholipase C*. *Physiol Rev*, 2000. **80**(4): p. 1291-335.
119. Feng, J.F., S.G. Rhee, and M.J. Im, *Evidence that phospholipase delta1 is the effector in the Gh (transglutaminase II)-mediated signaling*. *J Biol Chem*, 1996. **271**(28): p. 16451-4.
120. Murthy, K.S., et al., *Activation of PLC-delta1 by Gi/o-coupled receptor agonists*. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2004. **287**(6): p. C1679-87.
121. Allen, V., et al., *Regulation of inositol lipid-specific phospholipase cdelta by changes in Ca²⁺ ion concentrations*. *Biochem J*, 1997. **327 (Pt 2)**: p. 545-52.
122. Homma, Y. and Y. Emori, *A dual functional signal mediator showing RhoGAP and phospholipase C-delta stimulating activities*. *Embo J*, 1995. **14**(2): p. 286-91.
123. Yamaga, M., et al., *A PLCdelta1-binding protein, p122/RhoGAP, is localized in caveolin-enriched membrane domains and regulates caveolin internalization*. *Genes Cells*, 2004. **9**(1): p. 25-37.
124. Goldschmidt-Clermont, P.J., et al., *Regulation of phospholipase C-gamma 1 by profilin and tyrosine phosphorylation*. *Science*, 1991. **251**(4998): p. 1231-3.
125. Stope, M.B., et al., *Rap2B-dependent stimulation of phospholipase C-epsilon by epidermal growth factor receptor mediated by c-Src phosphorylation of RasGRP3*. *Mol Cell Biol*, 2004. **24**(11): p. 4664-76.
126. Hammond, S.M., et al., *Characterization of two alternately spliced forms of phospholipase D1. Activation of the purified enzymes by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate, ADP-ribosylation factor, and Rho family monomeric GTP-binding proteins and protein kinase C-alpha*. *J Biol Chem*, 1997. **272**(6): p. 3860-8.
127. Colley, W.C., et al., *Phospholipase D2, a distinct phospholipase D isoform with novel regulatory properties that provokes cytoskeletal reorganization*. *Curr.Biol.*, 1997. **7**(3): p. 191-201.
128. Steed, P.M., et al., *Characterization of human PLD2 and the analysis of PLD isoform splice variants*. *Faseb J*, 1998. **12**(13): p. 1309-17.
129. Lopez, I., R.S. Arnold, and J.D. Lambeth, *Cloning and initial characterization of a human phospholipase D2 (hPLD2). ADP-ribosylation factor regulates hPLD2*. *J Biol Chem*, 1998. **273**(21): p. 12846-52.
130. Sung, T.C., et al., *Molecular analysis of mammalian phospholipase D2*. *J.Biol.Chem.*, 1999. **274**: p. 494-502.
131. Sung, T.C., et al., *Structural analysis of human phospholipase D1*. *J.Biol.Chem.*, 1999. **274**: p. 3659-3666.
132. Sciorra, V.A., et al., *Identification of a phosphoinositide binding motif that mediates activation of mammalian and yeast phospholipase D isoenzymes*. *Embo J*, 1999. **18**(21): p. 5911-21.
133. Sciorra, V.A., et al., *Identification of a phosphoinositide binding motif that mediates activation of mammalian and yeast phospholipase D isoenzymes*. *EMBO J.*, 1999. **18**: p. 5911-5921.
134. Eldar, H., et al., *Up-regulation of phospholipase D activity induced by overexpression of protein kinase C-alpha. Studies in intact Swiss/3T3 cells and in detergent-solubilized membranes in vitro*. *J.Biol.Chem.*, 1993. **268**(17): p. 12560-12564.
135. Park, S.K., D.S. Min, and J.H. Exton, *Definition of the protein kinase C interaction site of phospholipase D*. *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, 1998. **244**: p. 364-367.
136. Singer, W.D., et al., *Regulation of phospholipase D by protein kinase C is synergistic with ADP-ribosylation factor and independent of protein kinase activity*. *J.Cell Biol.*, 1996. **271**: p. 4504-4510.
137. Kim, Y., et al., *Phospholipase D1 is phosphorylated and activated by protein kinase C in caveolin-enriched microdomains within the plasma membrane*. *J.Biol.Chem.*, 2000. **275**(18): p. 13621-13627.
138. Siddiqui, R.A., G.E. Srajer, and C.C. Leslie, *Regulation of human PLD1 and PLD2 by calcium and protein kinase C*. *Biochim.Biophys.Acta*, 2000. **1497**: p. 103-114.
139. Schmidt, M., et al., *A Role for Rho-Kinase in Rho-controlled Phospholipase D Stimulation by the m3 Muscarinic Acetylcholine Receptor*. *J.Biol.Chem.*, 1999. **274**(21): p. 14648-14654.

140. Voss, M., et al., *Phospholipase D stimulation by receptor tyrosine kinases mediated by protein kinase C and a Ras/Ral signaling cascade*. J.Biol.Chem., 1999. **274**(49): p. 34691-34698.
141. Powner, D.J. and M.J. Wakelam, *The regulation of phospholipase D by inositol phospholipids and small GTPases*. FEBS Lett., 2002. **531**(1): p. 62-64.
142. English, D., *Phosphatidic acid: a lipid messenger involved in intracellular and extracellular signalling*. Cell Signal., 1996. **8**: p. 341-347.
143. Waite, K.A., et al., *Phosphatidic acid-mediated phosphorylation of the NADPH oxidase component p47-phox. Evidence that phosphatidic acid may activate a novel protein kinase*. J.Biol.Chem., 1997. **272**: p. 15569-15578.
144. Jones, D., C. Morgan, and S. Cockcroft, *Phospholipase D and membrane traffic. Potential roles in regulated exocytosis, membrane delivery and vesicle budding*. Biochim.Biophys.Acta, 1999. **1439**: p. 229-244.
145. Bi, K., M.G. Roth, and N.T. Ktistakis, *Phosphatidic acid formation by phospholipase D is required for transport from the endoplasmatic reticulum to the Golgi complex*. Curr.Biol., 1997. **7**: p. 301-307.
146. Mineo, C., R.G.W. Anderson, and M.A. White, *Physical association with Ras enhances activation of membrane-bound Raf (Raf-CAAX)*. J.Biol.Chem., 1997. **272**: p. 10345-10348.
147. Steed, P.M., S. Nagar, and L.P. Wennogle, *Phospholipase D regulation by a physical interaction with the actin-binding protein gelsolin*. Biochemistry, 1996. **35**(16): p. 5229-37.
148. Kam, Y. and J.H. Exton, *Phospholipase D activity is required for actin stress fiber formation in fibroblasts*. Mol Cell Biol, 2001. **21**(12): p. 4055-66.
149. Lukowski, S., et al., *Inhibition of phospholipase D activity by fodrin. An active role for the cytoskeleton*. J Biol Chem, 1996. **271**(39): p. 24164-71.
150. Exton, J.H., *New developments in phospholipase D*. J.Biol.Chem., 1997. **272**: p. 15597-15582.
151. Sechi, A.S. and J. Wehland, *The actin cytoskeleton and plasma membrane connection: PtdIns(4,5)P(2) influences cytoskeletal protein activity at the plasma membrane*. J Cell Sci, 2000. **113 Pt 21**: p. 3685-95.
152. Yonemura, S., et al., *Ezrin/radixin/moesin (ERM) proteins bind to a positively charged amino acid cluster in the juxta-membrane cytoplasmic domain of CD44, CD43, and ICAM-2*. J Cell Biol, 1998. **140**(4): p. 885-95.
153. Yonemura, S., T. Matsui, and S. Tsukita, *Rho-dependent and -independent activation mechanisms of ezrin/radixin/moesin proteins: an essential role for polyphosphoinositides in vivo*. J Cell Sci, 2002. **115**(Pt 12): p. 2569-80.
154. Hirao, M., et al., *Regulation mechanism of ERM (ezrin/radixin/moesin) protein/plasma membrane association: possible involvement of phosphatidylinositol turnover and Rho-dependent signaling pathway*. J Cell Biol, 1996. **135**(1): p. 37-51.
155. Rohatgi, R., H.Y. Ho, and M.W. Kirschner, *Mechanism of N-WASP activation by CDC42 and phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate*. J Cell Biol, 2000. **150**(6): p. 1299-310.
156. Pendaries, C., et al., *PtdIns5P activates the host cell PI3-kinase/Akt pathway during Shigella flexneri infection*. Embo J, 2006. **25**(5): p. 1024-34.
157. Datta, S.R., A. Brunet, and M.E. Greenberg, *Cellular survival: a play in three Akts*. Genes Dev, 1999. **13**(22): p. 2905-27.
158. Goldfine, H., S.J. Wadsworth, and N.C. Johnston, *Activation of host phospholipases C and D in macrophages after infection with Listeria monocytogenes*. Infect Immun, 2000. **68**(10): p. 5735-41.
159. Mummy, K.L., et al., *Distinct isoforms of phospholipase A2 mediate the ability of Salmonella enterica serotype typhimurium and Shigella flexneri to induce the transepithelial migration of neutrophils*. Infect Immun, 2008. **76**(8): p. 3614-27.
160. He, H., et al., *Involvement of phosphatidylinositol-phospholipase C in immune response to Salmonella lipopolysaccharide in chicken macrophage cells (HD11)*. Int Immunopharmacol, 2006. **6**(12): p. 1780-7.
161. Zhang, F., G. Zhao, and Z. Dong, *Phosphatidylcholine-specific phospholipase C and D in stimulation of RAW264.7 mouse macrophage-like cells by lipopolysaccharide*. Int Immunopharmacol, 2001. **1**(7): p. 1375-84.

162. Kusner, D.J., C.F. Hall, and L.S. Schlesinger, *Activation of phospholipase D is tightly coupled to the phagocytosis of Mycobacterium tuberculosis or opsonized zymosan by human macrophages*. J Exp Med, 1996. **184**(2): p. 585-95.
163. Tse, S.M., et al., *Accumulation of diacylglycerol in the Chlamydia inclusion vacuole: possible role in the inhibition of host cell apoptosis*. J Biol Chem, 2005. **280**(26): p. 25210-5.
164. Gey, G.O., W.D. Coffman, and M.T. Kubicek, *Tissue culture studies of the proliferative capacity of cervical carcinoma and normal epithelium*. Cancer Research, 1952. **12**: p. 264-265.
165. Walz, W., et al., *AFA-I, a cloned afimbrial X-type adhesin from a human pyelonephritic Escherichia coli strain. Purification and chemical, functional and serologic characterization*. Eur J Biochem, 1985. **152**(2): p. 315-21.
166. Bollinger Bollag, W. and R.D. Griner, *Measurement of Cellular Diacylglycerol Content*. 1997.
167. Preiss, J.E., et al., *Quantitative measurement of sn-1,2-diacylglycerols*. Methods Enzymol, 1987. **141**: p. 294-300.
168. Hale, T.L. and S.B. Formal, *Protein synthesis in HeLa or Henle 407 cells infected with Shigella dysenteriae 1, Shigella flexneri 2a, or Salmonella typhimurium W118*. Infect Immun, 1981. **32**(1): p. 137-44.
169. Barzu, S., et al., *Functional analysis of the Shigella flexneri lpaC invasin by insertional mutagenesis*. Infect Immun, 1997. **65**(5): p. 1599-605.
170. De Geyter, C., et al., *Purification of lpaC, a protein involved in entry of Shigella flexneri into epithelial cells and characterization of its interaction with lipid membranes*. FEBS Lett, 1997. **400**(2): p. 149-54.
171. De Geyter, C., et al., *Characterization of the interaction of lpaB and lpaD, proteins required for entry of Shigella flexneri into epithelial cells, with a lipid membrane*. Eur J Biochem, 2000. **267**(18): p. 5769-76.
172. Bligh, E.G. and W.J. Dyer, *A rapid method of total lipid extraction and purification*. Can J Biochem Physiol, 1959. **37**(8): p. 911-7.
173. Van Veldhoven, P.P. and G.P. Mannaerts, *Inorganic and organic phosphate measurements in the nanomolar range*. Anal Biochem, 1987. **161**(1): p. 45-8.
174. Loomis, C.R., J.P. Walsh, and R.M. Bell, *sn-1,2-Diacylglycerol kinase of Escherichia coli. Purification, reconstitution, and partial amino- and carboxyl-terminal analysis*. J.Biol.Chem., 1985. **260**(7): p. 4091-4097.
175. Walsh, J.P. and R.M. Bell, *sn-1,2-Diacylglycerol kinase of Escherichia coli. Mixed micellar analysis of the phospholipid cofactor requirement and divalent cation dependence*. J.Biol.Chem., 1986. **261**(14): p. 6239-6247.
176. Schneider, E.G. and E.P. Kennedy, *Partial purification and properties of diglyceride kinase from Escherichia coli*. Biochim.Biophys.Acta, 1976. **441**(2): p. 201-212.
177. Bohnenberger, E. and H. Sandermann, *Diglyceride kinase from Escherichia coli. Modulation of enzyme activity by glycosphingolipids*. Biochim.Biophys.Acta, 1982. **685**(1): p. 44-50.
178. Stubbs, G.W., H.G. Smith, Jr., and B.J. Litman, *Alkyl glucosides as effective solubilizing agents for bovine rhodopsin. A comparison with several commonly used detergents*. Biochim Biophys Acta, 1976. **426**(1): p. 46-56.
179. Jackson, M.L., et al., *Solubilization of phosphatidylcholine bilayers by octyl glucoside*. Biochemistry, 1982. **21**(19): p. 4576-4582.
180. Lichtenberg, D., R.J. Robson, and E.A. Dennis, *Solubilization of phospholipids by detergents. Structural and kinetic aspects*. Biochim.Biophys.Acta, 1983. **737**(2): p. 285-304.
181. Walsh, J.P. and R.M. Bell, *sn-1,Escherichia coli 2-Diacylglycerol Kinase of Escherichia coli Structural And Kinetic Analysis of the Lipid Cofactor Dependence*. J.Biol.Chem., 1986. **261**(32): p. 15062-15069.
182. Park, S.K., et al., *Cloning and Characterization of Phospholipase D from Rat Brain*. J.Biol.Chem., 1997. **272**(46): p. 29263-29271.
183. Momchilova, A. and T. Markovska, *Phosphatidylethanolamine and phosphatidylcholine are sources of diacylglycerol in ras-transformed NIH 3T3 fibroblasts*. Int.J.Biochem.Cell Biol., 1999. **31**(2): p. 311-318.

184. Seishima, M., et al., *Phosphatidylcholine-specific phospholipase C, but not phospholipase D, is involved in pemphigus IgG-induced signal transduction*. Arch.Dermatol.Res., 1999. **291**(11): p. 606-613.
185. Venkatesan, M.M., et al., *Complete DNA sequence and analysis of the large virulence plasmid of Shigella flexneri*. Infect Immun, 2001. **69**(5): p. 3271-85.
186. Nie, H., et al., *Complete genome sequence of Shigella flexneri 5b and comparison with Shigella flexneri 2a*. BMC Genomics, 2006. **7**: p. 173.
187. *Orthologs of the MG1655 proteomes in Sf8401 and Sf301*.
188. van Blitterswijk, W.J. and B. Houssa, *Properties and functions of diacylglycerol kinases*. Cell Signal, 2000. **12**(9-10): p. 595-605.
189. Goto, K., et al., *Lipid messenger, diacylglycerol, and its regulator, diacylglycerol kinase, in cells, organs, and animals: history and perspective*. Tohoku J Exp Med, 2008. **214**(3): p. 199-212.
190. Imai, S., et al., *Identification and characterization of a novel human type II diacylglycerol kinase, DGK kappa*. J Biol Chem, 2005. **280**(48): p. 39870-81.
191. Sanjuan, M.A., et al., *Role of diacylglycerol kinase alpha in the attenuation of receptor signaling*. J Cell Biol, 2001. **153**(1): p. 207-20.
192. Sanjuan, M.A., et al., *T cell activation in vivo targets diacylglycerol kinase alpha to the membrane: a novel mechanism for Ras attenuation*. J Immunol, 2003. **170**(6): p. 2877-83.
193. Luo, B., S.M. Prescott, and M.K. Topham, *Protein kinase C alpha phosphorylates and negatively regulates diacylglycerol kinase zeta*. J Biol Chem, 2003. **278**(41): p. 39542-7.
194. Topham, M.K., et al., *Protein kinase C regulates the nuclear localization of diacylglycerol kinase-zeta*. Nature, 1998. **394**(6694): p. 697-700.
195. Waggoner, D.W., et al., *MuLK, a eukaryotic multi-substrate lipid kinase*. J Biol Chem, 2004. **279**(37): p. 38228-35.
196. Tang, X., et al., *Role of phospholipase C and diacylglyceride lipase pathway in arachidonic acid release and acetylcholine-induced vascular relaxation in rabbit aorta*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2006. **290**(1): p. H37-45.
197. Keenan, C. and D. Kelleher, *Protein kinase C and the cytoskeleton*. Cell Signal., 1998. **10**(4): p. 225-232.
198. Raetz, C.R. and K.F. Newman, *Neutral lipid accumulation in the membranes of Escherichia coli mutants lacking diglyceride kinase*. J.Biol.Chem., 1978. **253**(11): p. 3882-3887.
199. Huijbregts, R.P.H., A.I.P.M. de-Kroon, and B. de-Kruijff, *Topology and transport of membrane lipids in bacteria*. Biochim.Biophys.Acta, 2000. **1469**: p. 43-61.
200. Zhou, Y., et al., *Inactivation mechanism of the membrane protein diacylglycerol kinase in detergent solution*. Protein Sci., 2001. **10**(2): p. 378-383.
201. Czerski, L. and C.R. Sanders, *Functionality of a membrane protein in bicelles*. Anal.Biochem., 2000. **284**(2): p. 327-333.
202. Silbert, D.F., *Genetic modification of membrane lipid*. Annu Rev Biochem, 1975. **44**: p. 315-39.
203. Yamagami, A., T. Yoshioka, and Y. Kanemasa, *Differences in phospholipid composition between wild strains and streptomycin resistant mutants of certain enteric bacteria*. Jpn J Microbiol, 1970. **14**(2): p. 174-6.
204. Kanemasa, Y., Y. Akamatsu, and S. Nojima, *Composition and turnover of the phospholipids in Escherichia coli*. Biochim Biophys Acta, 1967. **144**(2): p. 382-90.
205. Raetz, C.R., *Enzymology, genetics, and regulation of membrane phospholipid synthesis in Escherichia coli*. Microbiol Rev, 1978. **42**(3): p. 614-59.
206. van Golde, L.M., *Metabolism of membrane phospholipids and its relation to a novel class of oligosaccharides in Escherichia coli*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1973. **70**(5): p. 1368-72.
207. Kennedy, E.P., *Osmotic regulation an the biosynthesis of membrane-derived oligosaccharides in Escherichia coli*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1982. **79**: p. 1092-1095.
208. Kennerly, D.A., C.W. Parker, and T.J. Sullivan, *Use of diacylglycerol kinase to quantitate picomole levels of 1,2-diacylglycerol*. Anal.Biochem., 1979. **98**(1): p. 123-131.

209. Walsh, J.P., L. Fahrner, and R.M. Bell, ***sn-1,2-Diacylglycerol Kinase of Escherichia coli Diacylglycerol Analogues Define Specificity And Mechanism***. J.Biol.Chem., 1990. **265**(8): p. 4374-4381.
210. Löffler, G. and P.E. Petrides, *Bioenergetik und Enzymologie*, in *Biochemie und Pathobiochemie*. 1997. p. 84-105.
211. Badola, P. and C.R. Sanders, *Escherichia coli diacylglycerol kinase is an evolutionarily optimized membrane enzyme and catalyzes direct phosphoryl transfer*. J.Biol.Chem., 1997. **272**(39): p. 24176-24182.
212. Bohnenberger, E. and H. Sandermann, *Lipid Dependence of Diacylglycerol Kinase from Escherichia coli*. Eur.J.Biochem., 1983. **132**: p. 645-650.
213. Exton, J.H., *Phosphatidycholine breakdown and signal transduction*. Biochim.Biophys.Acta, 1994. **1212**: p. 26-42.
214. Kaur, T., et al., *Calcium and protein kinase C play a significant role in response to Shigella toxin in rabbit ileum both in vivo and in vitro*. Biochim.Biophys.Acta, 1997. **1361**: p. 75-91.

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Bakterienmembran	49
Abb. 2: Zeitabhängigkeit der DAG-Kinase Reaktion	50
Abb. 3: Temperaturabhängigkeit der DAG-Kinase (17° C, 20° C, 23° C)	51
Abb. 4: Temperaturabhängigkeit der DAG-Kinase (25° C, 30° C)	51
Abb. 5: Phosphattransfer auf DAG in Abhängigkeit von der Menge nicht radioaktiven ATP	52
Abb. 6: Negativkontrolle	53
Abb. 7: Kontaminationsausschluß des ATP	53
Abb. 8: Additionsexperiment	54
Abb. 9: Subtraktionsexperiment	54
Abb. 10: Kontaminationsausschluß des 2X Reaktionspuffers	55
Abb. 11: Cardiolipin als Substrat der DAG-Kinase	56
Abb. 12: Einfluss des CHCl ₃ / CH ₃ OH-Mischungsverhältnisses auf die Aktivität der DAG-Kinase	56
Abb. 13: PL- Fraktionen im Pellet und im Überstand	57
Abb. 14: Infektionskinetik 1	58
Abb. 15: Infektionskinetik 2	58
Abb. 16: Strukturformel Cardiolipin	72

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Vorbereitung der HeLa-Zellen für die Aktinfärbung	31
Tabelle 2: Pipettierung der für Proteinnormalisation vorgesehenen Proben	34
Tabelle 3: Zusammensetzung des Reaktionsansatzes	35
Tabelle 4: Mischungsverhältnisse CHCl_3 : CH_3OH	40
Tabelle 5: Negativkontrolle	42
Tabelle 6: ATP-Versuch	43
Tabelle 7: Kontaminationsausschluß ATP	44
Tabelle 8: Additionsexperiment	45
Tabelle 9: Subtraktionsexperiment	46
Tabelle 10: Kontaminationsausschluß 2X Reaktionspuffer	47
Tabelle 11: Massenverhältnisse Cardiolipin und DAG	47
Tabelle 12: Testlösungen Cardiolipinversuch	48

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version der meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Erklärung

„Ich, Hendrik Güthenke, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: »Etablierung einer Methode zum Nachweis von Diacylglycerol, einem Signalisationsmediator mit potenzieller Funktion bei der Epithelzellinvasion durch *E. coli* Shigella« selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum

Unterschrift

Danksagung

Ich danke Hr. Prof. Dr. Dr. Ulf B. Göbel für die Möglichkeit, dass ich am Institut für Mikrobiologie und Hygiene der Charité Berlin zum Zweck der Promotion wissenschaftlich arbeiten dürfte.

Herrn Priv. Doz. Dr. Thomas Adam danke ich besonders für die intellektuelle und praktische Unterstützung bei der täglichen Arbeit im Labor. Besonders wertvoll war die stets konstruktive Kritik. Sein umfangreiches theoretisches und praktisches Fachwissen, an dem er mich immer teilhaben ließ, war unabdingbare Voraussetzung für den Abschluss dieser Arbeit.

Frau Anke Friedrich half stets bei der Erlangung der notwendigen handwerklichen Fertigkeiten mit besonderer Geduld. Auch ihr gilt mein Dank.

Die Promovenden Bastian Schmidt, Elmira Far, Jörg Lang, Veronika Gohlke, Stefan Höhne und Moussa Abba waren wichtige Begleiter im Alltag und sorgten für eine außerordentlich gute Arbeitsatmosphäre.

Meiner Frau Claudia, meinen Eltern Angelika und Jürgen sowie meinem Bruder Oliver danke ich für den privaten Rückhalt.