

**Institut für Biochemie und Biologie**  
Abteilung Zellbiologie

**Molekulare Charakterisierung des Centrosom-assoziierten  
Proteins CP91 in *Dictyostelium discoideum***

-Dissertation-  
zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften  
"doctor rerum naturalium"  
(Dr. rer. nat.)

Vorgelegt der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Universität Potsdam von

Sascha Putzler



Oktober 2016

Online veröffentlicht auf dem  
Publikationsserver der Universität Potsdam:  
URN urn:nbn:de:kobv:517-opus4-394689  
<http://nbn-resolving.de/urn:nbn:de:kobv:517-opus4-394689>

## **Ehrenwörtliche Versicherung**

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt habe. Andere als die in der Dissertation angegebenen Hilfsmittel wurden nicht benutzt. Die Dissertation wurde in dieser oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht.

Sascha Putzler

Potsdam, Oktober 2016

## **Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht oder sind eingereicht:**

**Schulz I, Erle A, Gräf R, Krüger A, Lohmeier H, Putzler S, Samereier M, Weidenthaler S** (2009). "Identification and cell cycle-dependent localization of nine novel, genuine centrosomal components in *Dictyostelium discoideum*." Cell Motil Cytoskeleton 66 (11):915-928

**Putzler Sascha, Meyer Irene, Gräf Ralph** (2016). "CP91 is a component of the *Dictyostelium* centrosome involved in centrosome biogenesis." European Journal of Cell Biology 95 (3-5): 124-35.

## **Zusätzliches Material das die beigefügte CD enthält**

Alle Filme sind im .mov- Format auf der beiliegenden CD verfügbar. Gezeigt sind maximale

Intensitätsprojektionen mikroskopischer Aufnahmen.

Film 1: Video-Mitose1 (Abbildung 20)

Film 2: Video-Mitose2 (Abbildung 21)

Film 3: Video-Mitose3 (Abbildung 22)

Film 4: Video-Mitose4 (Abbildung 29)

Film 5: Video-Mitose5 (Abbildung 46)

Film 6: Video-Mitose6 (Abbildung 47)

Film 7: Video-Mitose7 (Abbildung 48)

Die CD enthält außerdem noch eine digitale Kopie dieser Arbeit mit hochauflösenden Abbildungen

# Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	01
Abbildungsverzeichnis	04
Zusammenfassung	06
Abstract	07
1 Einleitung	08
1.1 Evolutionäre Stellung des Modellorganismus <i>Dictyostelium</i>	08
1.2 Die Centrosomenbiogenese	09
1.3 Ziele der Arbeit	14
2 Ergebnisse	15
2.1 Charakterisierung des centrosomalen Proteins CP91 in <i>Dictyostelium</i>	15
2.1.1 <i>In silico</i> Analyse der CP91 Sequenz	15
2.1.2 Herstellung eines polyklonalen CP91-Antikörpers und Western Blot Analyse von CP91	18
2.1.3 CP91 ist ein neues centrosomales Protein der Core-Region	19
2.1.4 Untersuchung des endogenen CP91	20
2.1.5 Das GFP-Fusionsprotein zeigt eine ähnliche Dynamik im Zellzyklus wie das endogene CP91	22
2.1.6 GFP-CP91 zeigt keine signifikante Mobilität am Centrosom	26
2.1.7 Die Überexpression von GFP-CP91 führt zu überzähligen Centrosomen	27
2.1.8 GFP-CP91 Überexpression führt zu einem Karyokinesedefekt	32
2.1.9 GFP-CP91 Überexpression zeigt ein verändertes Wachstumsverhalten	35
2.1.10 Die überzähligen Centrosomen entstehen während der Mitose	36
2.1.11 Die GFP-CP91 Überexpression führt zur fehlerhaften Segregation von Chromosomen in der Mitose	39
2.1.12 Herstellung von GFP-CP91 Deletionsfragmenten	40
2.1.13 GFP-CP91-N-Terminus verbleibt während der gesamten Mitose am Centrosom	42
2.1.14 GFP-CP91cc verursacht cytosolische Cluster	45
2.1.15 GFP-CP91-C-Terminus zeigt eine diffuse cytosolische Lokalisation	47
2.1.16 Die Überexpression der CP91 Deletionsfragmente zeigen einen ähnlichen Phänotyp wie das CP91 Volllängenprotein	49
2.1.17 Herstellung einer CP91-RNAi Mutante	51
2.1.18 Die CP91-RNAi Zellen zeigen eine verminderte Expression der centrosomalen Core-Proteine CP55 und CP39	54
2.1.19 Die CP91-RNAi Zellen zeigen eine verminderte Expression von CEP192	56
2.1.20 CP91-Verlust beeinflusst die Organisation der Centromere in der Interphase	57
2.1.21 CP91-RNAi führt zu Störung der Centrosomen-Zellkern-Centromer-Verbindung	58
2.1.22 CP91-RNAi führt zu überzähligen kernassoziierten Centrosomen	59
2.1.23 CP91-RNAi zeigt eine erhöhte Ploidie	62

2.1.24	CP91-RNAi führt, wie die Überexpression, zu starken Wachstumsdefekten	65
2.1.25	CP91 spielt eine Rolle bei der Cytokinese und dem Spindelaufbau	66
3	Diskussion	72
3.1	CP91 ist ein Bestandteil der inneren Schicht der Core-Region	72
3.2	Domänenanalyse, Regulation und Bindungsverhalten von CP91	72
3.3	CP91 beeinflusst die Stabilität der Centrosom-Zellkern-Centromer-Verbindung	76
3.4	Die Wege zur Vervielfältigung der Centrosomen	78
3.5	Kernassoziierte überzählige Centrosomen als Ursache für erhöhte Ploidie	81
3.6	CP91 spielt eine wichtige Rolle bei der Cytokinese	82
3.7	Schlussfolgerungen	84
4	Material und Methoden	85
4.1	Reagenzien, Antikörper und andere Materialien	85
4.1.1	Chemikalien, Reagenzien, Antibiotika	85
4.1.2	Antikörper	85
4.1.3	Enzyme und Polymerasen	85
4.1.4	Allgemeine Puffer und Lösungen	86
4.1.5	Verwendete Plasmide	87
4.1.6	Bakterien Stämme	87
4.1.7	Dictyostelium Stämme	87
4.1.8	Verwendete Software und Online Programme	87
4.2	Molekularbiologische Methoden	88
4.2.1	Verwendete Oligonukleotide	88
4.2.2	Polymerase Kettenreaktion (PCR)	88
4.2.3	RNA-Präparation aus Dictyostelium-Zellen	89
4.2.4	Reverse-Transkriptase-PCR (RT-PCR)	89
4.2.5	Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten	89
4.2.6	Aufreinigung von PCR Produkten, DNA-Fragmenten sowie DNA Extraktion aus Agarosegelen	90
4.2.7	DNA-Verdau durch Restriktionsendonukleasen	90
4.2.8	Dephosphorylierung von DNA-Enden	90
4.2.9	Ligation und Transformation von DNA-Fragmenten in <i>E.coli</i>	90
4.2.10	Mini- und Midi-Plasmid Präparation aus <i>E.coli</i>	91
4.2.11	Bestimmung der DNA-Konzentration	91
4.2.12	Präparation genomischer DNA aus <i>E.coli</i>	91
4.2.13	Herstellung chemisch kompetenter <i>E.coli</i>	91
4.2.14	Retransformation eines Plasmids in <i>E.coli</i>	92
4.2.15	Transformation von DNA in <i>Dictyostelium</i> (Elektroporation)	92
4.2.16	Herstellung der verwendeten Plasmide und Dictyostelium Stämme	93

4.3	Biochemische Methoden	96
4.3.1	Gewinnung von Proteinproben aus <i>Dictyostelium</i> Zellen	96
4.3.2	Bestimmung der Protein Konzentration	96
4.3.3	Proteinpräzipitation mit Methanol/Chloroform und Trichloressigsäure	96
4.3.4	Proteinauftrennung mit Hilfe von SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	97
4.3.5	Coomassie R250 Färbung von SDS-Gelen	98
4.3.6	Silberfärbung von SDS-Gelen	98
4.3.7	Western Blot und Immundetektion von Proteinen	98
4.3.8	Densitometrische Bestimmung der Expressionsstärke von Proteinen	99
4.3.9	Isolierung von <i>Dictyostelium</i> Kernen und Centrosomen	99
4.3.10	Expression von Fusionsproteinen in Bakterien	100
4.3.11	Aufreinigung bakteriell exprimierter Proteine (MBP-Fusionsproteine)	101
4.3.12	Herstellung von polyklonalen Antisera aus Kaninchen	101
4.3.13	Aufreinigung von Antikörpern	101
4.4	Zellbiologische Methoden	102
4.4.1	Kultivierung und Konservierung von <i>E.coli</i>	102
4.4.2	Kultivierung und Konservierung von <i>K.aerogenes</i>	102
4.4.3	Kultivierung und Konservierung von <i>Dictyostelium</i> Zellen	102
4.4.4	Wachstumsversuch	103
4.5	Mikroskopische Methoden	104
4.5.1	Fixierung und indirekte Immunfluoreszenz von <i>Dictyostelium</i> Zellen	104
4.5.2	Weitfeld- und konfokale Spinning-Disk-Mikroskopie	105
4.5.3	FRAP-Experiment ( <i>Fluorescence Recovery after Photobleaching</i> )	105
4.5.4	Bestimmung des DNA-Gehalts von <i>Dictyostelium</i> Zellen	106
4.5.5	Bestimmung der Zellfläche von <i>Dictyostelium</i> Zellen	106
5	Literaturverzeichnis	107
	Lebenslauf	111
	Danksagungen	112

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Phylogenetischer Baum des Lebens und der Eukaryoten	8
Abbildung 2:	Centrosomentypen und Centrosomenzyklus	11
Abbildung 3:	Vorhersage der coiled-coil Regionen von CP91	15
Abbildung 4:	Vorhersage potentieller funktioneller Sequenzen von CP91	18
Abbildung 5:	Western Blot Analyse	19
Abbildung 6:	Untersuchung isolierter Centrosomen aus GFP-CP91 Zellen	20
Abbildung 7:	Lokalisation des endogenen CP91 Proteins während des Zellzyklus	21
Abbildung 8:	Negativkontrolle des GFP-Booster Atto488	22
Abbildung 9:	Lokalisation des GFP-CP91 Fusionsproteins während des Zellzyklus	23
Abbildung 10:	Metaphasestadium einer GFP-CP91 überexprimierenden Zelle und anormale Interphasecentrosomen	24
Abbildung 11:	Asynchrone Mitosephasen und multipolare Spindeln in GFP-CP91 Zellen	25
Abbildung 12:	GFP-CP91 zeigt keine Mobilität im Interphasecentrosom	26
Abbildung 13:	Die Überexpression von GFP-CP91 führt zu überzähligen Centrosomen	27
Abbildung 14:	Verteilung centrosomaler Markerproteine in adhärent wachsenden GFP-CP91 Zellen	30
Abbildung 15:	Phänotypauswertung der GFP-CP91 Überexpression	31
Abbildung 16:	GFP-CP91 Überexpression führt zu einer erhöhten Ploidie	33
Abbildung 17:	Untersuchung der Zellfläche/Größenverteilung der GFP-CP91 Überexpression	34
Abbildung 18:	Ungeclusterte Centromere in anormalen GFP-CP91 Zellen	34
Abbildung 19:	Wachstumsverhalten von GFP-CP91 Zellen	36
Abbildung 20:	Überzählige Centrosomen entstehen während der Mitose	37
Abbildung 21:	Entstehung anormaler Centrosomen in GFP-CP91 Zellen	38
Abbildung 22:	Fehlerhafte Chromosomensegregation in GFP-CP91 Zellen	39
Abbildung 23:	Hergestellte N-terminale GFP-Konstrukte	40
Abbildung 24:	Western Blot Analyse der GFP-Konstrukte	41
Abbildung 25:	Lokalisation des GFP-CP91 N-Terminus Fusionsproteins während des Zellzyklus	42
Abbildung 26:	Verteilung centrosomaler Markerproteine in GFP-CP91N Zellen	43
Abbildung 27:	Lokalisation des GFP-CP91cc Fusionsproteins während des Zellzyklus	44
Abbildung 28:	GFP-CP91cc verursacht cytosolische Cluster	45
Abbildung 29:	Mitose einer GFP-CP91cc exprimierenden Zelle	46
Abbildung 30:	Diffuse Lokalisation des GFP-CP91 C-Terminus Fusionsproteins	47
Abbildung 31:	Lokalisation des GFP-CP91 C-Terminus Fusionsproteins während des Zellzyklus	48
Abbildung 32:	Die N-terminalen GFP-Konstrukte verursachen überzählige freie und überzählige kernassozierte Centrosomen	49
Abbildung 33:	Vergleichende Phänotypauswertung des GFP-CP91 N-Terminus / GFP-CP91cc / GFP-CP91 C-Terminus	51

Abbildung 34:	Untersuchung der Expressionsstärke von CP91 im CP91-RNAi	53
Abbildung 35:	CP91-RNAi Zellen zeigen eine verminderte Expression der centrosomalen Core-Proteine CP55 und CP39	55
Abbildung 36:	CP91-RNAi Zellen zeigen eine verminderte Expression von CEP192	56
Abbildung 37:	CP91-RNAi hat einen Einfluss auf Cenp68 in der Interphase	57
Abbildung 38:	CP91-RNAi führt zu Störung der Centrosomen-Zellkern-Centromer-Verbindung	59
Abbildung 39:	CP91-RNAi führt zu überzähligen kernassoziierten Centrosomen	60
Abbildung 40:	Vergleichende Phänotypauswertung des CP91-RNAi	61
Abbildung 41:	Auftreten riesiger Zellen und Cytoplasten im CP91-RNAi	63
Abbildung 42:	CP91-RNAi führt zu einer erhöhten Ploidie	64
Abbildung 43:	Wachstumsverhalten des CP91-RNAi	65
Abbildung 44:	CP91 spielt eine Rolle bei der Cytokinese	66
Abbildung 45:	Metaphasestadien des CP91-RNAi mit starken Spindeldefekten	67
Abbildung 46:	Fehlschlagen der Spindelbildung bei lebenden GFP- $\alpha$ -Tubulin/CP91-RNAi Zellen	68
Abbildung 47:	Fehlschlagen der Cytokinese bei lebenden GFP- $\alpha$ -Tubulin/CP91-RNAi Zellen	69
Abbildung 48:	Fehlschlagen der Cytokinese bei lebenden GFP- $\alpha$ -Tubulin/CP91-RNAi Zellen	70
Abbildung 49:	Nach fehlgeschlagener Cytokinese, Tochterzellen bleiben verbunden mit dünnen interzellulären „Brücken“	71
Abbildung 50:	Aktueller Stand des Wissens	73

## Zusammenfassung

Das Dictyostelium-Centrosom ist ein Modell für acentrioläre Centrosomen. Es besteht aus einer dreischichtigen Kernstruktur und ist von einer Corona umgeben, welche Nukleationskomplexe für Mikrotubuli beinhaltet. Die Verdoppelung der Kernstruktur wird einmal pro Zellzyklus am Übergang der G2 zur M-Phase gestartet. Durch eine Proteomanalyse isolierter Centrosomen konnte CP91 identifiziert werden, ein 91 kDa großes Coiled-Coil Protein, das in der centrosomalen Kernstruktur lokalisiert. GFP-CP91 zeigte fast keine Mobilität in FRAP-Experimenten während der Interphase, was darauf hindeutet, dass es sich bei CP91 um eine Strukturkomponente des Centrosoms handelt. In der Mitose hingegen dissoziieren das GFP-CP91 als auch das endogene CP91 ab und fehlen an den Spindelpolen von der späten Prophase bis zur Anaphase. Dieses Verhalten korreliert mit dem Verschwinden der zentralen Schicht der Kernstruktur zu Beginn der Centrosomenverdopplung. Somit ist CP91 mit großer Wahrscheinlichkeit ein Bestandteil dieser Schicht. CP91-Fragmente der N-terminalen bzw. C-terminalen Domäne (GFP-CP91 N-Terminus, GFP-CP91 C-Terminus) lokalisieren als GFP-Fusionsproteine exprimiert auch am Centrosom, zeigen aber nicht die gleiche mitotische Verteilung des Volllängenproteins. Das CP91-Fragment der zentralen Coiled-Coil Domäne (GFP-CP91cc) lokalisiert als GFP-Fusionsprotein exprimiert, als ein diffuser cytosolische Cluster, in der Nähe des Centrosoms. Es zeigt eine partiell ähnliche mitotische Verteilung wie das Volllängenprotein. Dies lässt eine regulatorische Domäne innerhalb der Coiled-Coil Domäne vermuten. Die Expression der GFP-Fusionsproteine unterdrückt die Expression des endogenen CP91 und bringt überzählige Centrosomen hervor. Dies war auch eine markante Eigenschaft nach der Unterexpression von CP91 durch RNAi. Zusätzlich zeigte sich in CP91-RNAi Zellen eine stark erhöhte Ploidie verursacht durch schwere Defekte in der Chromosomensegregation verbunden mit einer erhöhten Zellgröße und Defekten im Abschnürungsprozess während der Cytokinese. Die Unterexpression von CP91 durch RNAi hatte auch einen direkten Einfluss auf die Menge an den centrosomalen Proteinen CP39, CP55 und CEP192 und dem Centromerprotein Cenp68 in der Interphase. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass CP91 eine zentrale centrosomale Kernkomponente ist und für den Zusammenhalt der beiden äußeren Schichten der Kernstruktur benötigt wird. Zudem spielt CP91 eine wichtige Rolle für eine ordnungsgemäße Centrosomenbiogenese und, unabhängig davon, bei dem Abschnürungsprozess der Tochterzellen während der Cytokinese.

## Abstract

The *Dictyostelium* centrosome is a model for acentriolar centrosomes and it consists of a three-layered core structure surrounded by a corona harboring microtubule nucleation complexes. Its core structure duplicates once per cell cycle at the G2/M transition. Through proteomic analysis of isolated centrosomes we have identified CP91, a 91-kDa coiled coil protein that was localized at the centrosomal core structure. While GFP-CP91 showed almost no mobility in FRAP experiments during interphase, both GFP-CP91 and endogenous CP91 dissociated during mitosis and were absent from spindle poles from late prophase to anaphase. Since this behavior correlates with the disappearance of the central layer upon centrosome duplication, CP91 is a putative component of this layer. When expressed as GFP-fusions, CP91 fragments corresponding to the N-terminal and C-terminal domain (GFP-CP91N, and GFP-CP91C respectively) also localized to the centrosome but did not show the mitotic redistribution of the full length protein. The CP91 fragment corresponding to the central coiled coil domain (GFP-CP91cc) localized as a diffuse cluster close to the centrosome and did show a partially similar mitotic redistribution of the full length protein suggesting a regulatory role of the coiled coil domain. Expression of all GFP-fusion proteins suppressed expression of endogenous CP91 and elicited supernumerary centrosomes. This was also very prominent upon depletion of CP91 by RNAi. CP91-RNAi cells exhibited heavily increased ploidy due to severe defects in chromosome segregation along with increased cell size and defects in the abscission process during cytokinesis. Additionally, depletion of CP91 by RNAi had an immediate impact on the amount of the centrosomal core components CP39, CP55 and CEP192 and the centromere protein Cenp68 in interphase cells. Our results indicate that CP91 is a central centrosomal core component required for centrosomal integrity, proper centrosome biogenesis and, independently, for abscission during cytokinesis.

# 1 Einleitung

## 1.1 Evolutionäre Stellung des Modellorganismus *Dictyostelium*

Unsere Sicht auf den phylogenetischen Baum des Lebens hat sich in den letzten Jahren stark verändert. Eine große Menge an molekularen Daten, insbesondere aus Sequenzierungen der ribosomalen RNA (rRNA), haben dazu beigetragen uns ein genaueres Bild von den Verwandtschaftsverhältnissen zu schaffen. Abbildung 1 A zeigt das vorherrschende Drei-Domänen-Modell, welches alle Lebewesen in drei Gruppen einordnet: Bacteria, Archaea und Eukaryota (Woese *et al.*, 1990). Ob die Archaea und Eukaryota von einem gemeinsamen Vorfahren abstammen, also Schwestergruppen sind, oder die Eukaryota aus den Archaea hervorgingen, wird noch debatiert (Williams *et al.*, 2013). Es gibt auch die Möglichkeit, dass der Ursprung des diversifizierten Lebens aus den Archaea hervorgeht (Caetano-Anolles *et al.*, 2014). In der Domäne der Eukaryota brachte der letzte gemeinsame eukaryotische Vorfahr (LECA) fünf Supergruppen hervor, die Excavata, SAR (Stramenopile, Alveolata, Rhizaria), Archaeplastida, Amoebozoa und Opisthokonta. Zusätzlich gibt es noch einige taxonomische Gruppen mit unsicherer Zuordnung, *incertae sedis* genannt (Adl *et al.*, 2012) (Abbildung 1 B). Diese werden auch als sechste Supergruppe CCTH (Cryptophyta, Centrohelida, Telonemia, Haptophyta) zusammengefasst (Walker *et al.*, 2011). Die Sammelgruppe der Amorphea vereint die beiden Schwestergruppen der Amoebozoa und Opisthokonta (letztere beinhaltet Pilze und vielzellige Tiere).

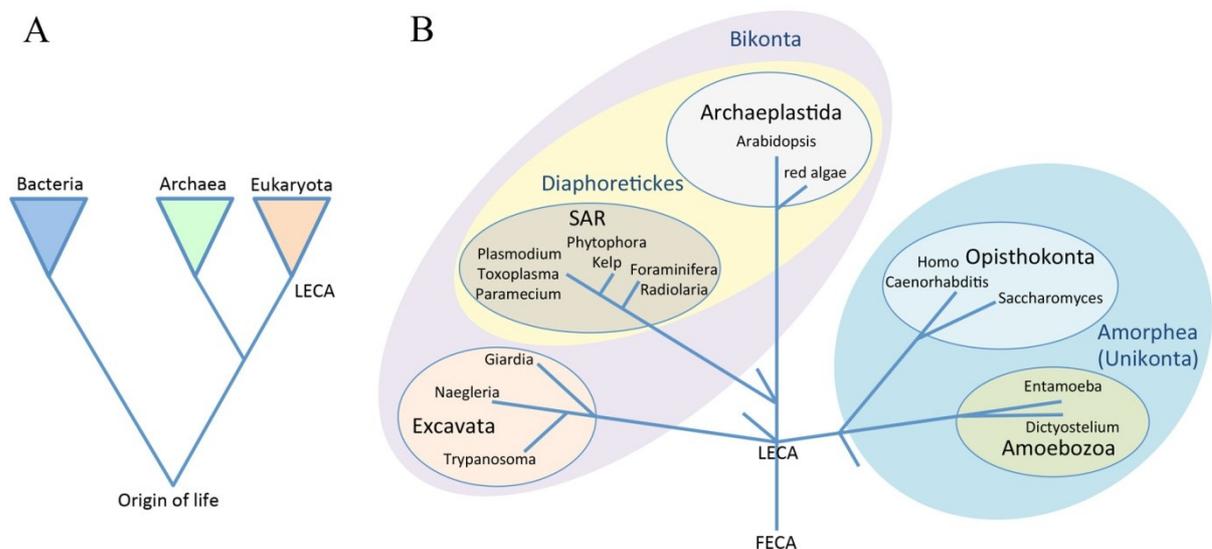


Abbildung 1: Phylogenetischer Baum des Lebens und der Eukaryoten. (A) Phylogenetischer Baum mit den drei Domänen, basierend auf den Sequenzen der rRNA; nach Pace (2006). (B) Gegenwärtige Sicht der eukaryotischen Evolution (Adl *et al.*, 2012). FECA/LECA = erster/letzter gemeinsamer eukaryotischer Vorfahr; SAR-CCTH = Stramenopile, Alveolata, Rhizaria + Cryptophyta, Centrohelida, Telonemia, Haptophyta. Die unvollständigen Verzweigungen deuten auf mutmaßliche Verzweigungspunkte von *incertae sedis* hin, d.h. taxonomischen Gruppen mit nicht gesicherter oder uneindeutiger Zuordnung.

In dieser Arbeit liegt der Schwerpunkt auf der Erforschung des Centrosoms. Im Verlauf der eukaryotischen Evolution sind verschiedene Centrosomentypen entstanden (Gräf *et al.*, 2015). Wenn man sich mit dem Vorkommen der bekannten Centrosomen beschäftigt, stellt man fest, dass dieses Zellorganell am häufigsten innerhalb der Amorphea vorkommt (Azimzadeh 2014). Das tierische Centrosom, der Spindelpolkkörper (SPB) der höheren Pilze und das oft auch als „nucleus-associated body“ (NAB) bezeichnete *Dictyostelium* Centrosom (Abbildung 2 A), findet man in den Amorphea. Trotz einer großen strukturellen Vielfalt zwischen den verschiedenen Centrosomentypen sind sie funktionell äquivalent und teilen einige ihrer molekularen Komponenten. Für die Erforschung des Centrosoms gibt es aber kaum Modelle außerhalb der Opisthokonten. Modelle wie der Mensch, die Hefen, *C.elegans*, *Drosophila* und *Xenopus* gehören alle zu dieser eukaryotischen Supergruppe (Akiyoshi and Gull, 2013). Es ist daher notwendig eine andere Supergruppe ausführlich zu untersuchen, um das wahre Ausmaß der verschiedenen konservierten Merkmale einzuschätzen und die grundlegenden funktionellen Voraussetzungen einer eukaryotischen Zelle aufzudecken. Aufgrund seiner evolutionären Stellung in der Schwesterguppe der Opisthokonten, den Amoebozoa, bietet sich *Dictyostelium* als bisher am besten charakterisierte Modellorganismus dieser Gruppe an, um die Struktur und Funktion von acentriolären Centrosomen zu untersuchen (Gräf, 2015). Das *Dictyostelium* Centrosom scheint alle bekannten centrosomalen Funktionen zu erfüllen, die Zilienbildung ausgenommen. Zudem ist *Dictyostelium* haploid. Diese intrinsische Eigenschaft erleichtert die Isolation und Charakterisierung neuer mutanter Phänotypen beträchtlich. Daher bietet dieser Organismus die Möglichkeit in der Vergleichenden Biologie alle Proteine zu identifizieren, welche für die centrosomalen Funktionen, wie Mikrotubuliorganisation, Centrosomenverdopplung, sowie für die Cytokinese essentiell sind.

### 1.2 Die Centrosomenbiogenese

In vielen existierenden Eukaryoten dient ein strukturell hoch organisiertes, membranfreies Zellorganell, Centrosom genannt, als Mikrotubuli-organisierendes Zentrum (MTOC). Durch die Fähigkeit Mikrotubuli zu organisieren ist das Centrosom die Ausgangsbasis für alle Funktionen, welche des Mikrotubuli-Cytoskelett betreffen. Das beinhaltet den Vesikeltransport, die Positionierung von Zellorganellen und die Schaffung bzw. Beibehaltung der Zellpolarität bei gerichteten Zellbewegungen. (Schatten *et al.*, 2010; Bornens, 2012). Während der Mitose besitzt das Centrosom eine Schlüsselrolle bei der Organisation des Spindelapparates und der Cytokinese. In letzterer bestimmt es die Position der Teilungsfurche und beteiligt sich an der Trennung (Abzission) der beiden Tochterzellen (Normand und King,

2010). In tierischen Zellen und mehreren anderen Organismen, insbesondere jene mit Zilien oder Flagellen, ist das Centrosom durch ein Paar von Centriolen gekennzeichnet. Diese Centriolen sind Hohlzylinder aus Mikrotubuli und zeigen eine charakteristische symmetrische Struktur mit neun mhlradartig angeordneten, aus jeweils drei Mikrotubuli bestehenden, peripheren Triplets. Die Centriolen sind in eine amorphe pericentriolare Matrix (PCM) eingebettet. Diese Matrix ist hoch dynamisch und besitzt einen hohen Anteil an coiled-coil Proteinen. Coiled-coils sind Proteinstrukturmotive bei denen zwei bis drei  $\alpha$ -Helices umeinander zu einer Mehrfachhelix verwunden sind. Während kurze coiled-coil Domänen an Proteininteraktionen beteiligt sind, wie zum Beispiel bei Transkriptionsfaktoren, können lange coiled-coil Domänen lange stabförmige Strukturen bilden. Diese befinden sich in Gerüst- oder auch Motorproteinen. Durch eine hierarchische Rekrutierung von einer kleinen Anzahl großer coiled-coil Proteine an die Centriolen bekommt diese PCM eine klare Organisation und Struktur (Mennella *et al.*, 2012; Lawo *et al.*, 2012). Die Centriolen gewährleisten somit die Stabilität und die Verdopplung der Centrosomen, während die PCM die Mikrotubuli-nukleierenden Komplexe und Zellzyklusregulatoren verankert. Die Verdopplung der Centrosomen ist mit der S-Phase synchronisiert. Sie beginnt mit dem Wachstum der Tochter-Centriolen in der S-Phase in unmittelbarer Nähe, rechtwinklig zu den bereits vorhanden Centriolen (Nigg 2011, Azimzadeh *et al.*, 2007), und wird durch Cdk2 und *Polo-like* Kinase 4 (Plk4) reguliert. Es findet zudem eine sequentielle Rekrutierung verschiedener Protein an die zwei älteren Mutter-Centriolen statt. Darunter befinden sich Proteine Cep152, Plk4, Cep135, hSAS-6 und CPAP. Es bildet sich mit SAS6, BLd10/Cep135 Centrin eine Cartwheel-Struktur aus. Diese bildet einen zentralen „Hub“ und neun Speichen mit den am Ende befindlichen „Pinheads“. (Avidor-Reiss *et al.*, 2015; Hirono, 2014). An den Pinheads lokalisiert SAS-4, welches  $\gamma$ -Tubulin-Ring-Komplexe ( $\gamma$ -TuRC) bindet. Danach erfolgen die Nukleation und das Längenwachstum der Centriol-Mikrotubuli von den  $\gamma$ -TuRC aus. Am Ende der G2-Phase vergrößert sich die PCM und die Aktivität der Mikrotubuli-Nukleation erhöht sich in Vorbereitung auf die Mitose. Weitere  $\gamma$ -TuRC werden durch NEDD1/GCP-WD an Gerüstproteine in der PCM gebunden. Drei Gerüstproteine sind in diesem Zusammenhang bislang untersucht worden, D-PLP/Pericentrin, D-SPD-2/Cep192 und Cnn/Cep215/Cdk5Rap2 (Haren *et al.*, 2009; Dichtenberg *et al.*, 1998; Fong *et al.*, 2008).

Die morphologisch variantenreicheren acentriolren Centrosomen finden sich in Pilzen und niederen Eukaryoten. Beispiele sind der Spindelpolkkrper (SPB) der Bäckerhefe oder auch das *Dictyostelium* Centrosom (Abbildung 2 A). Es gibt hier keine Centriolen. Stattdessen

## Einleitung

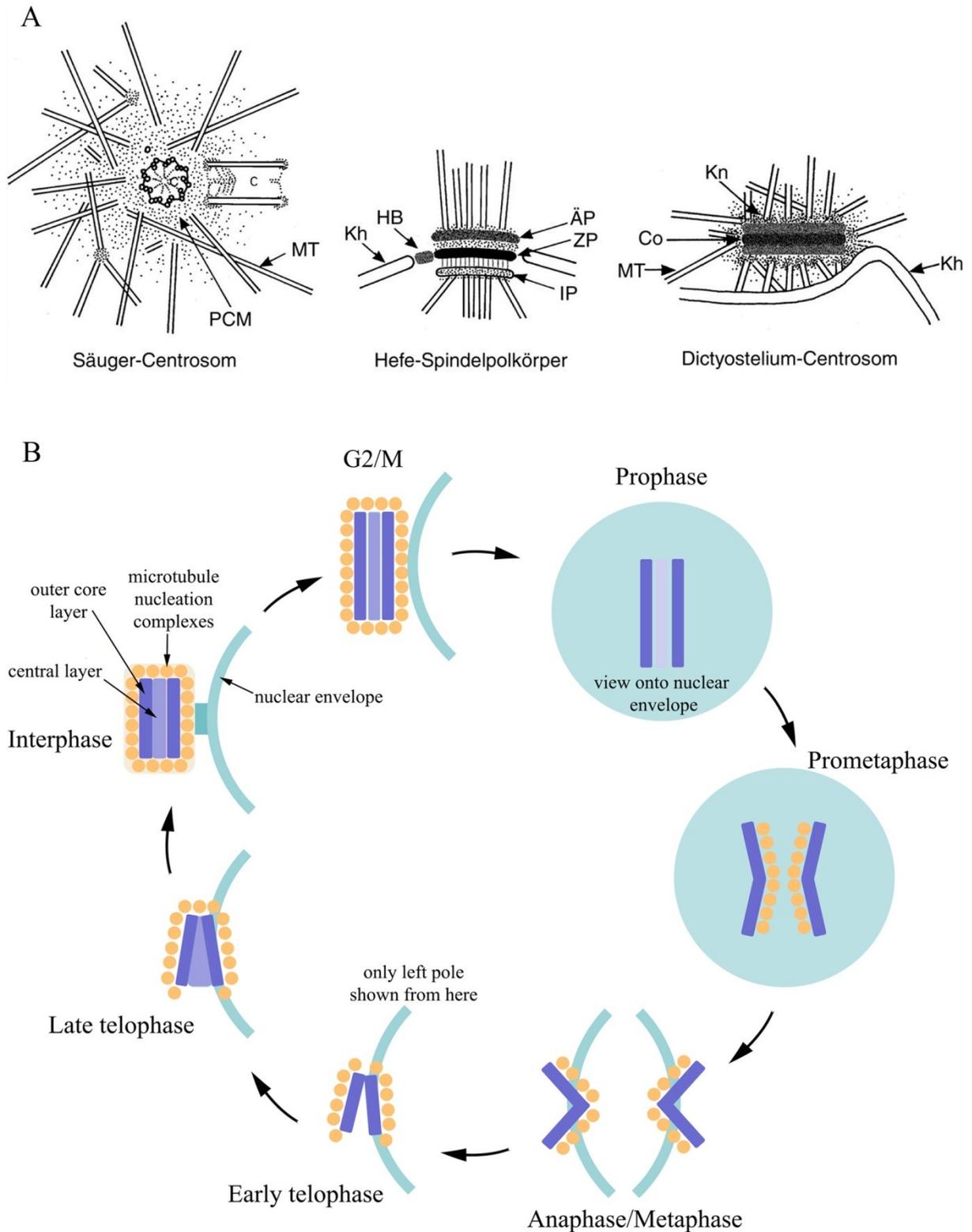


Abbildung 2: Centrosomentypen und Centrosomenzyklus. (A) Typen von Centrosomen in verschiedenen Organismen. Abkürzungen: C, Centriol; PCM, pericentriolare Matrix; MT, Mikrotubuli; Kh, Kernhülle; HB, "Half-Bridge"; ÄP, äußerer Plaque; ZP, zentraler Plaque; IP, innerer Plaque; Co, Corona; Kn, "Knötchen". Modifiziert nach Dauderer *et al.* (1999). (B) Überblick über den Centrosomenzyklus in *Dictyostelium*. Eine Legende der dargestellten Strukturen ist im Interphasestadium gegeben. In der Telophase wird nur ein Spindelpol gezeigt. Die Mikrotubuli, welche den Mikrotubuli-Nukleationskomplexen entspringen, wurden aus Gründen der besseren Übersichtlichkeit weggelassen. Der detaillierte Prozess wird im Text beschrieben. Abbildung ist neu erstellt und basiert auf Ueda *et al.* 1999.

besitzt der permanent in der Kernhülle eingebettete SPB der Bäckerhefe (*Saccharomyces cerevisiae*) eine dreischichtige elektronendichte Struktur. Die stapelförmige Struktur besteht aus drei großen Protein-Plaques (Jaspersen und Winey, 2004). Die inneren und äußeren Plaques bestehen hauptsächlich aus Mikrotubuli-nukleierenden Komplexen und sind durch andere Proteine mit dem zentralen Plaque verbunden. Sie bilden ein sehr einfaches intranukleäres und extranukleäres Mikrotubuli-Zytoskelett, welches für die Kernpositionierung und die Centrosomensegregation während der Mitose benötigt werden. Während der SPB-Verdopplung bildet sich ein neuer SPB *de novo* an der sogenannten Half-Bridge an der Kernhülle neben dem alten SPB. Dieser Prozess ähnelt der Bildung einer neuen Centriole an der Seite der alten Mutter-Centriole (Jaspersen und Winey, 2004). Zuerst erscheint ein neuer zentraler Plaque, welcher sich in die Kernhülle integriert und anschließend die Mikrotubuli-nukleierenden Komponenten der inneren und äußeren Plaques rekrutiert.

Das *Dictyostelium* Centrosom befindet sich, wie die Centrosomen in tierischen Zellen, im Cytosol und ist mit der Kernhülle assoziiert. Solche Centrosomen sind in vegetativen Zellen normalerweise eng mit der Kernhülle durch LINC-Komplexe (engl.: linker of nucleoskeleton and cytoskeleton) verbunden. Diese bestehen aus einem SUN Protein in der inneren Kernmembran und einem KASH-Domain-Protein in der äußeren Kernmembran (Crisp *et al.*, 2006). Sie besitzen aber keine Centriolen, bestehen dafür in der Interphase aus einer dreischichtigen Core-Region. Diese ist von einer elektronendichten, amorphen Corona umgeben, in die Mikrotubuli eingebettet sind. An deren Basis sitzen Knötchen, auch "Nodules" genannt, die die Mikrotubuli-Nukleationskomplexe beherbergen. Diese ganze sphäroide, Plaque-ähnliche Organelle hat einen Durchmesser von ungefähr 600 nm. Während die Corona das funktionelle Homolog zu der pericentriolaren Matrix in höheren Zellen darstellt und entsprechend viele konservierte Proteinen der Mikrotubulinukleation enthält, repräsentiert die geschichtete Core-Region die zentrale Einheit dieses Centrosomtyps, die wegen ihrer Fähigkeit zur Duplikation Analogien zu den Centriolen zeigt. In wie weit die entsprechenden Proteinkomponenten homologisiert werden können ist Gegenstand aktueller Forschung. Auf den ersten Blick bestehen Ähnlichkeiten zwischen der dreischichtigen Core-Region von *Dictyostelium* und dem dreischichtigen Plaque-Stapel des SPB. Die Proteinzusammensetzung und das Verhalten während der Centrosomenverdopplung weisen jedoch darauf hin, dass es keine homologen Strukturen sind. Die ganze dreischichtige Core-Region des *Dictyostelium* Centrosoms sollte mit dem zentralen Plaque der Bäckerhefe verglichen werden, während die Corona die gleiche Funktion wie der innere und äußere Plaque des SPB ausübt, nämlich die Organisation der Mikrotubuli (Gräf *et al.*, 2015). Wie in vegetativen

tierischen Zellen organisiert das *Dictyostelium* Centrosom ein radiales Mikrotubuli-Cytoskelett. Aber aufgrund seiner amöboiden Fortbewegung und dem Fehlen von begeißelten Gameten hat es im Verlauf der Evolution die Centriolen / Basalkörper verloren (Carvalho-Santos *et al.*, 2011; Gräf *et al.*, 2015). In den meisten untersuchten Organismen wird die Centrosomenverdopplung am G1/S Übergang initiiert und läuft anschließend in der S-Phase parallel mit der Replikation der genomischen DNA ab (Uzawa *et al.*, 2004). Aber ähnlich wie in *Schizosaccharomyces pombe* (Ding *et al.*, 1997) ist die Centrosomenverdopplung in *Dictyostelium* nicht mit der S-Phase synchronisiert. Die Verdopplung der *Dictyostelium*-Centrosomen beginnt während des Übergangs der G2-Phase zur Mitose mit einer Vergrößerung der Zentralstruktur und dem Abbau der Corona sowie den gebundenen Mikrotubuli (Ueda *et al.*, 1999) (Abbildung 2 B). Somit ist die frühe Prophase durch ein völliges Fehlen von Interphase-Mikrotubuli am Centrosom gekennzeichnet. Danach bildet die Core-Struktur ein sogenanntes „fenestra“ (lat. Fenster) in der Kernhülle und die beiden äußeren Schichten trennen sich voneinander während sich die innere Schicht auflöst. Die beiden getrennten Hälften haben zu diesem Zeitpunkt einen Abstand von circa 1 µm (Gräf *et al.*, 2004). In der Prometaphase bilden sich an der früheren inneren Oberfläche der verbliebenden äußeren Schichten Mikrotubuli und formen eine zentrale Spindel. Nach einer Verzögerung von 2-5 Minuten (Tikhonenko *et al.*, 2008) verlängern sich die Mikrotubuli und schieben die beiden Spindelpole voneinander weg, bis sie in der Metaphase entgegengesetzte Pole erreicht haben. Bei dem Übergang zur Anaphase falten sich die Enden der Polformenden Schichten in Richtung der cytosolischen Seite des Nukleus und astrale Mikrotubuli, zum Zellcortex hin gerichtet, werden sichtbar. In der Telophase ist der Faltungsprozess der Pole abgeschlossen und die zuvor Plaque-ähnlichen Schichten falten auf sich selbst zurück, sodass neu gebildetes Corona-Material der früher inneren Oberfläche zugewandt ist. Die zentrale Schicht bildet sich anschließend in der späten Telophase aus. Von der Prophase bis hin zur Telophase gibt es kein Anzeichen für eine Diskontinuität der Kernhülle, ausgenommen der „fenestra“, in der sich die beiden mitotischen Centrosomen befinden. Die Karyokinese der beiden „Tochter“-Kerne vollzieht sich ebenfalls in der späten Telophase. Die dünne röhrenförmige Kernhüllenverbindung zwischen den Kernen reißt kurz bevor sich die zentrale Spindel auflöst und die Cytokinese stattfindet (McIntosh, 1985). Man spricht hier von einer geschlossenen Mitose, obwohl die Kernporenkomplexe modifiziert sein können um größeren Proteinen den Transport zu erlauben, wie bei *Aspergillus* (De Souza, 2007). Es stellt sich somit die Frage, ob diese Mitose einen geschlossenen (closed) oder halb-offenen (semi-open) Typus darstellt (O'Day *et al.*, 2015).

### 1.3 Ziele der Arbeit

Es gibt immer noch viele unbeantwortete Fragen. Wie zum Beispiel wird der faszinierende Prozess der Centrosomenbiogenese auf Proteinebene orchestriert? Und welche Proteine sind beteiligt? Die Beantwortung dieser Fragen ist nicht immer einfach, da die Untersuchungen der vermutlich über 100 möglichen, verschiedenen centrosomalen Proteinkomponenten eine Herausforderung darstellt. Ein Großteil dieser Proteine zeigt zwar ein mehr oder weniger dynamisches Bindungsverhalten zu anderen Proteinen, zeigt aber keine katalytische Aktivität (Gräf, 2015). Die meisten Erkenntnisse kamen dafür aus der Vergleichenden Biologie, Bindungsstudien und Proteomanalysen des centrosomalen Proteinbestands der verschiedenen Centrosomentypen. Die meisten der 33 bekannten centrosomalen und Centrosom-assoziierten Proteine in *Dictyostelium* wurden in unserem Labor charakterisiert (Gräf, 2015). Eine Analyse des centrosomalen Proteoms von *Dictyostelium* identifizierte mehrere neue centrosomale Proteinkandidaten (Reinders *et al.*, 2006), von denen neun als GFP-Fusionsprotein am Centrosom lokalisierten (Schulz *et al.*, 2009). Die Unterteilung der centrosomalen Bestandteile bei *Dictyostelium* geschieht in Corona- und Core-Komponenten. Bekannte Bestandteile der Corona sind CP224, EB1, TACC, Spc97, Spc98 und  $\gamma$ -Tubulin. Sie sind an der Mikrotubuli-Nukleation und an der Regulierung die Mikrotubuli-Dynamik beteiligt (Euteneuer *et al.*, 1998; Dauderer und Gräf, 2002; Rehberg und Gräf, 2002; Gräf *et al.*, 2003; Samereier *et al.*, 2011). Andere Proteine der Corona sind CP148, was vermutlich ein Gerüstprotein für die vorher genannten Proteine darstellt (Kuhnert *et al.*, 2012b), und CP248/250 oder NdrA, mit noch unbekannt Funktionen (Blau-Wasser *et al.*, 2009; Schulz *et al.*, 2009; Kastner *et al.*, 2011). Wenn sich die Corona zu Beginn der Mitose auflöst verschwinden CP148, CP248/250 und NdrA von den Centrosomen, während alle Komponenten, die an der Mikrotubuli-Organisation und -Dynamik beteiligt sind, sich auf die Spindelpole verteilen. DdNek2, CP39, CP55, CP75, CP91 und CEP192 sind Bestandteile der geschichteten Core-Region, von denen CP39, CP75 und CP91 sich in der zentralen Schicht befinden. Sie dissoziieren am Anfang der Mitose vom Centrosom ab. Das steht in Übereinstimmung mit dem Verschwinden der zentralen Schicht der Core-Region in der Prophase während des Verdopplungsprozesses des Centrosoms (Gräf, 2015). In dieser Arbeit soll das Core-Protein CP91 näher charakterisiert werden um neue Erkenntnisse über mögliche Funktion und Interaktion im *Dictyostelium* Centrosom zu gewinnen.

## 2 Ergebnisse

Auf der beigefügten CD befindet sich neben den Filmen auch ein PDF-Dokument der Arbeit mit allen Abbildungen in hoher Auflösung.

### 2.1 Charakterisierung des centrosomalen Proteins CP91 in *Dictyostelium*

Das centrosomale Protein CP91 wurde im Rahmen einer Studie zur Identifizierung neuer, centrosomaler Proteine entdeckt (Reinders 2005, Schulz *et al.*, 2009). CP91 wird durch das Gen *CepE* kodiert (Dictybase DDB0233956).

#### 2.1.1 *In silico* Analyse der CP91 Sequenz

CP91 besitzt ein Molekulargewicht von 91,729 kDa und besteht aus 799 Aminosäuren. Ungefähr 45 % der Aminosäuren (AS) können coiled-coil Strukturen in ihrer Tertiärstruktur bilden (Abbildung 3). Mögliche coiled-coil Domänen konnten im Bereich von ca. 350-660 AS durch das „COILS Programm“ vorhergesagt werden (<http://www.ch.embnet.org>).

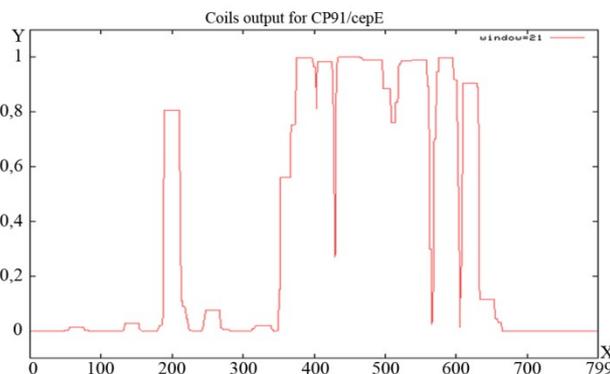


Abbildung 3: Vorhersage der coiled-coil Regionen von CP91 basierend auf der Aminosäuresequenz. Die X-Achse zeigt die Anzahl der Aminosäuren, die Y-Achse die Wahrscheinlichkeit einer coiled-coil Region. Nahezu 45 % der Aminosäuren können in der Faltung ihrer Tertiärstruktur coiled-coil Regionen ausbilden. Vorhersage mittels „COILS Programm“ mit einer Fenstergröße von 21 Aminosäuren. ([www.ch.embnet.org](http://www.ch.embnet.org)).

Der Sequenzvergleich der Aminosäuren von CP91 mittels BLASTp zeigte keine Ähnlichkeiten zu Proteinen anderer Organismen. Es zeigten sich lediglich geringe Übereinstimmungen im vorhergesagten Bereich der coiled-coil Strukturen von CP91 (ca. AS 350 bis AS 660) zu 10 Proteinen aus *Dictyostelium*. Die Übereinstimmungen liegen alle im coiled-coil Bereich und zeigen damit nur das Vorhandensein eines sehr häufigen Strukturmerkmals, das aber nicht auf evolutionäre Verwandtschaft schließen lässt. Die CP91 Sequenz hat einen hohen Anteil an polaren, ungeladenen Aminosäuren (411 AS der 799AS). Interessant ist dabei der hohe Anteil der Aminosäuren Asparagin, Glutamin und Prolin. Markiert man in der Aminosäuresequenz von CP91 die vorhandenen 97-mal **N** (Asparagin), 110-mal **Q** (Glutamin) und 53-mal **P** (Prolin), ergibt sich in folgendes Muster:

## Ergebnisse

MSYQYDQQHINNESMTHTPNRSRPIFGHTNIPITPIRSTQSPITPLRPNSGNNNNNNNNGTNNNNNNNET  
SGNNLNFNHHLKPNGVKFGVTNPKIITDSNGYSTNINSRTPSKPSSSSSGNRPLTASQSYMNETVEYQ  
DAFAKESNDIANNIKTPNRPOHQYQQPQHFTTQFVYQPSYQSNYDHQNKQQQQQQQQQYQHQNQHQ  
NQNEHQNEHHNGVDVENIPPPSSSSSSSQTPYNRSEYILGMERQLAFYKSLLEKSNYKFSNTQA  
SGQPPPTTTNNYTTTTTQRSYGLNQQPSSPTTTTTTTTTNENQQQKQSTTNNLKSTTAATTSSGYFIDE  
NDSIIKKRLDEMTDKIYLQEEEISDNLKTIEQQNKITRLEKEKKKLIENSENQLFSDLNRVEREKQMIQND  
RDNAIESFEFSSSSFAEEKSRLDDQIRQLQNVKQMNRSLEECNSTIDEWDQYQKLSAYTQLSNQEQ  
KYKQEQINQISVISQDMNQLKLDYDQSIQQSNELSLELKEKNQKTKELIKECDDLKLVSQQQQDFDQLT  
NKSVMYIEYRDKQINDLTKTTDRQIQQLNEKIQQLNDIITKDQSLATCNLERKKQLNDFALNYKKLQEQ  
YEIVDVKSLQINEKDSQLNQUALIDLKYLHDLVDKLSGFFKNFPNNRNQLQQQPQPPSTQQTTRIPPISTQ  
QTSHGGVVRDPPSPSRQVPOPOPOPOPOPOPOPOPSNINNPQRRNLNGNSGNSSSSSNGAFSTSQLRTN  
GGPTSSNGPNTPNRNIGFDGRINQNPSTVRR

CP91-Aminosäuresequenz im Einbuchstabencode; Richtung N-terminal → C-terminal; hervorgehoben sind: 97-mal N (Asparagin), 110-mal Q (Glutamin) und 53-mal P (Prolin)

Man kann in der N-terminalen Sequenz von CP91 Poly-Asparagin (N) und Poly-Glutamin (Q) Bereiche erkennen. Diese können zur Aggregation neigen und finden sich oft bei neurodegenerativen Krankheiten im Menschen (Scala *et al.*, 2012). Der C-terminale Teil von CP91 besitzt ebenfalls eine Asparagin- und Glutamin-reiche Region, bei dem sich die Aminosäuren in einer Tandemanordnung (QX bzw. NX; X für beliebige AS) mit anderen Aminosäuren abwechseln. Diese Bereiche könnten für eine Faltung des Proteins von Bedeutung sein. Die Sequenz ist auch reich an Prolin, einer heterocyclischen Aminosäure, die einzige Aminosäure die kein Wasserstoffatom in der Peptidbindung aufweist und somit keine Wasserstoffbrückenbindung ausbildet. Zudem ist durch die cyclische Struktur von Prolin die Konformation im Peptidrückgrat sehr starr. Diese stabilisierende Eigenschaft ist wahrscheinlich auch der Grund für den erhöhten Anteil von Prolin in Proteinen von thermophilen Organismen (Haney *et al.*, 1997; Watanabe *et al.*, 1997). Bekannt als „Helixbrecher“ unterbricht Prolin Sekundärstrukturen wie  $\alpha$ -Helices und  $\beta$ -Faltblätter. Prolin ist oft auch die erste Aminosäure am Anfang und am Ende einer  $\alpha$ -Helix. In Außensträngen von  $\beta$ -Faltblättern verhindert Prolin zudem die „Rand zu Rand“ Verbindung mit anderen  $\beta$ -Faltblättern oder anderen Proteinen, welche zur Aggregation tendieren und Amyloid formen (Richardson *et al.*, 2002). Prolin findet sich auch oft als Bestandteil von  $\beta$ -Schleifen, seltener als Haarnadelschleifen bezeichnet. Prolin hat durch seine „Sperrigkeit“ einen beschränkenden Einfluss auf die Konformation einer Polypeptidkette und kann ausgestreckte oder verlängerte Strukturen bzw. Polypeptidketten stabilisieren (Williamson, 1994).

Unter Verwendung des Cellular Calcium Information Server (Calmodulin Target Database) konnte auch eine Calmodulin Bindungsstelle (CaM) im Bereich von AS 250 bis AS 273 vorhergesagt werden. Calmodulin dient in eukaryotischen Zellen als primärer  $\text{Ca}^{2+}$  Sensor und ist ein weit verbreitetes Protein. Eine Bindung von Calmodulin kann zugleich ein centrosomales Targeting bewirken (Flory *et al.*, 2000). Der Web-basierende Algorithmus der

Calmodulin Target Database beruht auf biochemischen und biophysikalischen Eigenschaften von klassischen CaM-Targets, um eine CaM-Bindungsstelle innerhalb einer untersuchten Sequenz vorherzusagen (Yap *et al.*, 2000). CaM-Bindungsstellen, welche diese biophysikalischen Kriterien nicht erfüllen oder Sequenzbereiche von Proteinen, welche mehrere oder teilweise überlappende CaM-Bindungsstellen besitzen, werden daher oft nicht erkannt. Zudem zeigt der Algorithmus nicht alle bekannten CaM-Bindungsmotive an (Mruk *et al.*, 2014). Mruk *et al.* entwickelten daher ein Script, um jedes bekannte CaM-Bindungsmotiv innerhalb einer Aminosäuresequenz zu identifizieren und die Bindungsstellen auch zu gewichten. Die Gewichtung wird durch Zahlen von 0 (kein Motiv vorhanden) bis 9 (hohe Gewichtung) angegeben. Es schließt auch sich überlappende Bindungsmotive mit ein. Unter Verwendung der Calmodulation Database and Meta-Analysis Website (Mruk *et al.*, 2014) wurden daraufhin mehrere mögliche CaM-Bindungsstellen in der CP91 Proteinsequenz identifiziert. Neben der vorhergesagten CaM-Bindungsstelle im Bereich zwischen AS 252-275 (Gewichtung 7) wurde ebenfalls im N-terminalen Bereich von CP91 zwischen AS 73-98 eine CaM-Bindungsstelle mit Gewichtung 9 vorhergesagt. Zudem wurden im C-terminalen Bereich von CP91 zwischen AS 624-668 sich zwei überlappende CaM-Bindungsstellen mit einer hohen Gewichtung (8-9) vorhergesagt. Es gab noch weitere vorhergesagte CaM-Bindungsstellen, aber mit geringerer Gewichtung (1-5).

Das Programm ELM (Eukaryotic Linear Motif resource for functional sites in proteins) identifizierte eine Vielzahl an weiteren möglichen funktionellen Sequenzmotiven (Abbildung 4). Neben einer vorhergesagten coiled-coil Region, im Bereich von AS 366 bis AS 604, zeigten sich in CP91 mehrere Konsensussequenzen für Phosphorylierung durch CDK, CK1, GSK3, Nek2 und PLK (Dinkel *et al.*, 2014). Diese befinden sich in der N- und C-terminalen Domäne von CP91, außerhalb der coiled-coil Region. Es gibt zudem drei mögliche Bindungsstellen für Cyclin (DOC\_CYCLIN\_1) in der CP91-Sequenz, welche nach Interaktion mit Cyclin die Spezifität einer Phosphorylierung eines Cyclin/CDK-Komplexes erhöhen. Es gibt zudem fünf mögliche Bindungsstellen für CKS1 (DOC\_CKS1\_1), einer Cyclin-abhängigen Kinase Untereinheit 1. Dieses Protein bindet und moduliert die Aktivität von CDKs und spielt somit eine Rolle bei der Regulation des Zellzyklus. ELM sagt auch zwei SxIP-Bindungsmotive (LIG\_SxIP\_EBH\_1) am Anfang der N-Terminalen Domäne von CP91 voraus. Diese interagieren mit einer „End binding homology“ (EBH) Domäne. Die EBH-SxIP Interaktion wird von mehreren Mikrotubuli-Plus-Ende bindenden Proteinen (+TIPs) benutzt um „End binding“ Proteine (EB) an wachsenden Mikrotubuli-Enden zu erkennen.

## Ergebnisse

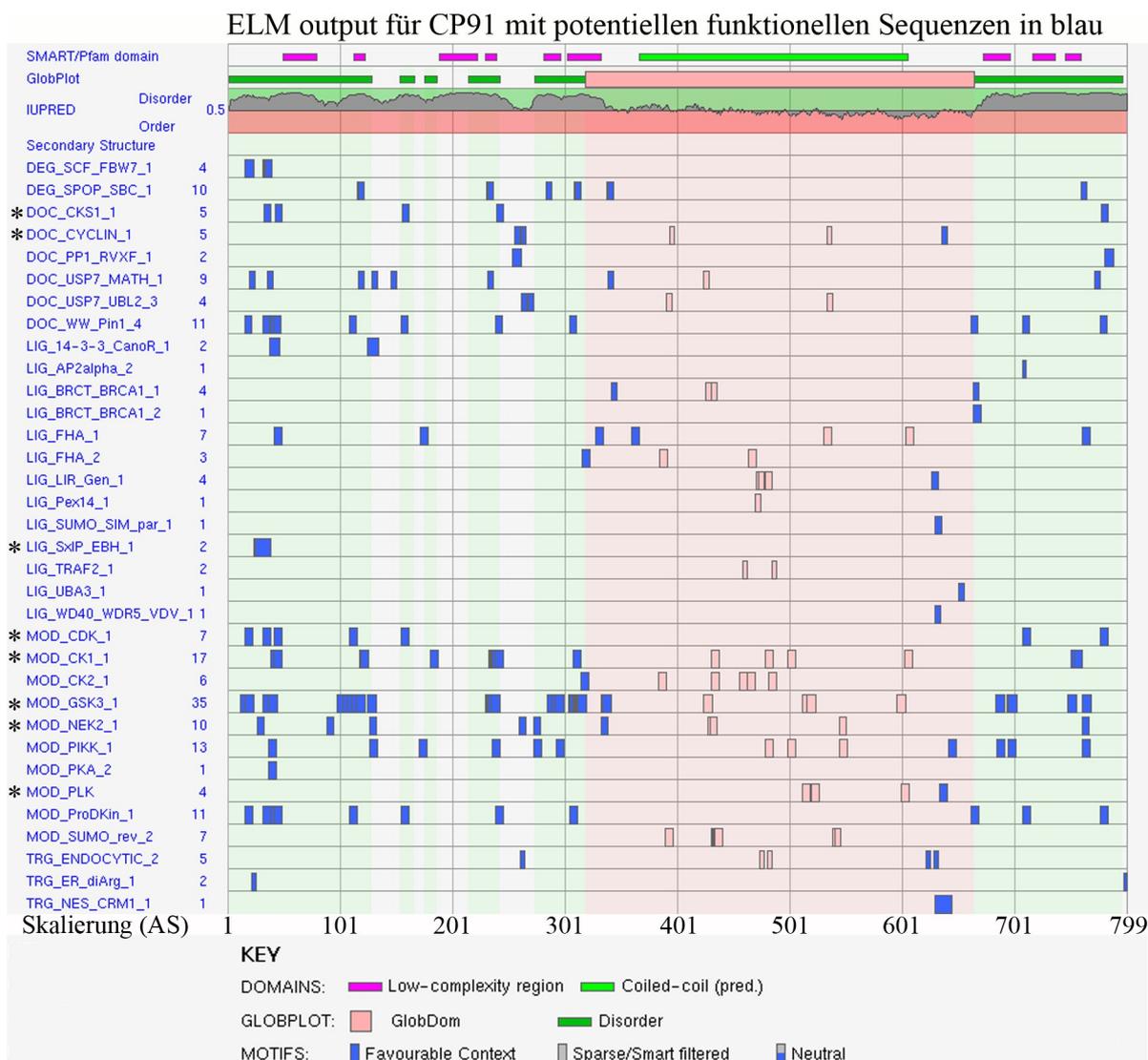


Abbildung 4: Vorhersage potentieller funktioneller Sequenzen von CP91 basierend auf der Aminosäuresequenz mit Hilfe des ELM-Programms (Dinkel *et al.*, 2014). Die Skalierung (X-Achse) zeigt die Anzahl der Aminosäuren. ELM benutzt SMART (Schultz *et al.*, 1998; Letunic *et al.*, 2015) und Pfam ([www.sanger.ac.uk/science/tools/pfam](http://www.sanger.ac.uk/science/tools/pfam)) um globuläre, sowie coiled-coil Domänen vorherzusagen. Der vorhergesagten Coiled-Coil Bereich (hellgrün) wurde von AS 366 bis AS 604 vorhergesagt. GlobDoms: Sequenzsegmente sind durch GLOBPLOT, nach der Russell/Linding Skala (Linding *et al.*, 2003), geordnet und mit korrespondierenden mit potentiellen globulären Domänen. Potentielle funktionelle Sequenzen sind in blau dargestellt. Nomenklatur der funktionellen Sequenzen: DEG (degradation site), DOC (docking site), LIG (ligand binding site), MOD (post-translational modification site) und TRG (targeting site). Interessante funktionelle Sequenzen sind mit \* gekennzeichnet und im Text beschrieben.

### 2.1.2 Herstellung eines polyklonalen CP91-Antikörpers und Western Blot Analyse von CP91

Für die Untersuchung des endogenen CP91 in *Dictyostelium* sollte ein polyklonaler Antikörper hergestellt werden. Dafür wurde in *E.coli* ein MBP-CP91 Fusionsprotein exprimiert, anschließend affinitätschromatografisch aufgereinigt und für die Immunisierung von zwei Kaninchen verwendet. Die erhaltenen Antiseren konnten in der indirekten Immunfluoreszenzmikroskopie und im Western Blot erfolgreich getestet werden. Ein Antiserum wurde über einer Affinitätssäule aufgereinigt, um unspezifische Antikörper und Verunreinigungen zu ent-

fernen. In einer Western Blot Analyse auf einem AX2- bzw. GFP-CP91 Kernextrakt konnte das endogene CP91 nachgewiesen werden (Abbildung 5 B). Es war jeweils eine Bande von ~110 kDa zu erkennen (Pfeil endogenes CP91). Das kalkulierte Molekulargewicht von CP91 ist ca. 91,8 kDa, es wanderte im SDS-Gel aber deutlich langsamer. Dieses Verhalten konnte auch beim GFP-CP91 Fusionsprotein beobachtet werden. Mögliche Ursachen können eine reduzierte Bindung des SDS an das Protein oder eine unvollständige Denaturierung der sekundären Proteinstrukturen sein. Dies findet sich häufig bei centrosomalen, coiled-coil haltigen Proteinen (Hjelmeland und Chrambach, 1981). Die Größe des GFP-CP91 Fusionsproteins wurde zusätzlich durch einen monoklonalen GFP-Antikörper nachgewiesen (Abbildung 5A). Im Kernextrakt einer GFP-CP91 Mutante zeigte sich wie schon bei der Färbung mit anti-CP91 ein Signal bei ca.145 kDa. Dieses Signal zeigte sich im Kernextrakt der AX2 Kontrolle nicht und ist damit spezifisch für GFP-CP91.

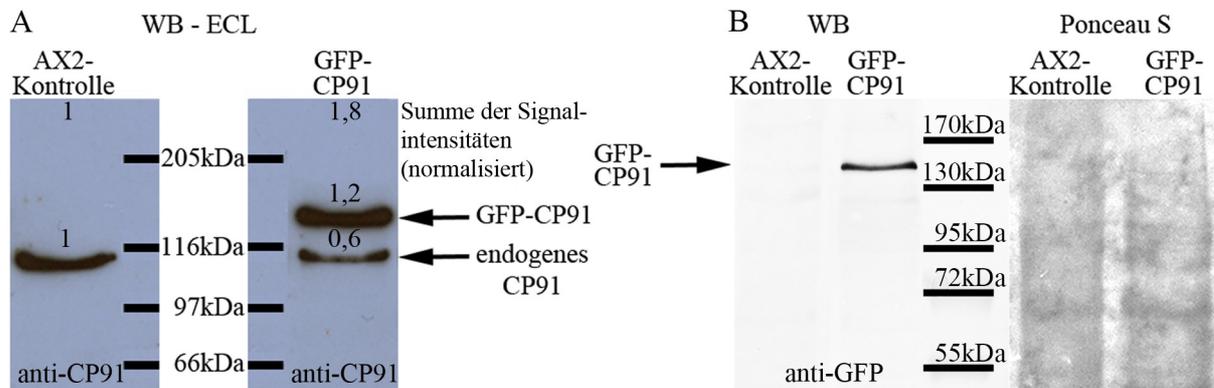


Abbildung 5: Western Blot Analyse. GFP-CP91- und AX2-Kernextrakte wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrocellulosemembran transfertiert. Die Nitrocellulosemembran wurde zur Ladekontrolle mit Ponceau S angefärbt um zu zeigen das gleiche Proteinmengen aufgetragen wurden. (A) Nachweis des endogenen CP91 und GFP-CP91 Fusionsproteins mit dem aufgereinigten polyklonalen CP91-Antikörper (Pfeile). Die Detektion der Proteinbanden wurde mit der *enhanced Chemoluminescence*-Methode (ECL) durchgeführt. Die gemessenen Intensitäten der Signale wurden auf den Wert des endogenen CP91 des Wildtyps (AX2=1) normalisiert und sind an der jeweiligen Bande angegeben. Die Summe der Signalintensität von endogenem CP91 u. GFP-Konstrukt sind gekennzeichnet. Das GFP-Konstrukt ist 1,8-fach überexprimiert. Die Bestimmung erfolgte durch die densitometrische Auswertung des Western Blots mit der Software *ImageJ*. (B) Nachweis des GFP-CP91-Volllängenproteins mit einem monoklonalen GFP-Antikörper (Pfeil). Die Detektion erfolgte mittels alkalischer Phosphatase. Das Molekulargewicht des Standards ist jeweils angegeben.

### 2.1.3 CP91 ist ein neues centrosomales Protein der Core-Region

Centrosom-assoziierte Proteine benötigen Mikrotubuli, um am Centrosom zu lokalisieren. Echte centrosomale Proteine hingegen können an aufgereinigten, mikrotubulifreien Centrosomen nachgewiesen werden (Alieva und Uzbekov, 2008). Für die detaillierte Untersuchung von CP91 in *Dictyostelium*, wurden GFP-CP91 Centrosomen nach einem modifizierten Protokoll präpariert (Schulz *et al.*, 2006). Die mikrotubulifreien Centrosomen wurden auf ein Deckglas zentrifugiert und mit einem monoklonalen Antikörper gegen den centrosomalen Coronamarker CP224 markiert. CP91 befand sich in allen untersuchten Centrosomen als zentrales punktförmiges Signal innerhalb des ringförmigen Signals des Coronamarkers CP224

(Abbildung 6A). An einem repräsentativen mikrotubulifreien Centrosom (Abbildung 6 A<sup>'''</sup>) erfolgte zudem die Analyse der markierten GFP-CP91 Centrosomen mit der Plot Profile Funktion von ImageJ (Abbildung 6 B). In dem Diagramm ist CP91 in Grün und CP224 in Rot dargestellt. Das Coronaprotein CP224 zeigt, wie zu erwarten, zwei Maxima entlang des Querschnitts durch das Centrosom. Der Durchmesser der Corona beträgt 0,6µm. Im Querschnitt besitzt der grüne Kurvenverlauf von CP91 nur ein zentrales Maximum, welches sich innerhalb der beiden CP224 Maxima befindet. CP91 stellt also ein echtes centrosomales Protein dar, da es an mikrotubulifreien Centrosomen nachweisbar ist, und es konnte der centrosomalen Core-Region zugeordnet werden.

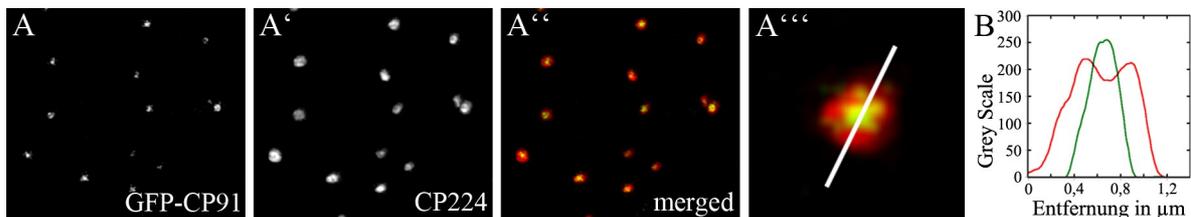


Abbildung 6: Untersuchung isolierter Centrosomen aus GFP-CP91 Zellen. Das rekombinante GFP-CP91 Fusionsprotein lokalisiert punktförmig an aufgereinigten Centrosomen. Die Centrosomen wurden mit Methanol fixiert, markiert mit anti-CP224/anti-Maus-Alexa-Fluor568, als centrosomalen Coronamarker (Bild A' und rot in A''), und GFP-CP91 (Bild A und grün in A''). (A'''): Auswahl eines repräsentativen Centrosoms, mit einer Linie die den Querschnitt des Centrosoms markiert (B): Verteilung der Fluoreszenzintensität entlang des Centrosomenquerschnitts (GFP-Kanal in Grün, CP224-Kanal in Rot)

### 2.1.4 Untersuchung des endogenen CP91

Das endogene CP91 wurde mit dem gereinigten polyklonalen CP91 Antikörper untersucht und befindet sich am Centrosom bzw. den Spindelpolen, die Stärke der Lokalisation ist aber zellzyklusabhängig. Bei dem Eintritt in die Prophase wird das CP91 Signal sehr stark abgeschwächt (Abbildung 7, CP91 Antikörper Färbung). Die Corona und Mikrotubuli sind zu diesem Zeitpunkt abdissoziiert (Dauderer und Gräf, 2002; Gräf *et al.* 2003). Das Signal war bis zur Anaphase nicht nachweisbar. Während des Übergangs der Anaphase zur Telophase nimmt die Intensität des punktförmigen CP91 Signals zu, bis es zum Ende der Telophase wieder die ursprüngliche Intensität erreicht hat. Zellen, welche über Nacht mit dem CP91 Antikörper inkubiert wurden, zeigten während der Mitose dennoch sehr schwache punkt- oder balkenförmige Signale an den Spindelpolen. Die beiden Spindelpole erscheinen von der Prometa- bis zur Anaphase (Abbildung 8 A) als schwache balkenförmige Signale. CP91 befindet sich somit wahrscheinlich während des gesamten Zellzyklus am Centrosom bzw. den Spindelpolen, zeigt aber während der Mitose eine eindeutige Regulation seiner Präsenz an den Spindelpolen. Um für folgende Untersuchungen zu testen, ob ein GFP-Booster Atto488 keine Centrosomen oder andere Strukturen markiert, wurden AX2-Wildtypzellen

## Ergebnisse

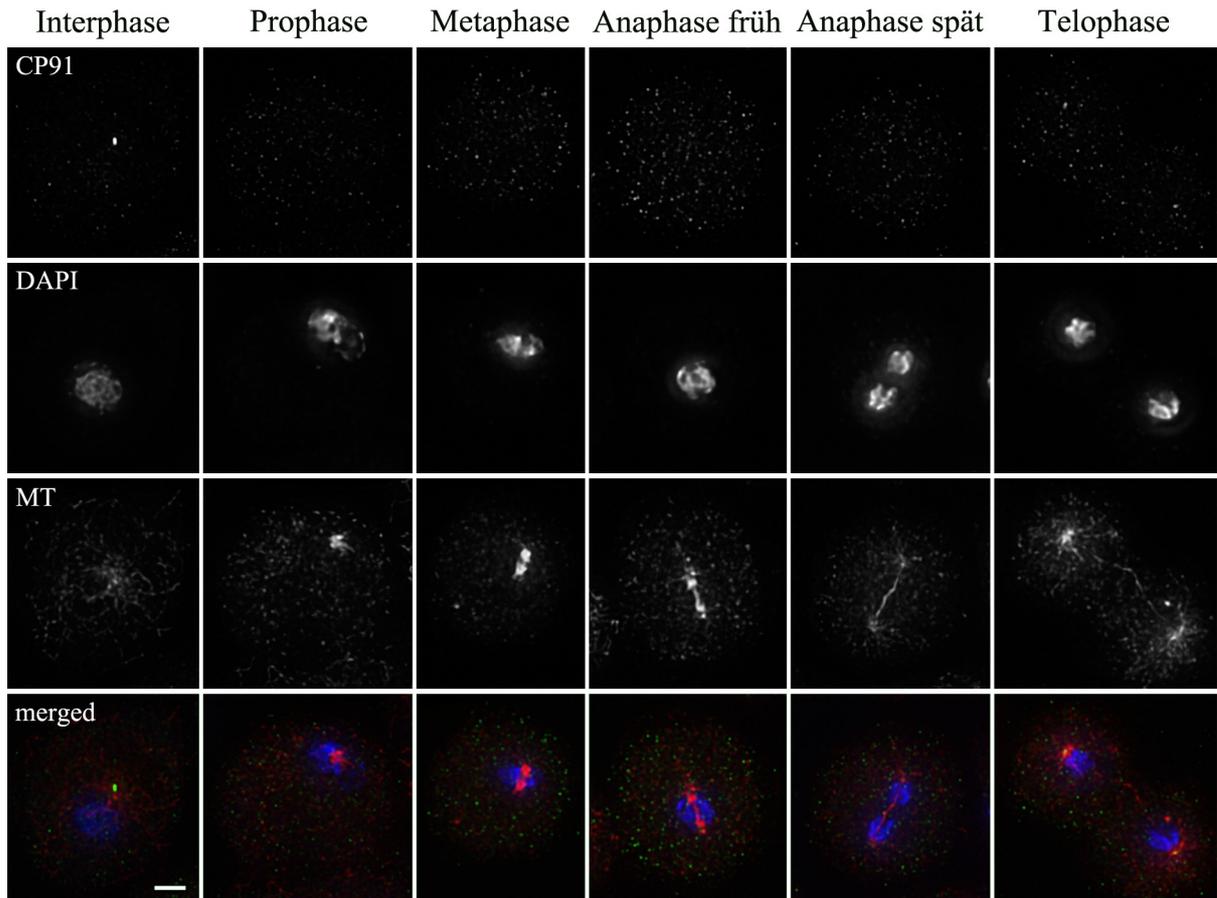


Abbildung 7: Lokalisation des endogenen CP91 Proteins während des Zellzyklus. Die Stärke der endogenen CP91 Lokalisation zeigt eine Zellzyklus-spezifische Abhängigkeit. AX2-Zellen wurden mit Methanol fixiert und mit anti-CP91 in Grün, anti-Tubulin (MT) in Rot und die DNA mit DAPI in Blau gefärbt. Balken = 3  $\mu$ m.

mit Methanol fixiert und anschließend (8 A) mit dem polyklonalen CP91 Antikörper und (8 B) dem GFP-Booster Atto488 über Nacht inkubiert. Die Proben wurden unter identischen Bedingungen gefärbt, inkubiert, fluoreszenzmikroskopisch untersucht (gleiche Stapeldicke, Belichtungszeit bei Wellenlänge 488nm war 259ms) und mittels Maximum Intensity Projektion (MIP) projiziert. Abbildung 8 B zeigt die Negativkontrolle des GFP-Booster Atto488. Es sind keine Markierungen oder Signale in den vier Wildtypzellen zu erkennen, weder an Centrosomen noch an anderen Strukturen. Der starke Hintergrund im „grünen“ Kanal (488nm) ist ein Resultat der festgelegten Displaykurve bei der MIP. Der hellste Wert wird dann auf Weiß und der dunkelste auf Schwarz gelegt. Damit wird automatisch der Hintergrund verstärkt wenn sonst kein Signal da ist. Als Vergleich dient Abbildung 8 A. Der Hintergrund in 8 A und 8 B sind äquivalent. Der GFP-Booster Atto488 sollte somit nur GFP binden, selbst keine falsch positiven Signale geben und kann somit problemlos bei den folgenden Untersuchungen der verschiedenen GFP-Konstrukten verwendet werden. Abbildung 8 A / A' zeigt im rechten oberen Bildausschnitt eine Wildtypzelle in einer frühen Anaphase. Wie vorher beschrieben kann man bei einer über Nacht Inkubation des CP91

Antikörpers auch in der frühen Anaphase schwache Balken-förmige Signale des endogenen CP91 sehen (Pfeile).

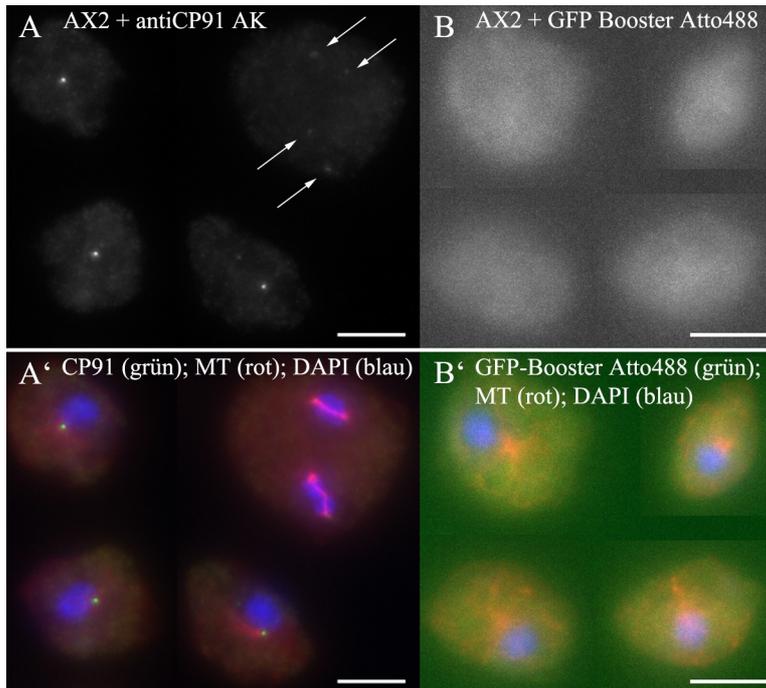


Abbildung 8: Negativkontrolle des GFP-Booster Atto488. Um zu testen ob der GFP-Booster Atto488 nicht unspezifisch Strukturen in AX2-Zellen markiert, wurden AX2-Zellen mit Methanol fixiert und anschließend (A) mit dem polyclonalen CP91 Antikörper und (B) dem GFP-Booster Atto488 (Verdünnung 1:500 in PBS) über Nacht inkubiert. Mikrotubuli (MT) wurden zusätzlich mit anti-Tubulin in Rot und die DNA mit DAPI (blau) gefärbt. Alle Schritte wurden parallel ausgeführt und die fixierten Proben anschließend fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Es wurde ein 100x/1,4 PlanApo Objektiv verwendet. Die Belichtungszeit bei Wellenlänge 488nm war 259ms. Alle Bilder wurden unter den gleichen Bedingungen aufgenommen und mittels Maximum Intensity Projektion projiziert. Beschreibung siehe Text. Balken = 5  $\mu\text{m}$ .

### 2.1.5 Das GFP-Fusionsprotein zeigt eine ähnliche Dynamik im Zellzyklus wie das endogene CP91

Die Lokalisationsstärke des GFP-Fusionsproteins ist ebenfalls zellzyklusabhängig und zeigt ein ähnliches Verhalten im Zellzyklus wie das endogene CP91. Das endogene CP91 Signal schwächte sich im Verlauf der Mitose sehr stark ab (Abbildung 7) und konnte in der Prophase und Metaphase nicht mehr nachgewiesen werden. Das GFP-CP91 Fusionsprotein (Abbildung 9) war bei Eintritt in die Prophase bis zum Anfang der Anaphase ebenfalls kaum fluoreszenzmikroskopisch nachweisbar. In vereinzelten Metaphasestadien konnte jedoch ein sehr schwaches GFP-Signal an den Spindelpolen beobachtet werden (Abbildung 9; Metaphase GFP-CP91 Pfeile). Im Verlauf der Anaphase, oft auch schon in der frühen Anaphase, war das GFP-CP91 Fusionsprotein als punktförmiges manchmal auch als balkenförmiges Signal eindeutig an den Spindelpolen detektierbar. Hier lag auch ein weiterer Unterschied. Das endogene CP91 wurde erst später, also im Verlauf der Telophase wieder eindeutig detektierbar. Das inkonsistente Verhalten des endogenen CP91 und des GFP-Fusionsproteins in der Pro- und Metaphase warf Fragen auf. Die Stärke der GFP-CP91 Überexpression könnte in der Zellkultur variieren. Bei Zellen mit einer starken Überexpression könnte noch etwas GFP-CP91 in der Mitose an den Spindelpolen verbleiben, während die Signale bei einer schwachen Expression nicht mehr detektierbar sind. Deshalb wurde das GFP-CP91 Signal mit

Hilfe des GFP-Boosters Atto488 verstärkt, um anschließend Mitosestadien zu untersuchen. Abbildung 10 A zeigt die Metaphase einer Zelle mit überzähligen Centrosomen. Im Ausschnitt der Überlagerung (A'') sind an den Spindelpolen schwache punktförmige GFP

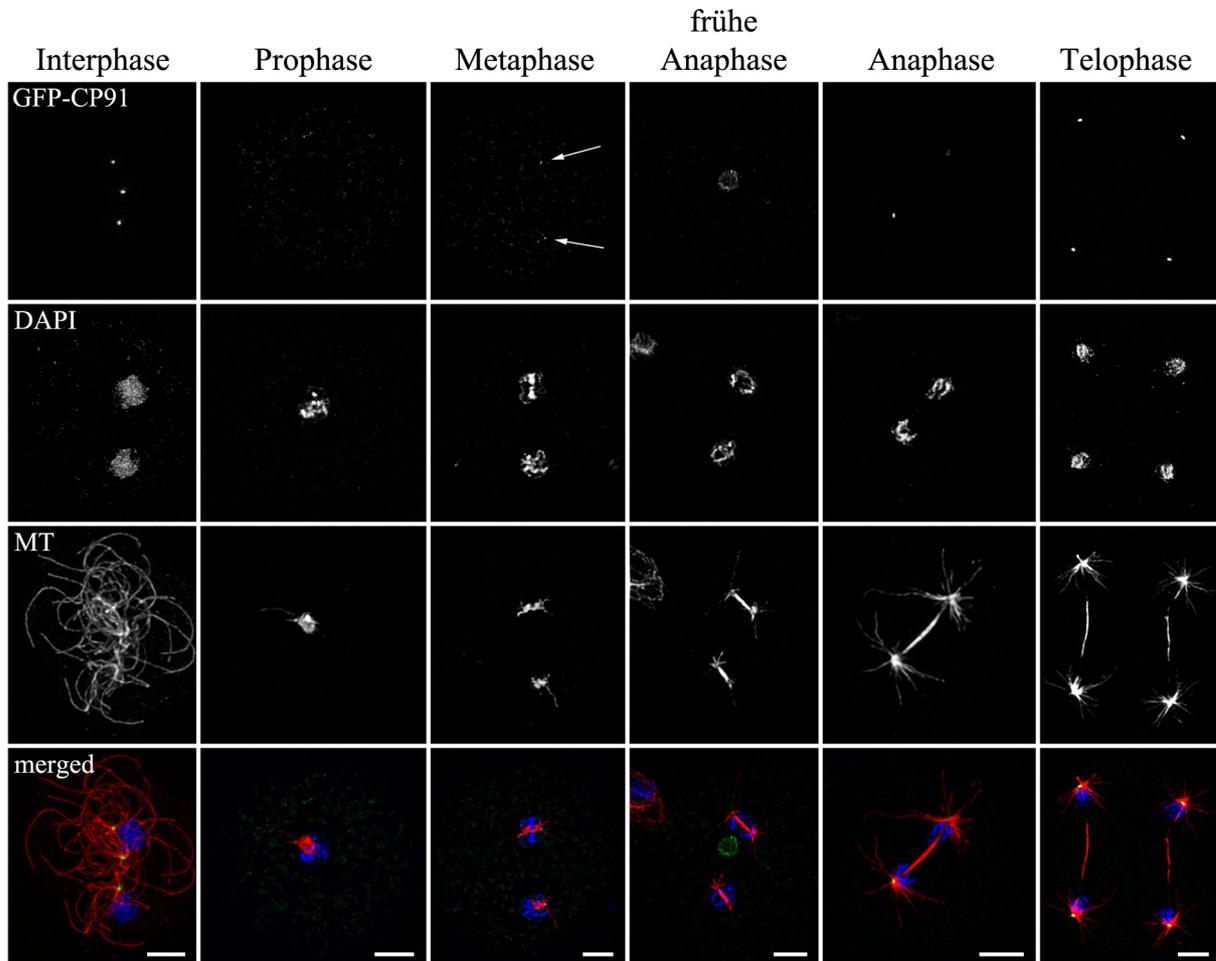


Abbildung 9: Lokalisation des GFP-CP91 Fusionsproteins während des Zellzyklus. GFP-CP91 zeigt eine zellzyklusabhängige Expression. GFP-CP91 Zellen wurden mit Glutaraldehyd fixiert und mit anti-Tubulin (MT) in Rot und die DNA mit DAPI (blau) gefärbt. Das kreisförmige GFP-Signal in der frühen Anaphase ist ein Artefakt und kann keiner Struktur zugeordnet werden. Die GFP-Fluoreszenz ist in grün dargestellt. Balken = 3 µm.

Signale zu erkennen. A'' ist ein Ausschnitt aus Bild B und wurde nochmal separat deconvolviert. Die Deconvolution ist eine 3D-Imaging-Methode, bei der durch einen Computeralgorithmus unter Anwendung einer zuvor ermittelten PSF ("point spread function") gestreutes und gebeugtes Licht auf seinen Ursprungspunkt zurückgerechnet und so aus dem ursprünglich unscharfen Bild entfernt wird. Es entstehen scharfe kontrastreiche Bilder mit deutlich verbesserter lateraler und axialer Auflösung. Da das gesamte, innerhalb und außerhalb der Fokusebene emittierte Licht in das Modell mit einbezogen wird, ist diese Methode des optischen Schnitts sehr sensitiv und ideal geeignet für schwach fluoreszierende Proben (Swedlow 2007). Bei dieser Streulichtberechnung wird das stärkste „echte“ Signal (Pixel) des Bildes als Referenzwert gesetzt. Alle anderen Werte werden normalisiert. Die Signalintensitäten sind im bearbeiteten Bild vergleichbar. Das bedeutet aber auch, dass bei

einem sehr starken Signal, in diesem Fall das Interphasecentrosom mit der höchsten Signalintensität (Abbildung 10 B), sehr schwache Signale in der Mitose nicht mehr so gut nachgewiesen werden können. Abbildung 10 B zeigt zwei CP91-GFP Interphasezellen und eine Metaphasezelle. In B und dem vergrößerten Ausschnitt B' sieht man kaum ein GFP-Signal an den Spindelpolen der Metaphase. Zum Vergleich ist im rechten oberen Bildausschnitt (B') ein Inset mit einem Interphasecentrosom. Abbildung 10 A wurde daher separat ohne Interphasecentrosomen deconvolviert.

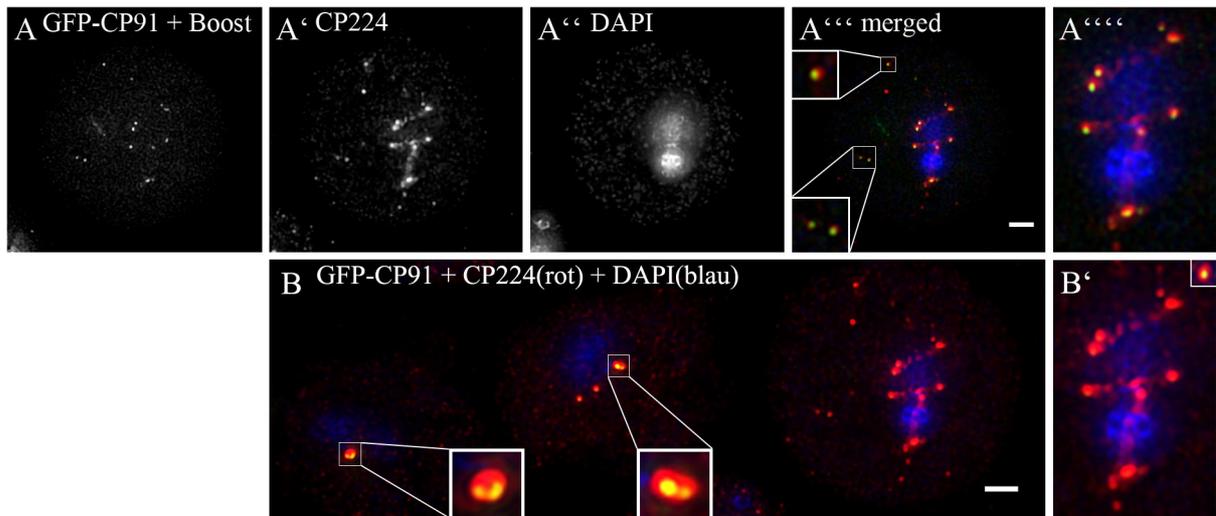


Abbildung 10: Metaphasestadium einer GFP-CP91 überexprimierenden Zelle und anormale Interphasecentrosomen. Zellen wurden mit Methanol fixiert und mit anti-CP224 (A') und DAPI gefärbt (A''). Das GFP-Signal wurde zudem mit einem GFP-Booster Atto488 verstärkt. Bildreihe A ist ein Ausschnitt aus Bild B und wurde separat deconvolviert um die schwachen GFP-Signale hervorzuheben (Begründung siehe Text). A''' zeigt die Antikörperfärbung von CP224 in rot, GFP-CP91 + GFP-Booster Atto488 in Grün (Überlagerung gelb) und DAPI (DNA) in Blau. Die beiden Insets zeigen cytosolische Centrosomenfragmente mit GFP-CP91 und CP224. A'''' zeigt einen vergrößerten Ausschnitt der Überlagerung mit GFP-Signalen an den Spindelpolen. B zeigt das deconvolvierte Originalbild, wobei die Intensitätsverhältnisse der GFP Signale im wahren Verhältnis wiedergeben sind. B' zeigt den gleichen vergrößerten Ausschnitt wie A'''' mit einem kleinen Inset rechts oben. Das B'-Inset zeigt ein Interphasecentrosom zum Vergleich. Die beiden Insets in Bild B zeigen zwei anormale Interphasecentrosomen vergrößert. Es sind jeweils 2 separate GFP Signale pro Centrosom sichtbar, was ein Hinweis auf Centrosomenkoaleszenz oder Centrosomenfragmentation sein kann. Balken = 2 µm.

Man sieht deutlich noch GFP-CP91 Signale an den Spindelpolen, sowie vereinzelte kleine cytoplasmatische Centrosomenfragmente mit GFP-CP91 und CP224 (Insets in Abbildung 10 A'''). Diese Beobachtung konnte an verschiedenen Pro- und Metaphasezellen wiederholt werden. Die Anordnung der CP224 und CP91 Signale in Abbildung 10 A'''' lässt zudem auf eine multipolare Spindel schließen. Das endogene CP91 und das GFP-CP91 sind somit auch während der Mitose an den Centrosomen und Spindelpolen vorhanden, wenn auch nur sehr schwach und ungefähr im einstelligen Prozentbereich. Die Stärke der CP91-Expression ist zellzyklusabhängig. In Abbildung 10 B sind zudem zwei anormale Interphasecentrosomen des GFP-CP91 überexprimierenden Stammes in den beiden Insets vergrößert dargestellt. Es zeigten sich jeweils zwei separate GFP-CP91 Signale pro Centrosom, welche von einer CP224 Corona umgeben sind. Diese Beobachtung konnte bei mehreren verschiedenen Zellen

gemacht werden und könnte entweder auf eine Centrosomenkoaleszenz oder eine Centrosomenfragmentation hinweisen.

In multinukleären *Dictyostelium* Zellen (Syncytia) verlaufen die Mitosephasen normalerweise synchron (Neujahr *et al.*, 1998; Leo *et al.*, 2012). Bei Mitosen von multinukleären GFP-CP91-Mutanten konnten mehrfach asynchrone Mitosephasen innerhalb einer Zelle beobachtet werden. Abbildung 11 A zeigt eine solche Zelle mit 9 Kernen und den dazugehörigen kernassoziierten Centrosomen. Einige MTOCs zeigen eine Prophase bei der die Mikrotubuli fast vollständig fehlen und das GFP-CP91 kaum vorhanden bzw. schwächer ist, während drei MTOCs noch ein Interphase-Cytoskelett mit starkem GFP-CP91 besitzen. Die DNA der verschiedenen Kerne ist ebenfalls unterschiedlich stark kondensiert und weist auf eine Störung der Ploidie hin. Abbildung 11 B zeigt eine vierkernige Zelle mit Metaphase und Anaphase zur gleichen Zeit. Abbildung 11 C zeigt eine Zelle während einer späten Anaphase mit einer multipolaren Spindel. Hier kann man auch ein balkenförmiges GFP-CP91 Signal an den Spindelpolen beobachten.

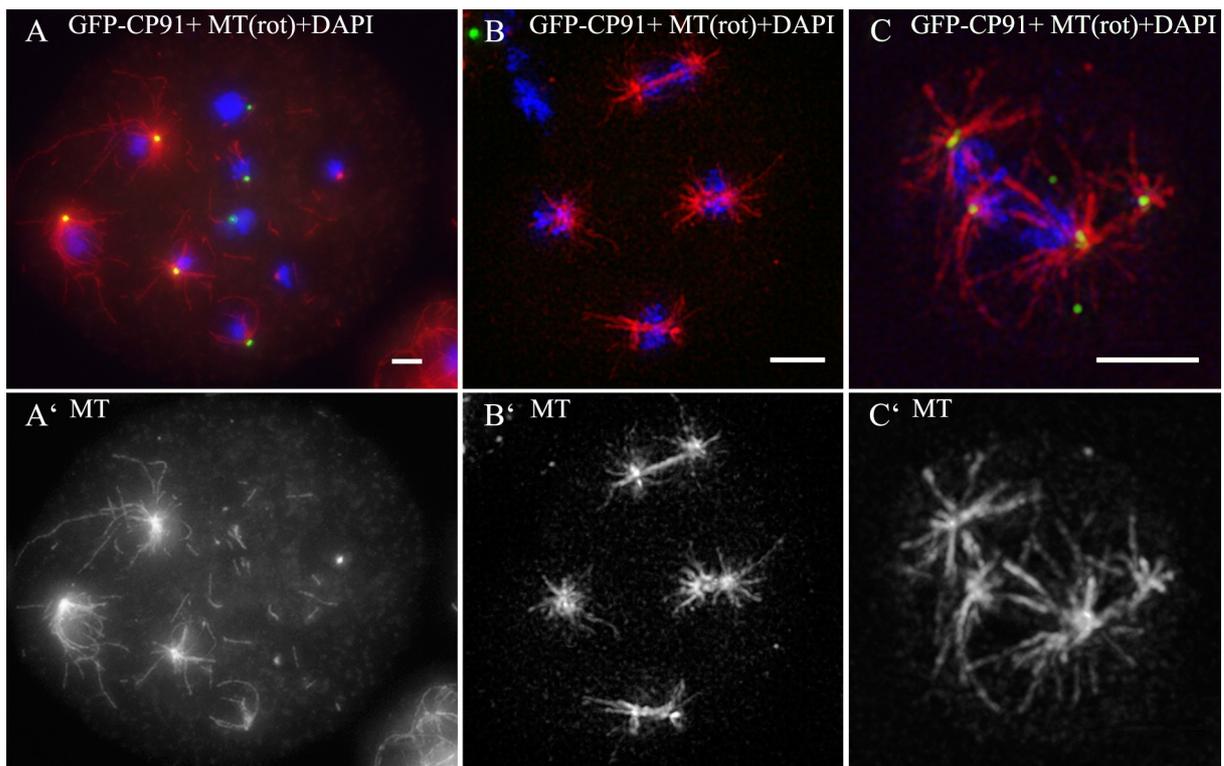


Abbildung 11: Asynchrone Mitosephasen und multipolare Spindeln in GFP-CP91 Zellen. A und B zeigt asynchrone Mitosephasen von jeweils einer multinukleären GFP-CP91 überexprimierenden Zelle. Die Zellen wurden mit Methanol fixiert und Mikrotubuli (rot) und DNA (blau) markiert. GFP (grün) ist in der Überlagerung gelb. Abbildung C wurde zusätzlich mit dem GFP-Booster Atto488 markiert und zeigt eine multipolare Spindel mit balkenförmigen GFP Signalen an den Polen. Balken = 3 µm.

### 2.1.6 GFP-CP91 zeigt keine signifikante Mobilität am Centrosom

Nachdem die Core-Region die zentrale sich duplizierende Einheit des Centrosoms darstellt, die während der längsten Zeit des Zellzyklus von der Corona komplett umhüllt ist, ist davon auszugehen, dass Proteine der Core-Region oft eine wichtige Funktion in der Biogenese bzw. der strukturellen Integrität des Centrosoms besitzen. Bei strukturell wichtigen Proteinen ist eine geringe Mobilität zu erwarten. Mit FRAP-Experimenten kann man die Mobilität untersuchen. Dafür wurden GFP-CP91 überexprimierende Interphasezellen mehrfachen FRAP-Analysen unterzogen (Abbildung 12). Nach dem Bleichvorgang des GFP-CP91 Signals zeigte sich keine signifikante Erholung der GFP-CP91 Fluoreszenz. Das Ergebnis zeigt keine Mobilität für CP91 innerhalb des Centrosoms und weist somit auf eine strukturelle Funktion von CP91 in *Dictyostelium* hin.

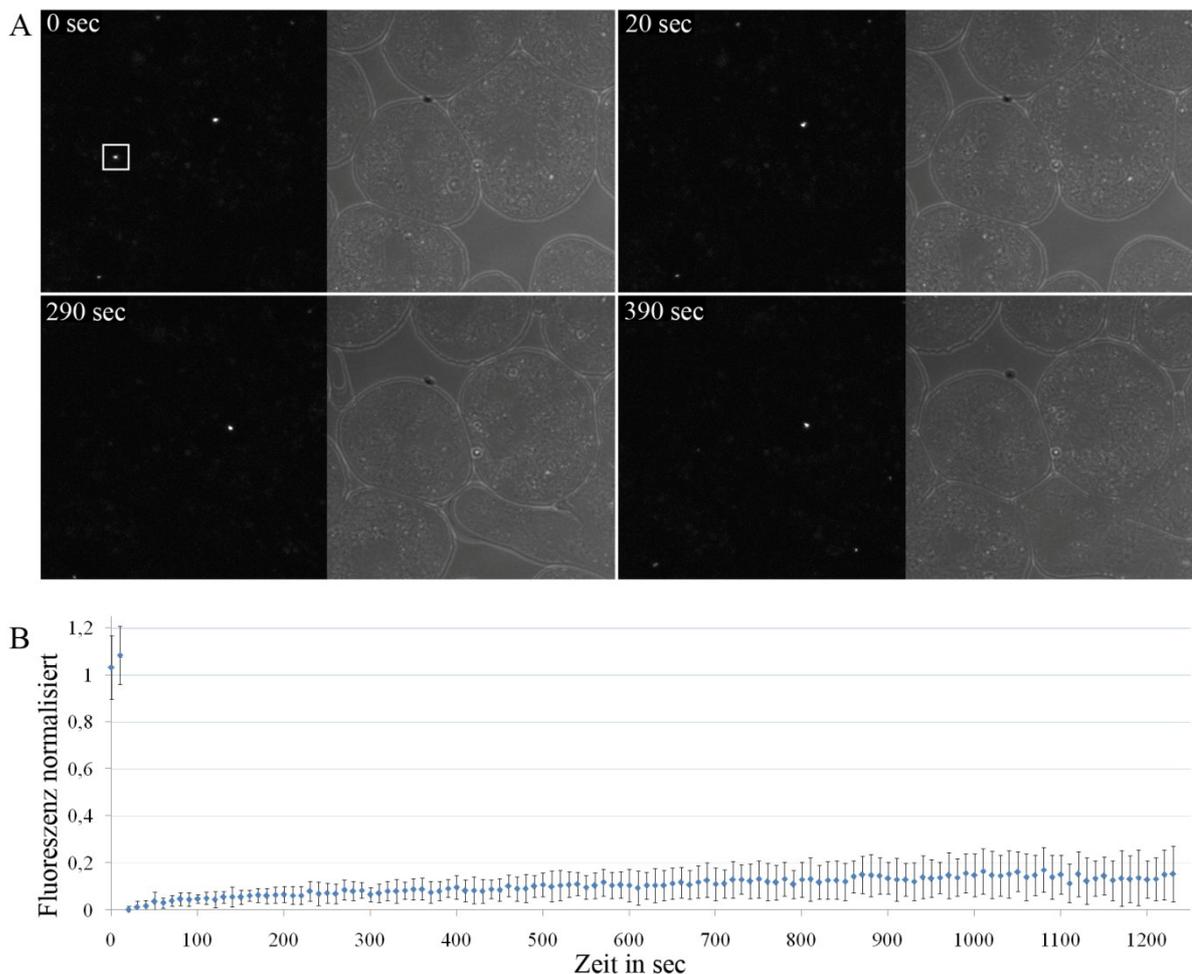


Abbildung 12: GFP-CP91 zeigt keine Mobilität im Interphasecentrosom. FRAP-Experiment mit GFP-CP91 exprimierenden Zellen in einer 3D Zeit Serie, aufgenommen an einen konfokalem Laserscanning Mikroskop. Das ausgebleichte Centrosom ist durch ein weißes Quadrat markiert. Die Aufnahmezeit betrug sechs z-Stapel pro Minute (Bildanzahl: fünf Bilder/s). Abbildung der "Maximum-Intensity"-Projektion von fünf Schichten /Abbildung eines repräsentativen Experimentes. Abbildung A: Ausbleichen einer definierten Region in der Interphase ohne Regenerierung der Fluoreszenz. Abbildung B: korrigierte FRAP- Kurve eines repräsentativen Experimentes (n= 12; Mittelwert  $\pm$  S.D). Auf der Y-Achse Darstellung der relativen Fluoreszenz, die x-Achse gibt den zeitlichen Verlauf wieder.

### 2.1.7 Die Überexpression von GFP-CP91 führt zu überzähligen Centrosomen

Die Überexpression eines Proteins in einer Zelle kann zu phänotypischen Veränderungen in einem Organismus führen. Diese Veränderungen können Hinweise auf Proteinfunktionen geben. Nach der Transformation von AX2 Zellen mit einem GFP-CP91 Konstrukt konnten nur sehr schwer stabile, überlebensfähige Klone produziert werden. Von über 150 selektierten GFP-CP91 Klonen waren nur vier Klone stabil und lebensfähig. Zwei Klone zeigten ein starkes GFP-CP91 Signal. Der Klon mit dem stärksten GFP-CP91 Signal wurde für die weiteren Untersuchungen in adhärent wachsender Kultur und Schüttelkultur untersucht. Das GFP-CP91 Fusionsprotein dieser Mutante wurde im Vergleich zum endogenen CP91 1,8-fach überexprimiert (Abbildung 5A). Dies gilt für die ganze Zellpopulation. Individuelle Zellen zeigten teilweise abweichende Expressionsgrade. Die Bestimmung erfolgte durch die densitometrische Auswertung eines Western Blots mit der Software *ImageJ* (Auswertung siehe Abbildung 24). Charakteristisch für diese Zelllinie waren das Auftreten überzähliger Centrosomen und multinukleärer Zellen, sowie ein verlangsamtes Wachstum. Circa 57 % der adhärent wachsenden Zellen und ca. 52% der Zellen in Schüttelkultur zeigten überzählige, Mikrotubuli-nukleierende Centrosomen, die kernassoziiert oder frei im Cytoplasma vorlagen (Abbildung 13;  $N < C$ ). Jeweils nur ca. 26% der adhärent wachsenden und ca. 29% der in Schüttelkultur wachsender Zellen zeigten einen Wildtyp-ähnlichen Phänotyp ( $N=C=1$ ). Es kamen auch häufig Zellen vor, die eine höhere Anzahl an Kernen und Centrosomen im gleichen Verhältnis hatten ( $N=C > 1$ , 12,7-14,5%). Der Anteil an Zellen mit überzähligen Centrosomen im Vergleich mit der AX2 Kontrolle zeigte jedoch signifikante Differenzen. Es konnte auch ein geringer Anteil an Cytoplasten (= kernlose Zellen) beobachtet werden.

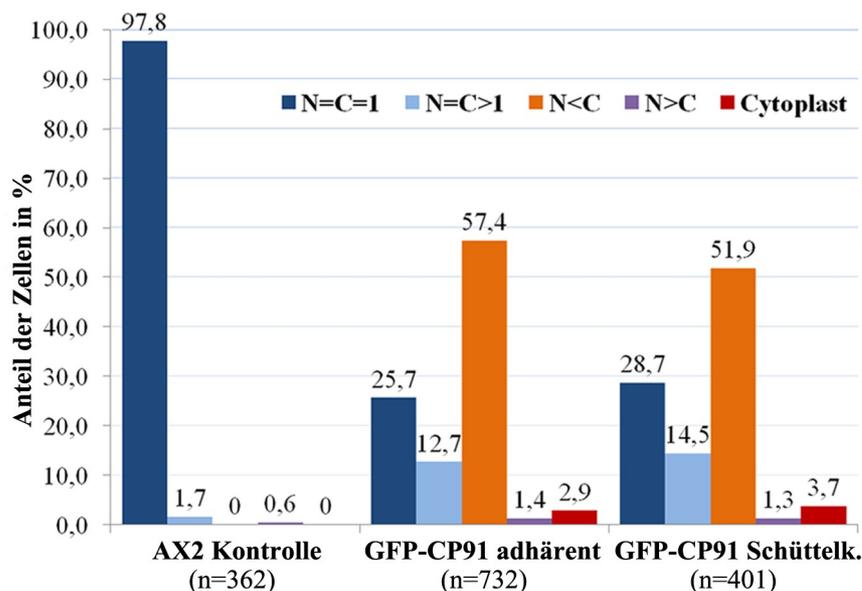


Abbildung 13: Die Überexpression von GFP-CP91 führt zu überzähligen Centrosomen. Dargestellt ist das prozentuale Verhältnis der Kerne und Centrosomen einzelner Zellen in adhärent wachsender Kultur (CP91 GFP adhärent; n=732) und Schüttelkultur (CP91 GFP Schüttelk.; n=401) im Vergleich mit einer adhärent wachsenden AX2 Kontrolle (n=362). Auf der Y-Achse ist der prozentuale Anteil der Zellen an der ausgewerteten Gesamtzellzahl dargestellt. Die X-Achse gibt das Centrosomen -Kern-Verhältnis an, wobei N für Nukleus / Kern und C für Centrosom steht.

Die Abbildung 14 zeigt Interphasezellen der adhärent wachsenden GFP-CP91 überexprimierenden Zellkultur. Obwohl das Signal des GFP-CP91 Überexpression in der Zellkultur stark war, variierte die Stärke der Signale bei individuellen Zellen innerhalb der Kultur und auch von individuellen Centrosomen innerhalb einer Zelle. Es konnten oft kleine GFP-CP91 Signale im Cytoplasma beobachtet werden. Das könnte ein Hinweis auf Bruchstücke oder Fragmente einzelner Centrosomen sein. Um zu prüfen, ob andere centrosomale Komponenten mit den GFP-Signalen assoziiert sind, wurden verschiedene centrosomale Markerproteine fluoreszenzmikroskopisch untersucht. In der Abbildung 14 B ist gut zu erkennen, dass die Größe der Markerproteine mit der Stärke des GFP-CP91 Signals korreliert sind. Kleine freie GFP-CP91 Signale sind ebenfalls mit schwachen centrosomalen CP39 (B) Signalen assoziiert (siehe B““ Inset). Abbildung 14 D zeigt auch, dass die Größe der Signale von Coronaproteinen, wie CP148, oft im Verhältnis zur Stärke des GFP-CP91 Signals steht (D““ Inset). Rückblickend auf Abbildung 9 B könnte man bei großen Signalen eine Centrosomenkoaleszenz vermuten, wenngleich in Abbildung 14 D keine separaten GFP-CP91 Signale zu sehen sind. Die Centrosomenkoaleszenz ist ein Mechanismus zur Regulierung der Anzahl von funktionellen Centrosomen. Wenn überzählige kernassoziierte Centrosomen sich an der Spindelbildung beteiligen können multipolare Spindeln entstehen. Um das zu vermeiden können sich überschüssige Centrosomen zu Beginn der Mitose miteinander verbinden und sich anschließend an einer bipolaren Spindelbildung beteiligen (Gräf *et al.* 2003).

Aufgrund der Anwesenheit der centrosomalen Marker CP55 (A), CP39 (B), der Coronamarker CP224(C), CP148 (D) und  $\gamma$ -Tubulin (E) kann man davon ausgehen, dass jedes GFP-CP91 Signal ein vollständiges, funktionsfähiges *bona fide* Centrosom bzw. eine intakte strukturelle Einheit darstellt. Für die Phänotypisierung der CP91 Überexpressionsmutante wurde daraufhin die Anzahl und Verteilung der Centrosomen und Kerne untersucht. In den Immunfluoreszenzuntersuchungen aller Proben zeigten sich jedoch vereinzelt auch punktförmige CP91 Signale bzw. Artefakte außerhalb sowie innerhalb von untersuchten Zellen. Diese Signale waren weder mit Mikrotubuli, noch mit centrosomalen bzw. Coronamarkern assoziiert und könnten durch Einschlüsse oder aggregierte Farbstoffe entstehen. Auch Proteinaggregate geplatzter Zellen auf dem Trägermaterial können eine Ursache dafür sein. Um solche falsch positiven Centrosomensignale auszuschließen bzw. um Missverständnisse während der Auswertung und Diskussion zu vermeiden, wurden nur intakte strukturelle centrosomale Einheiten ausgewertet. Es wurden deshalb nur MTOCs mit centrosomaler Färbung für alle Phänotypauswertungen ausgezählt. In allen folgenden Phänotypauswertungen sind daher die ausgezählten Centrosomen mit MTOCs gleichzusetzen.

Abbildung 15 A zeigt die Verteilung der Centrosomen und Kerne einzelner Zellen von adhärent wachsender Kultur (n=732) bzw. Schüttelkultur (n=401) im Vergleich zu einer AX2 Kontrolle (n=362) in einem dreidimensionalen Diagramm. Auf der Y-Achse ist der prozentuale Anteil der individuellen Zellen an der ausgewerteten Gesamtzellzahl dargestellt. Die X-Achse gibt die Anzahl der Centrosomen einzelner Zellen und die Z-Achse die Anzahl der Kerne einzelner Zellen an. Es gab keine Karyoplasten (Zellen mit Zellkern, aber ohne Centrosom) dafür aber 2,9-3,7% Cytoplasten. Die GFP-CP91 Überexpression zeigte eine Verdreifachung der durchschnittlichen Centrosomenanzahl pro Zelle (Abbildung 15 B) und fast eine Verdopplung der durchschnittlichen Kernanzahl pro Zelle (Abbildung 15 C). Die adhärent wachsende Kultur und die Schüttelkultur des GFP-CP91 Überexpressionsstammes zeigten keine großen Unterschiede im Bezug auf die durchschnittliche Centrosomen- bzw. Kernanzahl untereinander. In Gräf *et al.* 2003 konnte gezeigt werden, dass ein Drittel der AX2 Wildtyp-Zellen in Schüttelkultur mehr als einen Kern besitzen. Das Auftreten von Wildtypzellen mit mehr als zwei Kernen war dagegen sehr gering und es konnten auch keine überzähligen Centrosomen beobachtet werden. Das scheint eine stabile Eigenschaft des AX2 Wildtyps in Schüttelkultur zu sein. Eine Hypothese ist das die Kerne bei Schüttelkultur aufgrund einer fehlerhaften oder nicht stattfindenden Kernteilung größer werden und ohne Kernteilung auch keine Cytokinese stattfindet. Im Gegensatz dazu zeigten adhärent wachsende CP91 Mutanten und CP91 Mutanten in Schüttelkultur keine großen Unterschiede in der Vielkernigkeit und Centrosomenanzahl. Im Verhältnis zur AX2 Kontrolle zeigte die Anzahl und Verteilung der Centrosomen und Kerne hingegen signifikante Unterschiede und eine sehr hohe Variabilität. Dies kommt auch durch die große Standardabweichung zum Ausdruck.

## Ergebnisse

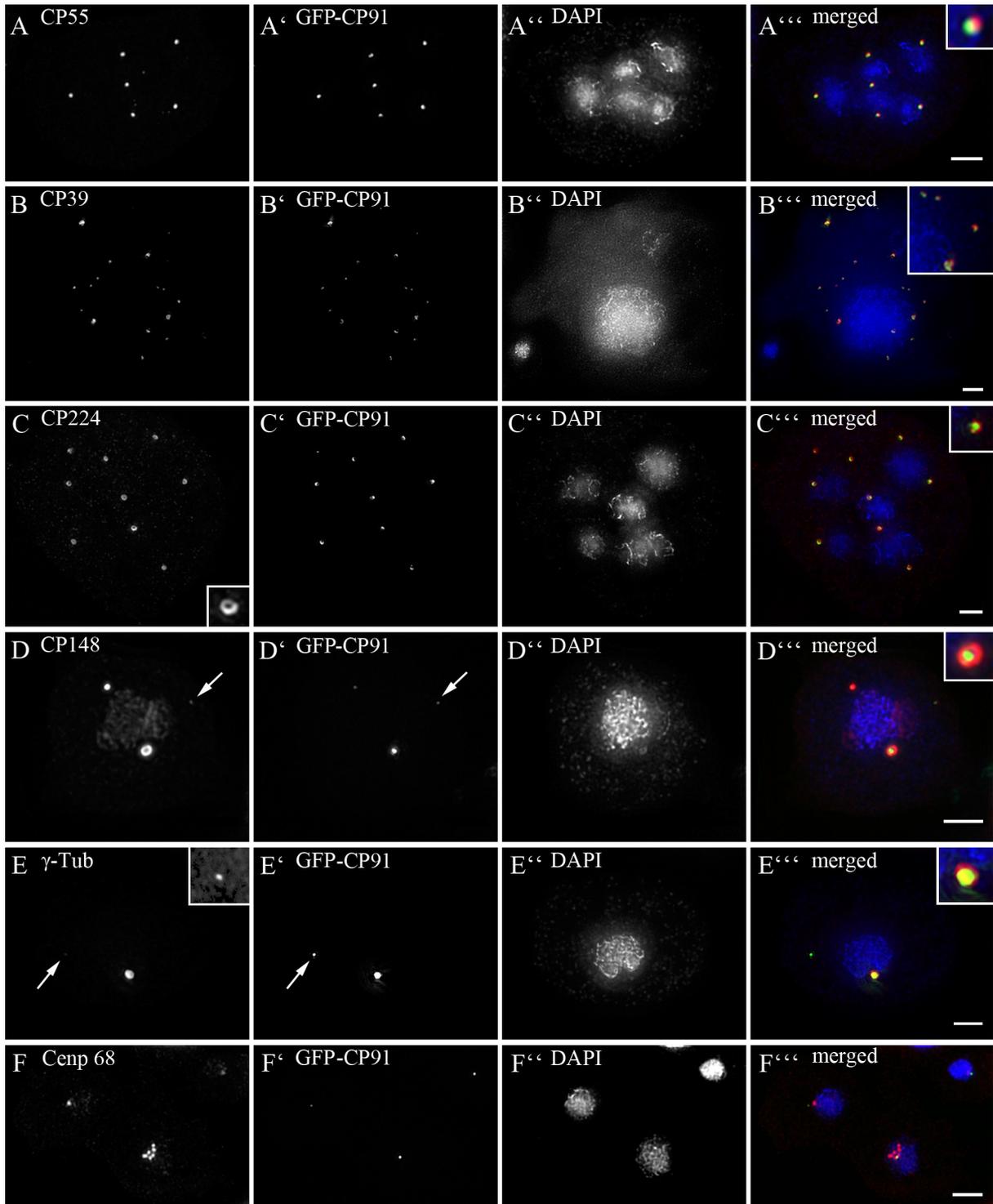


Abbildung 14: Verteilung centrosomaler Markerproteine in adhärent wachsenden GFP-CP91 Zellen, für die centrosomale Core-Region (CP55, CP39), die Corona (CP224, CP148,  $\gamma$ -Tubulin) und Centromere (Cenp68). Die Abbildung zeigt jeweils eine Interphasezelle (Ausnahme ist Abbildung F mit 3 Zellen), die mit Methanol fixiert wurden. GFP-CP91 überexprimierende Zellen wurden anti-CP55 (A), anti-CP39 (B), anti-CP224 (C), anti-CP148 (D), anti- $\gamma$ -Tubulin (E) und anti-Cenp68 (F) gefärbt. Die „Insets“ in der rechten Spalte zeigen die Vergrößerung repräsentativer Centrosomen. Freie Centrosomen sind in Abbildung D und E mit Pfeilen markiert. Das Inset in Spalte 1 C zeigt ein vergrößertes, um den Faktor 3, ringförmiges CP224 Corona-Signal. Das Inset in Spalte 1 E zeigt das  $\gamma$ -Tubulin Signal eines freien Centrosoms. Aufgrund der Schwäche des Signals wurde das Inset um den Faktor 2 vergrößert und der Eingabewert der Gradationskurvenfunktion von Photoshop von 255 auf 40 eingestellt. Die überlagerten Bilder zeigen die Antikörper-Färbungen in Rot, GFP-CP91 in Grün und DAPI (DNA) in Blau. Die Balken betragen jeweils 3  $\mu$ m. Die Bilder in voller Auflösung befinden sich in der CD im Anhang.

## Ergebnisse

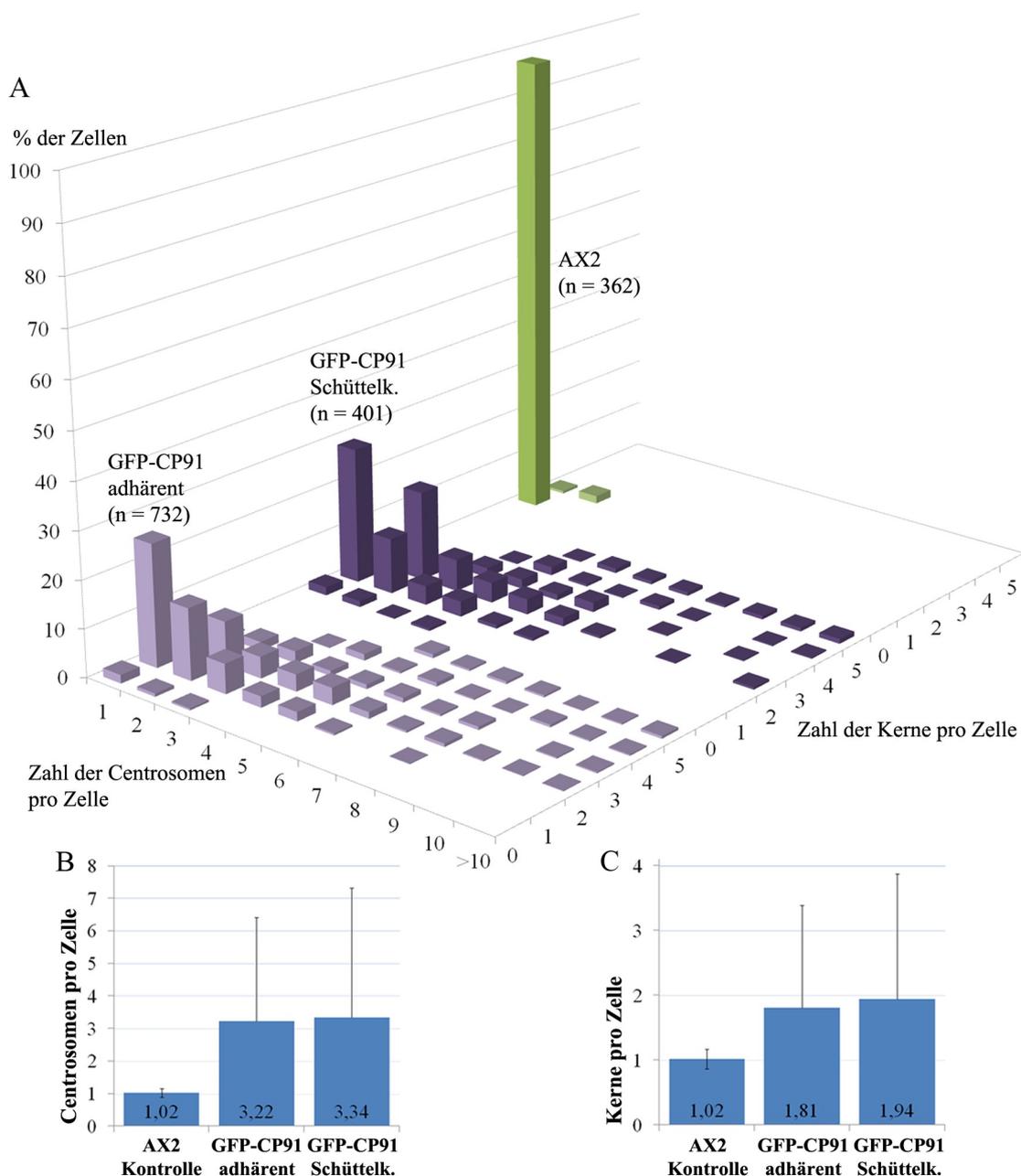


Abbildung 15: Phänotypauswertung der GFP-CP91 Überexpression. (A) Dargestellt ist die Verteilung der Kerne und Centrosomen einzelner Zellen in adhärent wachsender Kultur (CP91-GFP adhärent; n=732) und Schüttelkultur (CP91-GFP Schüttelk.; n=401) im Vergleich mit einer adhärent wachsenden AX2 Kontrolle (n=362). Auf der Y-Achse ist der prozentuale Anteil der Zellen an der ausgewerteten Gesamtzellzahl dargestellt. Die X-Achse gibt die Anzahl der Centrosomen einzelner Zellen und die Z-Achse die Anzahl der Kerne einzelner Zellen an. Es gab keine Karyoplasten (Zellen mit Zellkern aber ohne Centrosom), dafür aber Cytoplasten (kein Zellkern). Die Ausgangsdaten der Abbildung 13 A befinden sich ebenfalls in einer tabellarischen Form im Anhang (B) Darstellung der durchschnittlichen Centrosomenanzahl pro Zelle. Es zeigte sich im Durchschnitt eine Verdreifachung der Centrosomenanzahl pro Zelle im Vergleich zu der AX2 Kontrolle. (C) Darstellung der durchschnittlichen Kernanzahl pro Zelle. Es zeigte sich fast eine Verdoppelung der Kernanzahl zum Vergleich einer AX2 Kontrolle. Mittelwerte  $\pm$  S.D. sind angegeben.

### 2.1.8 GFP-CP91 Überexpression führt zu einem Karyokinesedefekt

In zahlreichen Organismen, einschließlich *Dictyostelium*, konnte die Notwendigkeit von Centrosomen für eine reguläre Karyokinese und Cytokinese bestätigt werden (Gräf *et al.*, 2003). Neben einer erhöhten Anzahl von Centrosomen und Zellkernen konnten bei den GFP-CP91 Überexpressionsstämmen starke Größenunterschiede in der Zell- bzw. Kernfläche im Vergleich zum AX2-Wildtyp beobachtet werden. Auch ein erhöhter DNA-Gehalt konnte nachgewiesen werden. Daher könnte man vermuten, dass CP91 einen Einfluss auf die Kernteilung (Karyokinese) hat, was auf Probleme in der Mitose (Spindelorganisation, Checkpoint-Regulation oder ähnliches) hindeutet. Für einen Größenvergleich von Zellen bzw. Kernen wäre eine Auswertung der respektiven Volumina optimal gewesen. Aufgrund der verwendeten Software, der Bildaufnahmeparameter und der wegen der PSF größeren axialen gegenüber lateralen Ausdehnung der Fluoreszenzsignale wäre die aufwändige Bestimmung der Volumina ohnehin stark fehlerbehaftet gewesen. Daher erfolgte die Messung der Zell- bzw. Kernfläche im zweidimensionalen Bild von Phasenkontrastaufnahmen mit dem Konturmessungstool der Axiovision Software 4.8, um eine Abschätzung der Veränderungen vornehmen zu können. Im Vergleich mit der AX2-Kontrolle ( $47,8 \mu\text{m}^2$ ,  $n=362$ ) zeigte sich bei der adhärent wachsenden GFP-CP91 Zellkultur (Mittelwert  $333,5 \mu\text{m}^2$ ;  $n=333$ ) eine mehr als Versechsfachung und bei der Schüttelkultur (Mittelwert  $161,7 \mu\text{m}^2$ ;  $n=401$ ) eine Verdreifachung der Zellfläche (Abbildung 16 A). Die Unterschiede zwischen adhärentem Wachstum und Schüttelkultur sind wahrscheinlich physikalischer Natur und durch auftretende Scherkräfte in der Schüttelkultur zu erklären. Das wird in der Abbildung 17 deutlich. Ein Großteil der Zellen der GFP-CP91 Schüttelkultur (CP91-GFPSchüttelk.) liegt im Bereich der Zellfläche des AX2-Wildtyps  $<50$  bis  $100 \mu\text{m}^2$ . Aber es konnten auch Zellen weit über  $1000 \mu\text{m}^2$  beobachtet werden. Bei der Kernfläche (Abbildung 16 B) sind die Größenunterschiede nicht so gravierend. Die GFP-CP91 überexprimierenden Zellen weisen im Mittel eine Verdopplung der Kernfläche auf. Die Intensität der DAPI-Signale variierte ebenfalls stark (Abbildung 14). Dies kann ein Hinweis auf eine erhöhte Ploidie sein. Die Auswertung des DNA-Gehalts (Abbildung 16 C) von adhärent wachsenden GFP-CP91 Zellen ( $n=382$ ) und einer AX2 Kontrolle ( $n=318$ ) bekräftigte diese Vermutung. Es zeigte sich das 1,7-fache des durchschnittlichen DNA-Gehalts pro Zellkern in CP91 überexprimierenden Zellen. Die hohe Variabilität des DNA-Gehalts einzelner Zellkerne wird durch die große Standardabweichung verdeutlicht. Die Abbildung 16 D und 16 E zeigen den normalisierten DNA Gehalt jeder einzelnen Zelle (y-Achse) der nach steigender Größe (x-Achse) angeordnet wurde. Der Vergleich der beiden Diagramme (D und E) zeigt einen erhöhten Anteil von Zellen mit aberranter Ploidie bei GFP-CP91 Zellen. Circa

## Ergebnisse

25% (94 Zellen) der GFP-CP91 Zellen (16 E) weisen einen mehr als doppelten DNA-Gehalt im Vergleich zum normalisierten Mittelwert der AX2 Zellen (16 D) auf. Diese Ergebnisse unterstützen die Vermutung, dass CP91 in der Chromosomensegregation eine Rolle spielt.

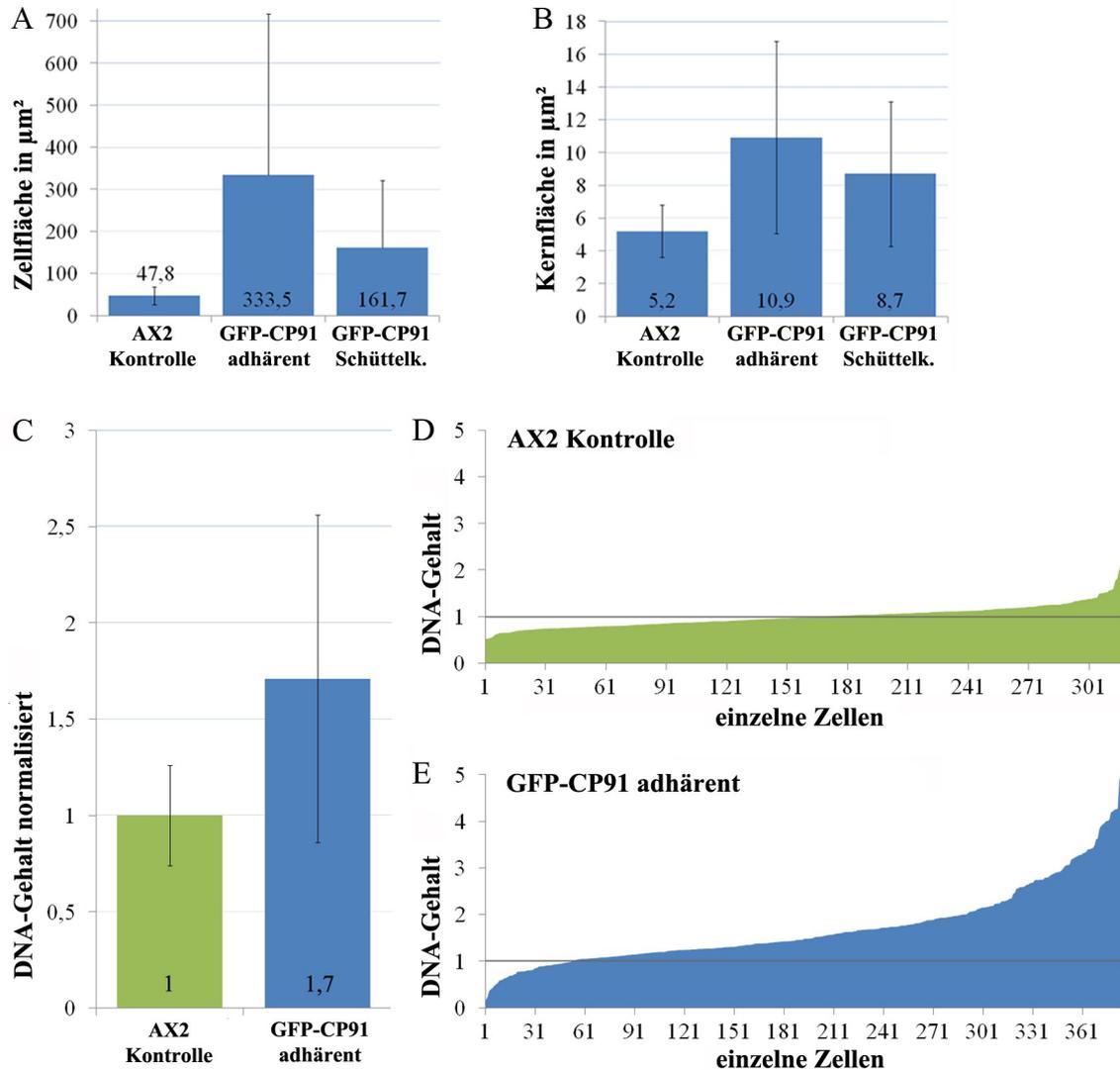


Abbildung 16: GFP-CP91 Überexpression führt zu einer erhöhten Ploidie. Auswertung der Zellfläche, Kernfläche und DNA-Gehalts der GFP-CP91 Überexpression. (A) Dargestellt ist die durchschnittliche Zellfläche ( $\mu\text{m}^2$ ) in adhärent wachsender Kultur (GFP-CP91 adhärent;  $n=333$ ) und Schüttelkultur (GFP-CP91 Schüttelk.;  $n=401$ ) im Vergleich mit einer adhärent wachsenden AX2 Kontrolle ( $n=362$ ). Die mittlere Zellfläche der adhärenen GFP-CP91 Kultur ist im Vergleich mit der AX2-Kontrolle versechsfacht und die Schüttelkultur mehr als verdreifacht. (B) Dargestellt ist durchschnittliche Kernfläche ( $\mu\text{m}^2$ ) in adhärent wachsender Kultur (GFP-CP91 adhärent;  $n=343$ ) und Schüttelkultur (GFP-CP91 Schüttelk.;  $n=351$ ) im Vergleich mit einer adhärent wachsenden AX2 Kontrolle ( $n=511$ ). Es zeigte sich fast eine Verdoppelung der Kernfläche zum Vergleich mit der AX2 Kontrolle. (C) Dargestellt ist der DNA-Gehalt, welcher als Produkt aus gemessener Kernfläche [ $\mu\text{m}^2$ ] und Intensität der DAPI-Färbung (16-Bit Graustufen) berechnet wurde. Um den DNA-Gehalt von AX2 und GFP-CP91 Zellen bestimmen zu können, wurden beide Stämme 1:1 gemischt und auf einem Objektträger fixiert. Die AX2 Zellen konnten nun anhand des fehlenden GFP-Signals von den GFP-CP91 Zellen unterschieden werden. Die Werte für adhärent wachsende GFP-CP91 Zellen ( $n=384$ ) wurden auf den Mittelwert der AX2 Kontrolle ( $=1$ ) ( $n=318$ ) normalisiert. Es zeigte sich das 1,7-fache des durchschnittlichen DNA-Gehalts pro Zellkern in CP91 überexprimierenden Zellen. Mittelwerte  $\pm$  S.D. sind angegeben. Die Grafiken 14 D, und 14 E zeigen den normalisierten DNA Gehalt jeder einzelnen Zelle (y-Achse), der nach steigender Größe (x-Achse) angeordnet wurde. Der normalisierte DNA-Gehalt mit dem Wert 1 ist mit einer Linie gekennzeichnet. Der Vergleich der beiden Diagramme (D und E) zeigt einen erhöhten Anteil von Zellen mit aberranter Ploidie bei GFP-CP91 Zellen. Circa 25% (94 Zellen) der GFP-CP91 Zellen (E) weisen einen mehr als doppelten DNA-Gehalt im Vergleich zum normalisierten Mittelwert der AX2 Zellen auf.

## Ergebnisse

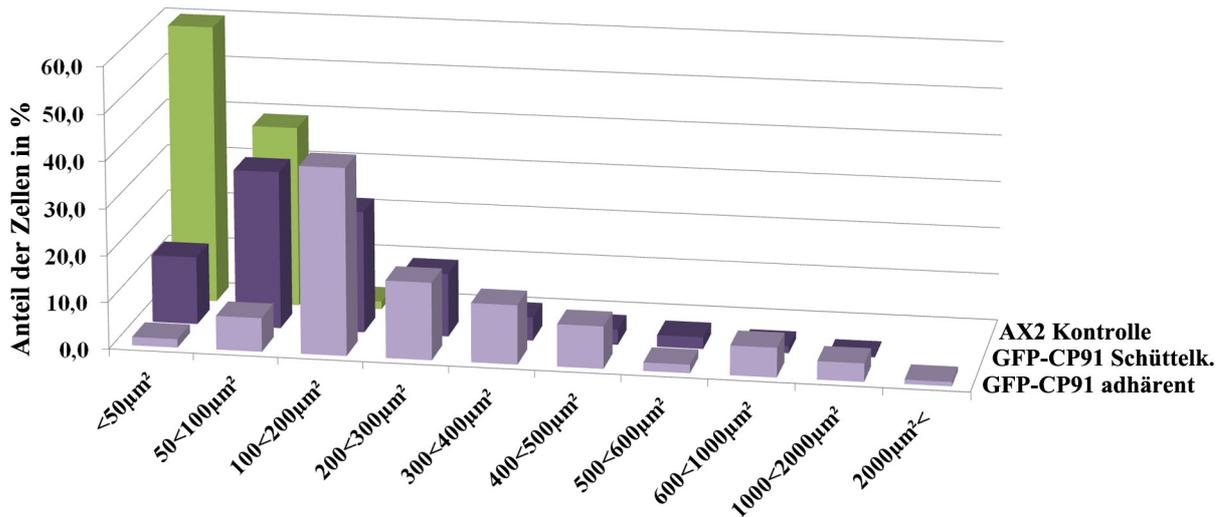


Abbildung 17: Untersuchung der Zellfläche/Größenverteilung der GFP-CP91 Überexpression. Adhärenz wachsende Zellen (GFP-CP91 adhärenz;  $n=333$ ) und Schüttelkultur (GFP-CP91 Schüttelk.;  $n=401$ ) im Vergleich mit einer adhärenz wachsenden AX2 Kontrolle ( $n=362$ ). Es zeigt sich eine eindeutige Größenzunahme der GFP-CP91 Zellen. Auf der Y-Achse ist der prozentuale Anteil der Zellen an der ausgewerteten Gesamtzellzahl dargestellt. Die X-Achse gibt die Zellflächenbereiche an. Die Ausgangsdaten der Abbildung 15 befinden sich ebenfalls in einer tabellarischen Form im Anhang.

Man kann vermuten, dass es durch Fehler bei der Spindelbildung zu Problemen bei der Segregation von Chromosomen und somit zur Vergrößerung der Kerne kommt. Ein Hinweis für die Ploidie ist die Anzahl der Centromere pro assoziierten Centrosom. Abbildung 18 zeigt eine adhärenz wachsende GFP-CP91 überexprimierende Zelle in der G2-Phase (geclusterte Centromere sichtbar) mit zwei vergrößerten Zellkernen. Die Kerne haben jeweils zwei kern-assoziierte Centrosomen und die Centromere sind mit dem Centromermarker Cenp68 angefärbt (rot in Abbildung A', A''). Das GFP-Signal wurde zudem mit einem GFP-Booster Atto488 (Chromotek) verstärkt (A'), da GFP-Signale im Verlaufe der Methanolfixierung zu sehr abgeschwächt werden. *Dictyostelium* ist im Wildtyp haploid, besitzt 6 Chromosomen und zeigt in der G2 Phase und während der Mitose sechs Centromersignale, welche normalerweise in der Nähe der Centrosomen geclustert vorliegen (Samereier *et al.* 2011). Diese Zelle besitzt

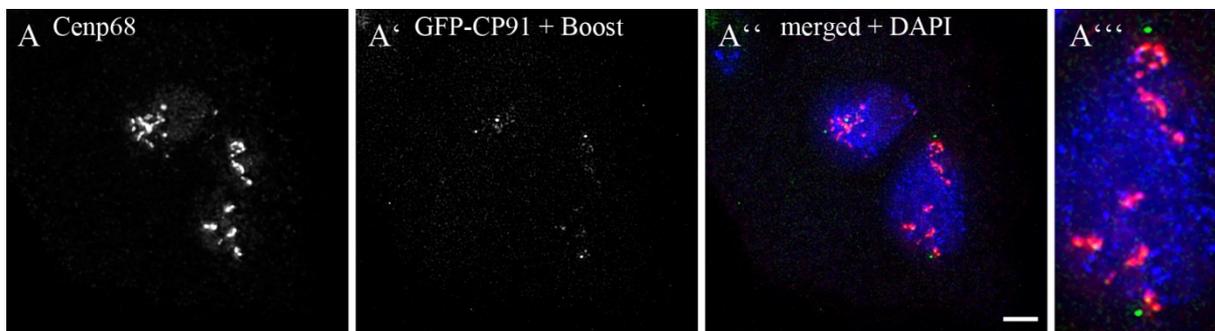


Abbildung 18 : Ungeclusterte Centromere in anormalen GFP-CP91 Zellen. Eine GFP-CP91 überexprimierende Zelle in der G2 Phase, die mit Methanol fixiert wurde und mit dem Centromermarker Cenp68 gefärbt ist. Die überlagerten Bilder zeigen die Antikörper-Färbungen in Rot, GFP-CP91 in Grün und DAPI (DNA) in Blau. Das GFP-Signal wurde zudem mit einem GFP-Booster Atto488 verstärkt (A'). Abbildung A''' zeigt einen vergrößerten Ausschnitt mit einer Überzahl an teilweise ungeclusterten Centromeren. Balken =  $3\mu\text{m}$ .

deutlich mehr als sechs Cenp68 Signale für jedes assoziierte Centrosom. Es ist auch eine Auflösung bzw. Auflockerung des Centromerclusters zu beobachten. Zudem kann man in dem vergrößerten Ausschnitt A“ schwache GFP-Signale erkennen, die scheinbar mit den angefärbten Centromeren kolokalisieren. Eine genaue Aussage zur Kolokalisierung kann hier nicht getroffen werden, da dies jenseits der Auflösungsgrenze des verwendeten Systems von 200 nm liegt. Ob eine direkte Interaktion zwischen CP91 und Cenp68 besteht, konnte in den bisherigen Versuchen nicht nachgewiesen werden.

### **2.1.9 GFP-CP91 Überexpression zeigt ein verändertes Wachstumsverhalten**

GFP-CP91 überexprimierende Zellen zeigten in der Phänotypanalyse einen abnormen Karyotyp, sowie starke Störungen in der Mitose. Es war daher ein verlangsamtes Wachstum im Vergleich mit AX2 Kontrollzellen zu erwarten. Die Zellen in der Schüttelkultur sollten durch die erschwerten Wachstumsbedingungen, in Verbindung mit den zuvor genannten Defekten, ein stärker reduziertes Wachstum haben als adhärente Zellen. Das langsame Wachstum konnte während der Anzucht der Zellkulturen beobachtet werden und wurde in einem Wachstumsexperiment quantifiziert. Die Anfangskonzentration der untersuchten Zellen war  $0,5 \times 10^6$  Zellen/ml. Abbildung 19 zeigt den Kurvenverlauf der AX2 Kontrolle, welche die stationäre Phase (ca.  $1,9 \times 10^7$  Zellen/ml) nach ca. 60 Stunden erreicht hatte. Die GFP-CP91 Zellkultur wies zu diesem Zeitpunkt nur etwa 20% der Zelldichte der AX2 Kontrolle auf. Eine maximale Zelldichte von ca.  $5,5 \times 10^6$  Zellen/ml erreichte der GFP-CP91 Stamm erst nach vier Tagen. Das entspricht ca. 30% des Maximums der AX2 Kontrolle. Weiterhin konnte nach längerer Aufzucht in axenischer Schüttelkultur ein Verlust des veränderten Phänotyps bei den Mutanten beobachtet werden. Ein starker Selektionsdruck gegen die GFP-CP91 stark exprimierenden Zellen führte nach einigen Tagen und mehreren Wachstumsgenerationen zu einem deutlich verminderten Defekt-Phänotyp und zu einem schnelleren Wachstum. Die Wachstumsrate der Überexpressionsmutanten kam aber dennoch nicht an die Wachstumsrate des AX2-Wildtyps heran. Die Sporenbildung wurde durch die Expression von GFP-CP91 dagegen nicht beeinflusst. Die Mutanten zeigten aber nach der Sporenbildung und Rekultivierung ebenfalls einen stark verminderten Defekt-Phänotyp bis hin zu seinem fast vollständigen Verlust. Das liegt möglicherweise daran, dass sich nur die halbwegs gesunden Zellen an der Fruchtkörperbildung beteiligen. Daraufhin wurden adhärent wachsende GFP-CP91 exprimierende *Dictyostelium*-Zellen lebend eingefrorenen und im flüssigen Stickstoff für weitere Untersuchung aufbewahrt.

## Ergebnisse

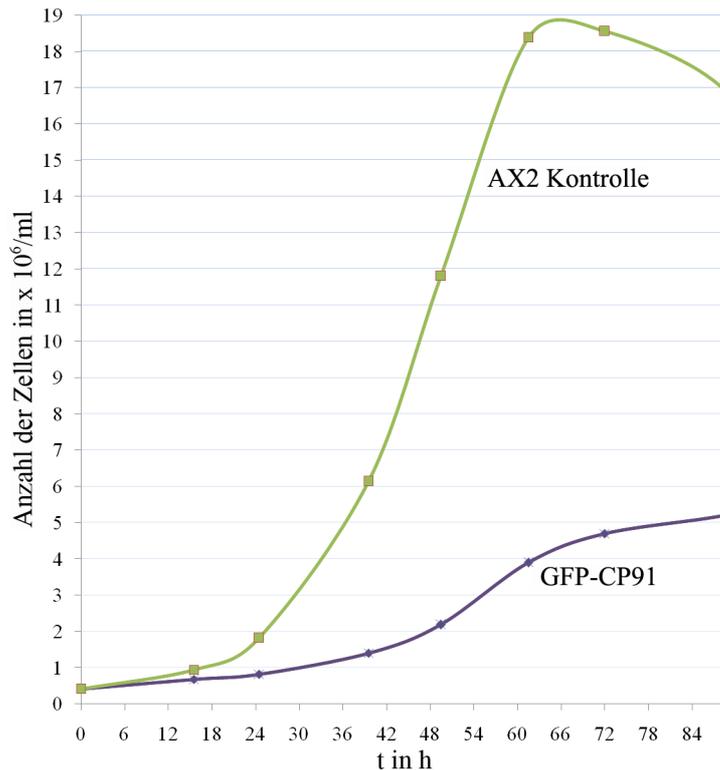


Abbildung 19: Wachstumsverhalten von GFP-CP91 Zellen und AX2 Kontrollzellen in Schüttelkultur. Die GFP-CP91 Zellen zeigten zuerst ein stark verringertes Wachstum im Vergleich zu den Kontrollzellen. Eine exponentielle Wachstumsphase nach ca. 30 h (AX2-Kontrolle) konnte bei den GFP-CP91 Zellen mit einer ähnlichen Steigung nicht beobachtet werden. Die GFP-CP91 Zellen wuchsen langsamer. Da die GFP-CP91 Zellen aber zusätzlich einen Cytokinesedefekt aufweisen wird das Ergebnis abgefälscht. Die mittlere Zellgröße der Mutante vergrößert sich stärker als die Zellzahl. Somit ist die Wachstumsrate nicht so gering wie der Graph vermuten lässt, es kommt aber dennoch nicht an die Wachstumsrate des Wildtyps heran. Auf der x-Achse ist die Zeit in Stunden, auf der y-Achse die Zelldichte in Zellen pro ml aufgetragen. Die Zellzahl wurde mit einer Neubauer *improved*-Zählkammer (0,100 mm Tiefe) bestimmt.

### 2.1.10 Die überzähligen Centrosomen entstehen während der Mitose

Nach der Phänotypauswertung der CP91 Überexpression sollte das Verhalten des GFP-CP91 in lebenden Zellen untersucht werden. Weiterhin stellte sich die Frage, wo und zu welchem Zeitpunkt die überzähligen Centrosomen entstehen. Jedes GFP-CP91 Signal war mit Markern der Core-Region wie auch der Corona assoziiert (Abbildung 14). Eine Vermutung war, dass es während der Centrosomenverdopplung in der Mitose zu einer Fragmentierung der Core-Region kommen könnte. Diese Fragmente können als Kristallisationskeime für die Rekrutierung anderer centrosomaler Proteine und Mikrotubuli dienen. Die Abbildung 10 A zeigt die Immunfluoreszenzaufnahme einer multinukleären Zelle im Metaphasestadium, die mit dem Coronamarker CP224 angefärbt wurde. Neben den freien, im Cytoplasma vorkommenden CP91-CP224 Signalen, kann man an den Spindelpolen oft zusätzliche GFP-CP91 Signale mit CP224 beobachten. Für die Untersuchung des GFP-CP91 in lebenden Zellen wurden GFP-CP91 exprimierende Zellen mit einem *cherry*-Histon-2B Konstrukt transformiert, welches das Chromatin rot färbt. Die Abbildung 20 zeigt eine weitfeldmikroskopische Zeitreihe einer Mitose. Abbildung 20 A zeigt die Fluoreszenzüberlagerung des GFP-CP91 Signals in Grün und des *cherry*-Histon-2B in Rot. Abbildung 20 B zeigt die Fluoreszenz des GFP-CP91 Fusionsproteins separat. Zu sehen ist eine zellzyklusabhängige Regulierung der GFP-CP91 Expression. Mit dem Eintritt in die

## Ergebnisse

Prophase (3min, DNA fängt an zu kondensieren) beginnt die GFP-CP91 Signalintensität sich zu vermindern, bis es in der Metaphase (12-21min) fast komplett verschwunden ist. Zu Beginn der Anaphase (22,5min) erscheinen mehrere kleine Fluoreszenzsignale (25,5min; Pfeile), welche im Verlauf der späten Anaphase (30-36min) sich zu zwei starken Signalen an der Spindelpolen (Tochtercentrosomen #) und zwei schwächeren Signalen (\*) verstärken. Die schwächeren Signale sind vermutlich zusätzliche Centrosomen oder Centrosomenfragmente.

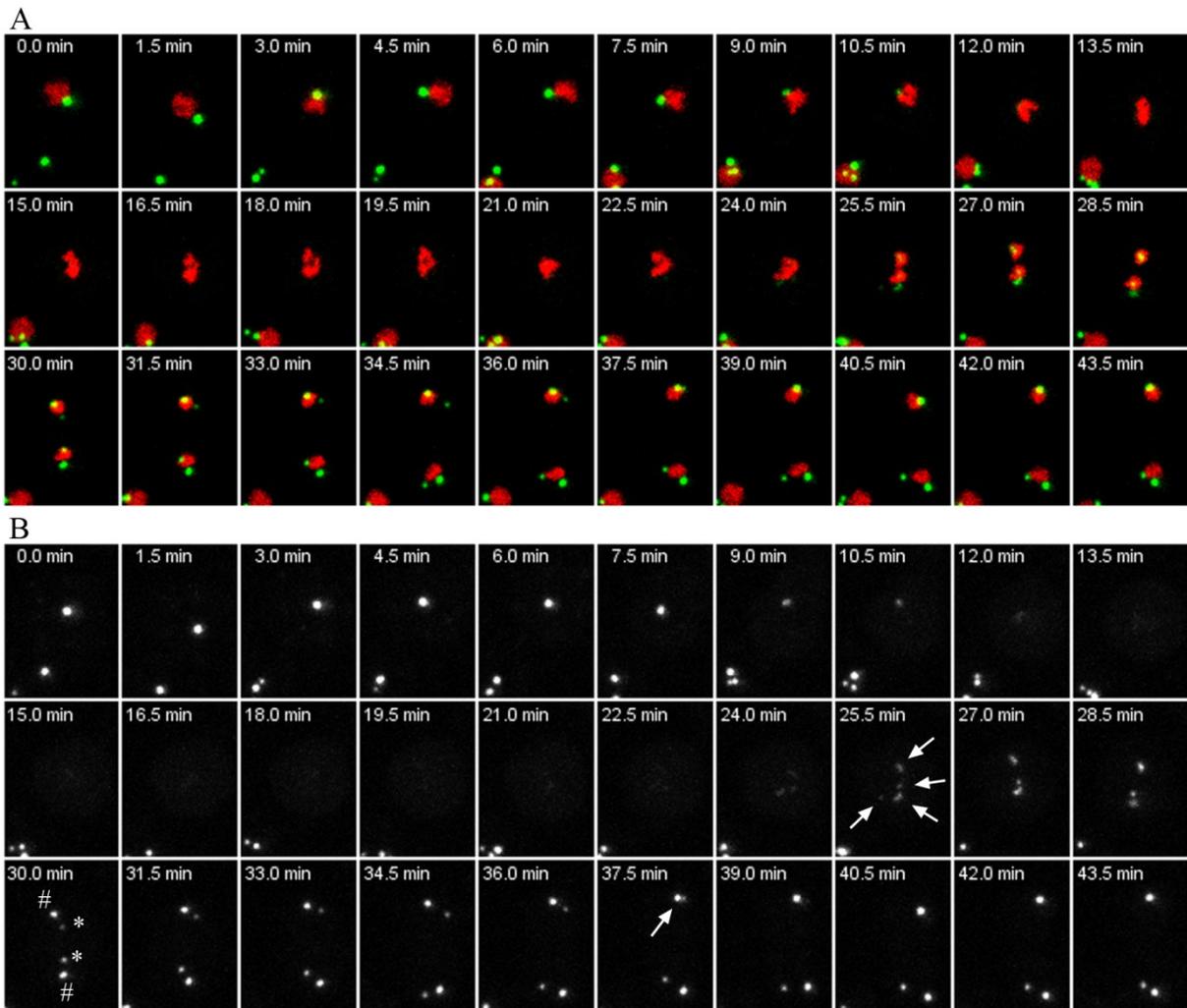


Abbildung 20: Überzählige Centrosomen entstehen während der Mitose. Mitose einer GFP-CP91 exprimierenden Zellen nach Transformation mit einem *cherry*-Histon-2B Konstrukt, welches die DNA rot färbt. Die Aufnahmen erfolgten mit konfokaler Spinning Disk Mikroskopie. Die obere Abbildung zeigt die Fluoreszenzüberlagerung des GFP-CP91 in Grün und des *cherry*-Histon-2B in Rot. Die untere Abbildung zeigt die Fluoreszenz des GFP-CP91 Fusionsproteins separat. Aufgrund räumlicher Beschränkungen sind nur bestimmte Zeitpunkte dargestellt. Beschreibung siehe Text. Die Zeitpunkte sind über der Abbildung angegeben. Für jeden Zeitpunkt wurde ein z-Stapel mit je fünf Bildern in einem Intervall von 0,5  $\mu\text{m}$  aufgenommen. Dargestellt sind die "Maximum-Intensity"-Projektionen.

Das obere der schwachen Signale vereint sich bei 37,5 bis 39 Minuten mit dem oberen Tochtercentrosom (Pfeil bei 37,5min). Das untere schwache Signal bleibt erhalten. Nach der Telophase läuft zudem die Cytokinese nicht vollständig ab. Die beiden Kerne nähern sich einander bei 70 Minuten wieder (in Abbildung nicht gezeigt; Video-Mitose1 auf CD im

Anhang) und bleiben bis zum Ende der Aufnahme bei 238 Minuten in engem Kontakt. Es entsteht somit nach der Mitose eine Zelle mit 2 Zellkernen und 3 Centrosomen. Das überzählige Centrosom bleibt bis zum Ende der Aufnahme kernassoziiert. In der Phänotyp Analyse der GFP-CP91 Überexpressionsmutante konnte man auch oft unterschiedlich große Centrosomen bzw. GFP- und Corona Signale beobachten (Abbildung 14). Diese könnten durch das Verschmelzen von überzähligen GFP-CP91 Fragmenten während der Ana- bzw. Telophase entstehen. Abbildung 21 zeigt den Ausschnitt einer Mitose beginnend mit der Anaphase. Bei 60 Sekunden entstehen an dem oberen Spindelpol 2 separate GFP-CP91 Signale (Pfeile). Die Fluoreszenzintensität der GFP-CP91 Signale steigt im Laufe der Telophase, bis sie bei 300 Sekunden wieder verschmelzen. Es entsteht ein deutlich größeres centrosomales GFP-Signal im Vergleich zu den anderen Centrosomen, wie in Immunfluoreszenzaufnahmen oft zu beobachten war. Diese Mitose ist ein Teilausschnitt einer dreikernigen mitotischen Zelle (Video-Mitose2 auf CD im Anhang).

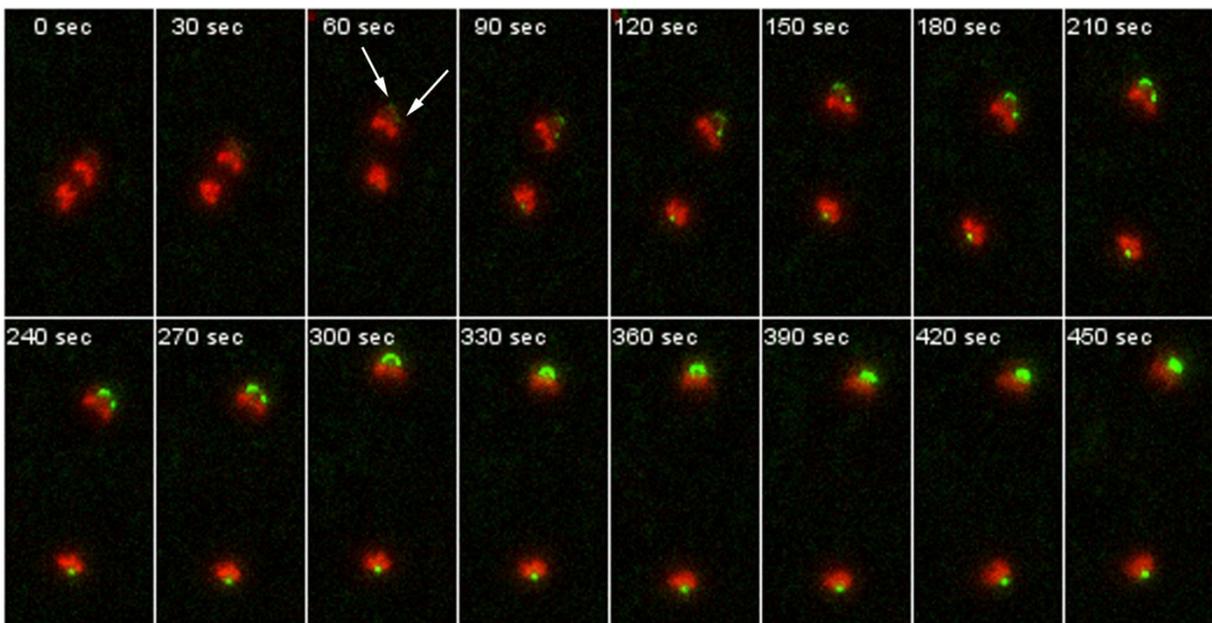


Abbildung 21: Entstehung anormaler Centrosomen in GFP-CP91 Zellen. Weitfeldmikroskopische Zeitreihe einer mitotischen GFP-CP91 Zelle. Gezeigt ist ein Ausschnitt eines Zellkerns ab dem Metaphasestadium. Die Abbildung zeigt die Fluoreszenzüberlagerung des GFP-CP91 in Grün und des *cherry*-Histon-2B in Rot. Die Pfeile bei 60 sec zeigen die Entstehung von zwei separaten GFP-CP91 Signalen, welche bei 300 sec wieder verschmelzen. Die "Maximum-Intensity"-Projektionen sind dargestellt. Für jeden Zeitpunkt wurde ein z-Stapel mit jeweils fünf Bildern in einem Intervall von 0,5  $\mu\text{m}$  aufgenommen. Die Aufnahme der z-Stapel erfolgte alle 15 Sekunden.

### 2.1.11 Die GFP-CP91 Überexpression führt zur fehlerhaften Segregation von Chromosomen in der Mitose

Neben der Entstehung von überzähligen Centrosomen während der Mitose konnten auch andere Anomalien bei der Untersuchung lebender Zellen beobachtet werden. GFP-CP91 exprimierende Zellen (mit *cherry*-Histon-2B zum Markieren der DNA) zeigten Defekte bei der äquatorialen Ausrichtung der Chromatidenpaare in der Metaphase und Fehler bei der Segregation der Chromatidenpaare in der Anaphase. Abbildung 22 zeigt den Ausschnitt einer Mitose im Metaphasestadium. Nach Verdopplung der DNA in der G2 Phase stehen die homologen Chromatidenpaare in enger Verbindung. Die Chromatidenpaare zeigen nur eine lose Anordnung und keine korrekte Ausrichtung in der Äquatorialebene.

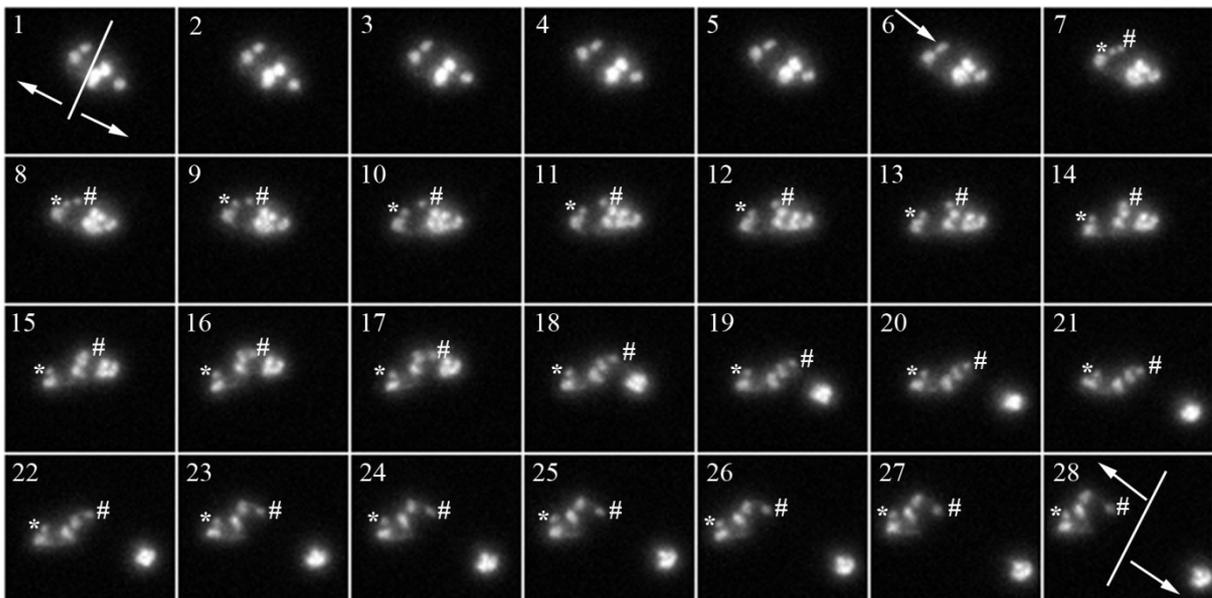


Abbildung 22: Fehlerhafte Chromosomensegregation in GFP-CP91 Zellen. Weitfeldmikroskopische Zeitreihe einer mitotischen GFP-CP91 Zelle. Gezeigt ist ein Ausschnitt eines Zellkerns im Metaphasestadium. Zu sehen sind Defekte bei der äquatorialen Ausrichtung der Chromosomen in der Metaphase (weiße Linie) und Fehler bei der Segregation der Chromosomen in der Anaphase. Pfeile in Bild 1 und 28 zeigen Richtung der Separation. In Bild 6 kennzeichnen \* und # die homologen Chromosomen eines Paares. Die "Maximum-Intensity"-Projektionen des *cherry*-Histon-2B (DNA gefärbt) ist dargestellt. Für jeden Zeitpunkt wurde ein z-Stapel mit jeweils fünf Bildern in einem Intervall von 0,5  $\mu\text{m}$  aufgenommen. Die Aufnahme der z-Stapel erfolgte alle 15 Sekunden.

Drei Chromatidenpaare liegen in der äquatorialen Ebene, welche mit einem weißen Strich im Bild 1 gekennzeichnet ist. Zwei Chromatidenpaare befinden sich links oberhalb der Ebene und ein Chromatidenpaar darunter. Die Pfeile geben die Richtung der Chromatidentrennung an. Im Bild 6 weist ein Pfeil auf eines dieser homologen Chromatidenpaare, welche beginnen sich zu trennen. Das separierende Chromatidenpaar ist mit \* und # gekennzeichnet. Eine Trennung erfolgt und die Chromatiden wandern zuerst zu den gegenüberliegenden Spindelpolen. Die Bewegung stoppt bevor eine vollständige Trennung erfolgen kann (Bild 19). Die Chromatidenpaare außerhalb der äquatorialen Ebene separieren, aber werden nicht

auf zwei Kerne verteilt. Es entstehen zwei neue Kerne mit unterschiedlicher Chromosomenanzahl. Man sieht hier eine inäquale Aufteilung der Chromatiden. So eine Fehlverteilung einzelner Chromosomen nennt man Aneuploidie. Nicht gezeigt ist die Mitose des zweiten Kerns der anfangs zweikernigen GFP-CP91 Zelle. Dieser spaltet sich in drei Einheiten, 2 Kerne und ein separates Chromosom. Der vollständige Film ist als Video-Mitose3 auf der CD im Anhang. Solch eine fehlerhafte Segregation der Chromosomen erklärt die oft beobachteten, unterschiedlich großen DNA Signale in GFP-CP91 Zellen.

### 2.1.12 Herstellung von GFP-CP91 Deletionsfragmenten

Für die Untersuchung von eventuellen Funktions- und Bindungsbereichen eines Proteins können, neben DNA-Sequenzanalysen, auch GFP-Fusionsproteine von Deletionsfragmenten hilfreich sein. In der Aminosäuresequenzanalyse mit dem COILS Programm konnten coiled-coil Strukturen (cc) vorhergesagt werden. Dieser Bereich des CP91 Proteins wurde für die Herstellung von N-terminalen GFP-Konstrukten ausgewählt. Diese wurden nach der Transformation in *Dictyostelium* und anschließender Selektion lebensfähiger Klone untersucht. 3 verschiedene Mutanten konnten generiert werden (Abbildung 23). Ein GFP-Konstrukt mit dem Fragment von AS 350 bis zu AS 799 und ein GFP-Konstrukt ohne C-Terminus (AS 1 bis AS 660) waren nicht stabil und es konnten keine lebensfähigen Klone erzeugt werden.

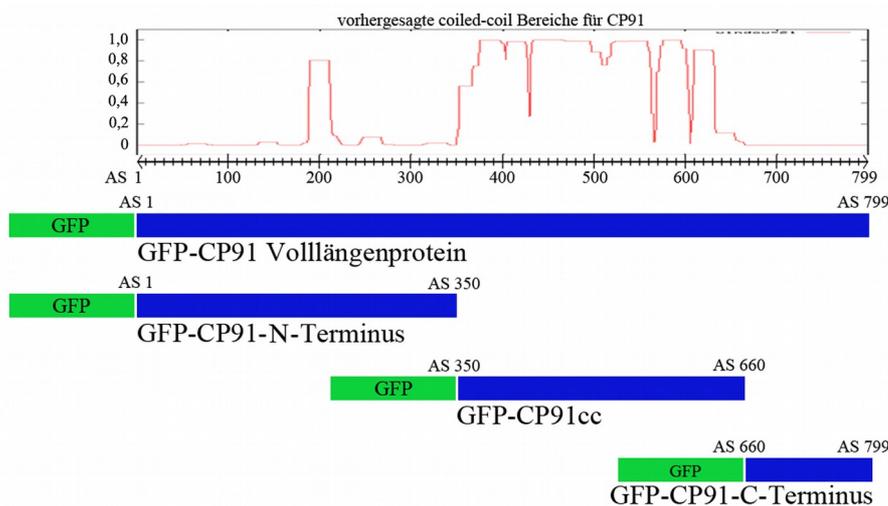


Abbildung 23: Hergestellte N-terminale GFP-Konstrukte. Vorhergesagten coiled-coil Strukturen als roter Graph dargestellt. Anfang und Ende der AS-Sequenz sind für jedes Konstrukt angegeben. GFP (grün) ist nicht im Maßstab dargestellt.

Die Klone mit dem stärksten Fluoreszenzsignal wurden im Western Blot und indirekter Immunfluoreszenzmikroskopie untersucht. Es wurden gleiche Proteinmengen (16µg) der Kernextrakte mittels SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine Nitrocellulosemembran übertragen und die GFP-Fusionsproteine mit Hilfe des polyklonalen CP91 Antikörpers nachgewiesen. Die Detektion erfolgte mittels Alkalischer Phosphatase Reaktion (Abbildung 24 B) bzw. ECL-

Färbung (Abbildung 24 A). In der Western Blot Analyse zeigte der GFP-CP91-N-Terminus eine ca. 2,3-fache Überexpression und GFP-CP91cc eine ca. 3,3-fache Überexpression im Vergleich zum endogenen CP91 des jeweiligen Überexpressionsstammes (Abbildung 24 A). Interessanterweise scheint das endogene CP91 im Vergleich mit dem Wildtyp (AX2) unterrepräsentiert zu sein. Vergleicht man die Intensität des endogenen CP91 der verschiedenen GFP-Konstrukte mit dem des Wildtyps und normalisiert die Werte (endogenes CP91; AX2=1) erhält man für das GFP-CP91 Volllängenkonstrukte den Wert 0,6, für den GFP-CP91-N-Terminus 0,3 und für GFP-CP91cc ebenfalls 0,3. Die Summe der Signalintensität des GFP-CP91-Konstruktes und endogenen CP91 des jeweiligen Stammes ist dagegen gleich oder größer dem des Wildtyps (Abbildung 24 A, normalisierte Einzelwerte sind jeweils an der Bande angegeben). Ein Kernextrakt des GFP-CP91-C-Terminus (Abbildung 24 B) wurde zusammen mit Kernextrakten aus CP91-RNAi Klonen (hier nicht gezeigt) aufgetrennt und daher zusätzlich mit einem polyklonalen CP55-Antikörper gefärbt. Die Klone des GFP-CP91-C-Terminus waren sehr heterogen und zeigten nur einen kleinen Anteil an Zellen mit einem deutlichen GFP-Signal. Für die Ermittlung der Überexpression war das Signal nicht ausreichend bzw. repräsentativ. Die Bestimmung der Intensitäten erfolgte durch die densitometrische Auswertung der Western Blots mit der Software *ImageJ*.

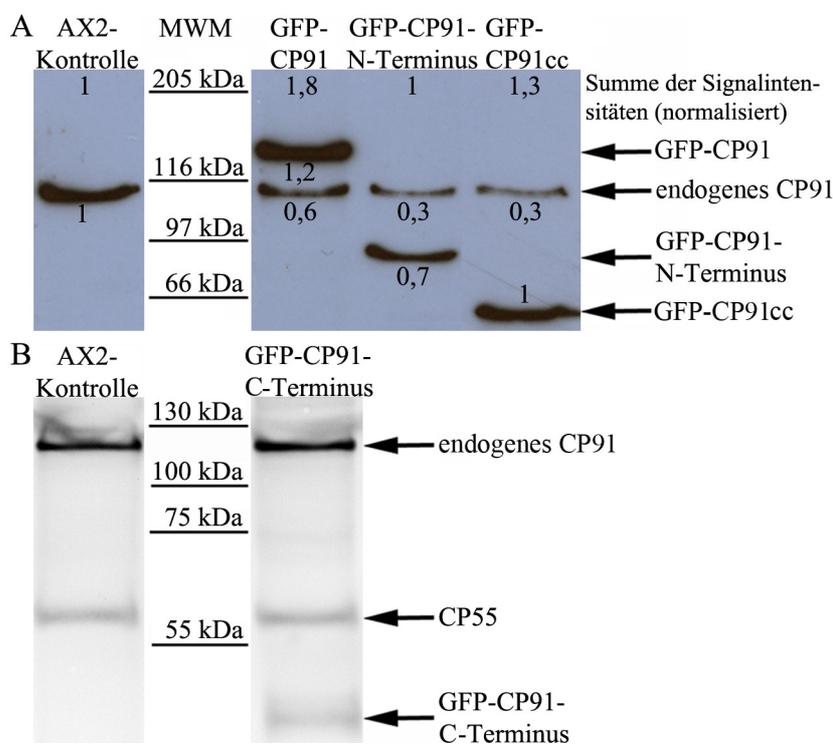


Abbildung 24: Western Blot Analyse der GFP-Konstrukte. Jeweils 16µg Protein eines Kernextrakts wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Nachweis des endogenen CP91, des GFP-CP91 Volllängenproteins und der GFP-CP91 Deletionskonstrukte erfolgte mit dem aufgereinigten polyklonalen CP91-Antikörper. (A) Die gemessenen Intensitäten der Signale wurden auf den Wert des endogenen CP91 des Wildtyps (AX2=1) normalisiert und sind an der jeweiligen Bande angegeben. Die Summe der Signalintensität von endogenem CP91 u. GFP-Konstrukt des jeweiligen Stammes sind gekennzeichnet. Die Detektion der Proteinbanden wurde in A mit der ECL-Methode und in B Alkalischer Phosphatase durchgeführt. (B) Ein Kernextrakt des GFP-CP91 C-Terminus wurde mit zusammen mit Kernextrakten aus CP91-RNAi Klonen (hier nicht gezeigt) aufgetrennt und ist daher zusätzlich mit einem CP55-Antikörper gefärbt. Das Molekulargewicht des Standards ist angegeben.

### 2.1.13 GFP-CP91 N-Terminus verbleibt während der gesamten Mitose am Centrosom

Das weitgehende Verschwinden des volllängen-GFP-CP91 Fusionsproteins von mitotischen Centrosomen weist auf seine Lokalisation in der zentralen Schicht der Core-Region hin, da eben diese während der Mitose verschwindet. Allenfalls sehr geringe Mengen an Fusionsprotein sind von der Meta- bis Anaphase an den Spindelpolen zu beobachten. Das deutet auf den Verbleib geringer Mengen in den äußeren Schichten der Core-Region hin. Der GFP-CP91 N-Terminus verbleibt dagegen während der gesamten Mitose deutlich an den beiden Spindelpolen (Abbildung 25) und zeigt balkenförmige Signale in der Mitose (Prometa-, Meta-, Anaphase). Das GFP-Signal scheint während der Metaphase leicht verringert, die GFP-Fluoreszenz im Cytoplasma dafür aber leicht erhöht zu sein. Während der späten Anaphase und Telophase lokalisiert es zudem schwach in der Midbody-Region der zentralen Spindel (Pfeil in Abbildung 25). Eine Gegenfärbung des Centrosoms mit centrosomalen Markern zeigt eine Kolokalisation des N-Terminus mit den Core-Proteinen CP39 und CP55, dem Coronamarker  $\gamma$ -Tubulin und CEP192 (Abbildung 26). Das Verbleiben von GFP-CP91N

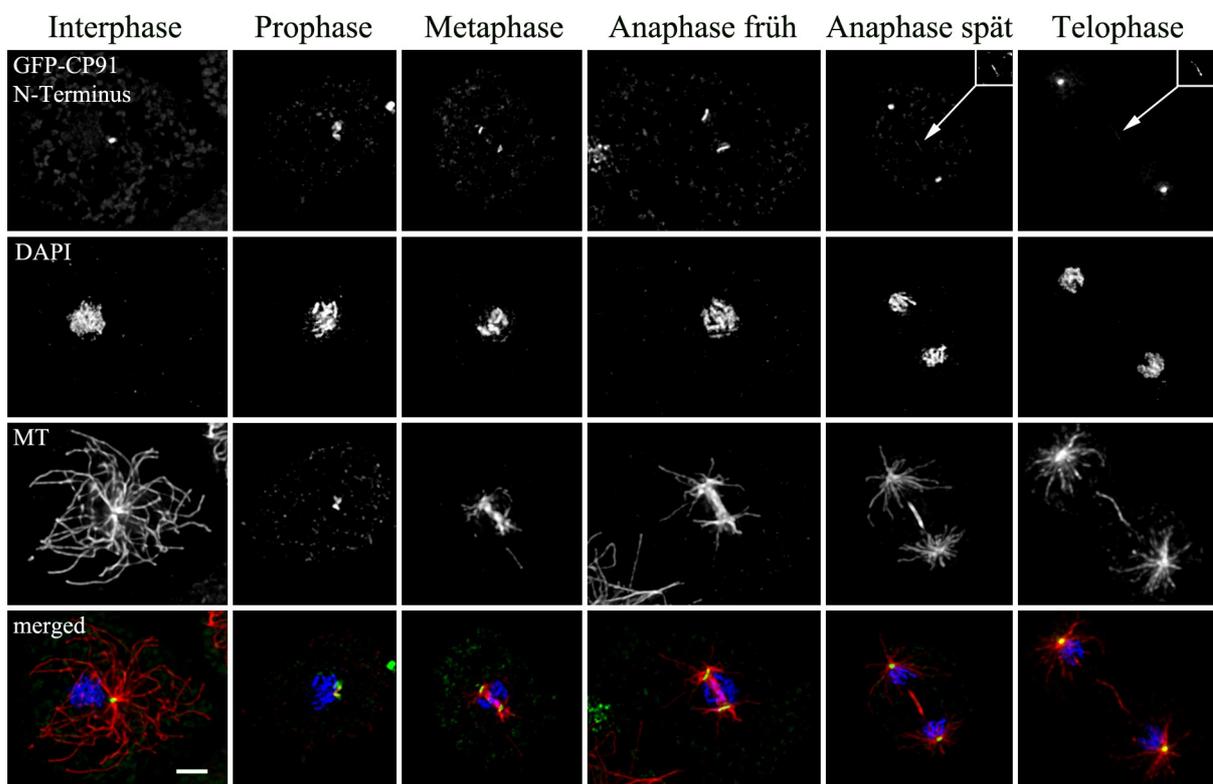


Abbildung 25: Lokalisation des GFP-CP91 N-Terminus Fusionsproteins während des Zellzyklus. GFP-CP91 N-Terminus verbleibt während der gesamten Mitose am Centrosom und in der späten Anaphase und Telophase lokalisiert es zudem schwach in der Midbody-Region der zentralen Spindel (Pfeile). Insets sind mit Autokontrastfunktion von Photoshop bearbeitet und somit verstärkt wiedergegeben. Die Zellen wurden mit Glutaraldehyd fixiert und mit anti-Tubulin (MT) in Rot und die DNA mit DAPI (blau) gefärbt. Das GFP-Signal wurde zudem mit einem GFP-Booster Atto488 verstärkt. Die GFP-Fluoreszenz ist in Grün dargestellt. Balken = 2  $\mu$ m

am Centrosom während der Mitose deutet daher auf das Fehlen einer regulatorischen Einheit hin, welche für das Abdissoziieren während der Mitose wichtig ist. Angenommen, CP91 ist so eine Art Kleber zwischen den Schichten, so könnte die C-terminale Domäne nicht nur für die Regulation der Bindung an die äußeren Schichten wichtig, sondern auch für die Funktion des kompletten Proteins als Linker zwischen den Schichten notwendig sein. GFP-CP91 N-Terminus ist in den Abbildungen mit GFP-CP91N abgekürzt.

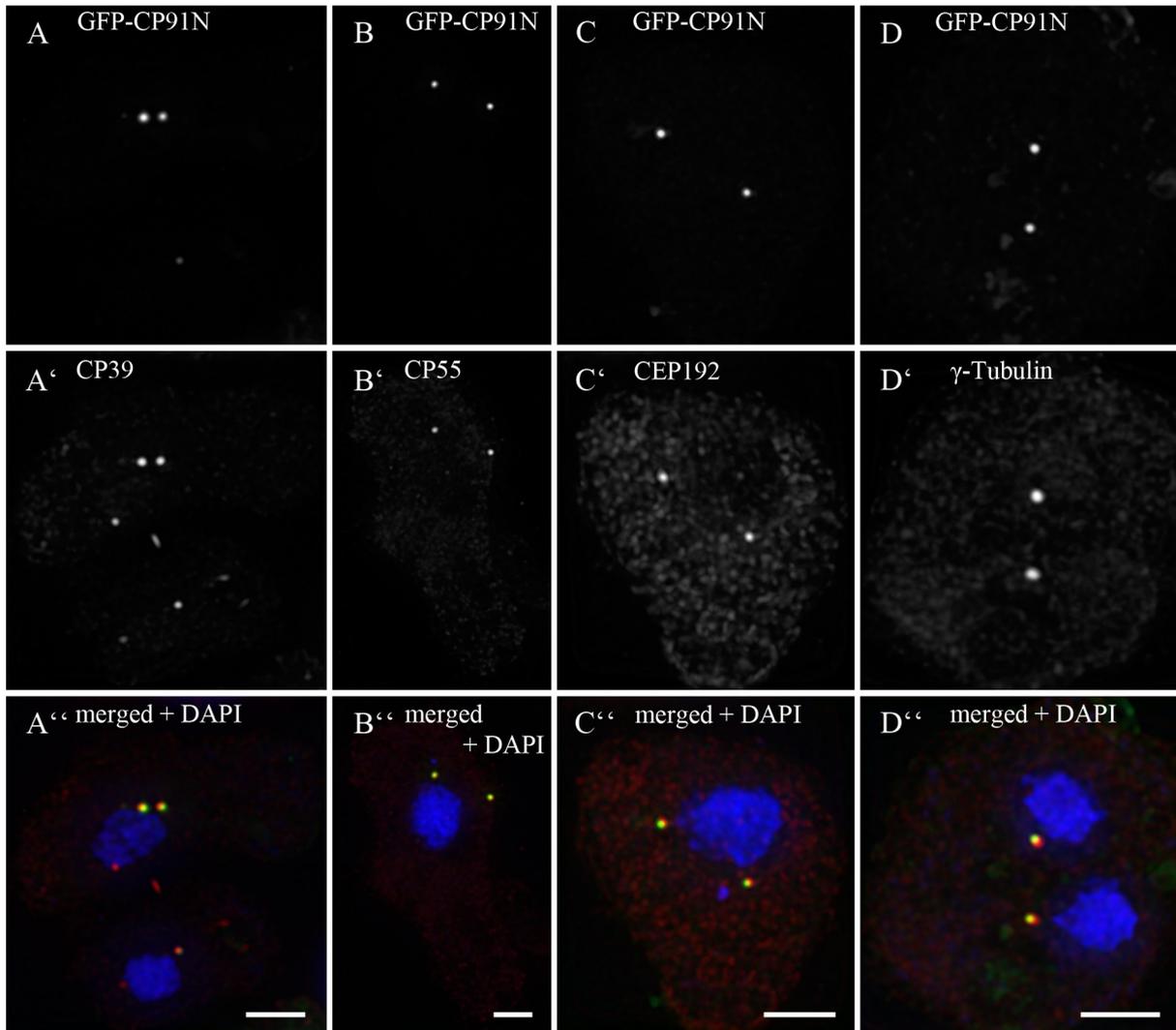


Abbildung 26: Verteilung centrosomaler Markerproteine in GFP-CP91 N-Terminus Zellen, für die centrosomale Core-Region (CP39, CP55), der äußeren Schicht der Core-Region (CEP192) und Corona ( $\gamma$ -Tubulin). GFP-CP91 N-Terminus ist in den Abbildungen mit GFP-CP91N abgekürzt und kolokalisiert mit den Core-Proteinen und Coronamarker. Zellen wurden mit Methanol fixiert. GFP-CP91N überexprimierende Zellen wurden mit anti-CP39 (A), anti-CP55 (B), anti-CEP192 (C), anti- $\gamma$ -Tubulin (D) gefärbt. Die überlagerten Bilder zeigen die Antikörper-Färbungen in Rot, GFP-CP91N in Grün und DAPI (DNA) in Blau. Die Balken betragen jeweils 3  $\mu$ m.

## Ergebnisse

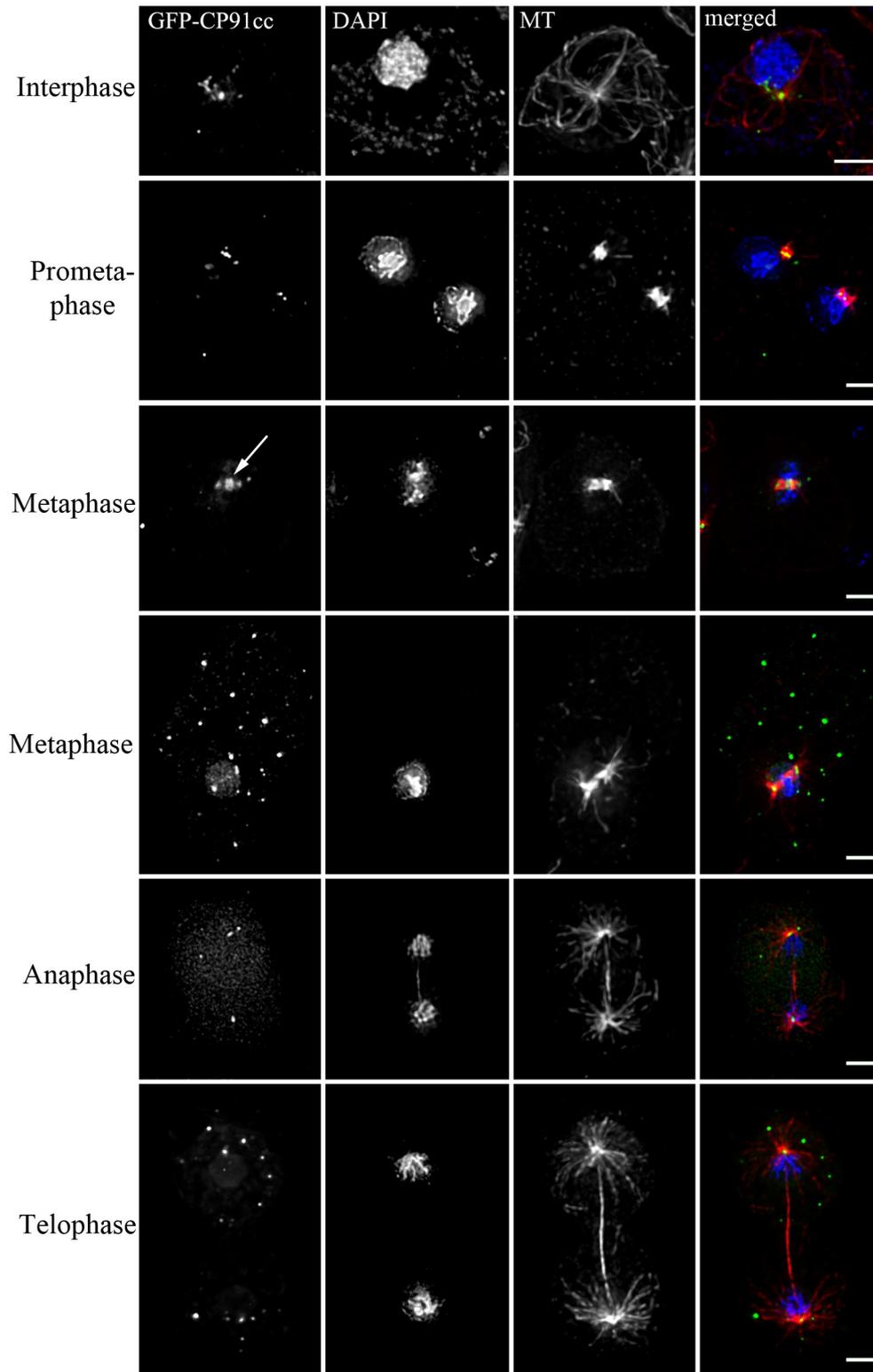


Abbildung 27: Lokalisation des GFP-CP91cc Fusionsproteins während des Zellzyklus. Ein Teil des GFP-CP91cc verbleibt während der gesamten Mitose an den Spindelpolen und in der Metaphase an der späteren Midbody Region. Die Zellen wurden mit Glutaraldehyd fixiert und mit anti-Tubulin (MT) in Rot und die DNA mit DAPI (blau) gefärbt. Das GFP-Signal wurde zudem mit einem GFP-Booster Atto488 verstärkt. Die GFP-Fluoreszenz ist in Grün dargestellt. Balken = 2  $\mu\text{m}$

### 2.1.14 GFP-CP91cc verursacht cytosolische Cluster

Das GFP-CP91cc Konstrukt zeigt eine veränderte Lokalisation am Centrosom. Es unterscheidet sich vom GFP-CP91-N-Terminus durch punktförmige Signale an den Spindelpolen und verstärkten cytosolischen GFP-Signalen während der gesamten Mitose (Abbildung 27 und Abbildung 28), welche nicht mit Mikrotubuli assoziiert sind. In der Metaphase sieht es so aus, als lokalisiert das GFP-CP91cc Konstrukt in der späteren Midbody Region (Pfeil). In Interphasezellen zeigten sich viele kleine GFP-Signale überwiegend in der Nähe des Centrosoms (Abbildung 27, Interphase). Eine Gegenfärbung mit anderen Proteinen der Core-Region und Corona zeigt keine Kollokalisierung mit diesen cytosolischen GFP-Signalen.

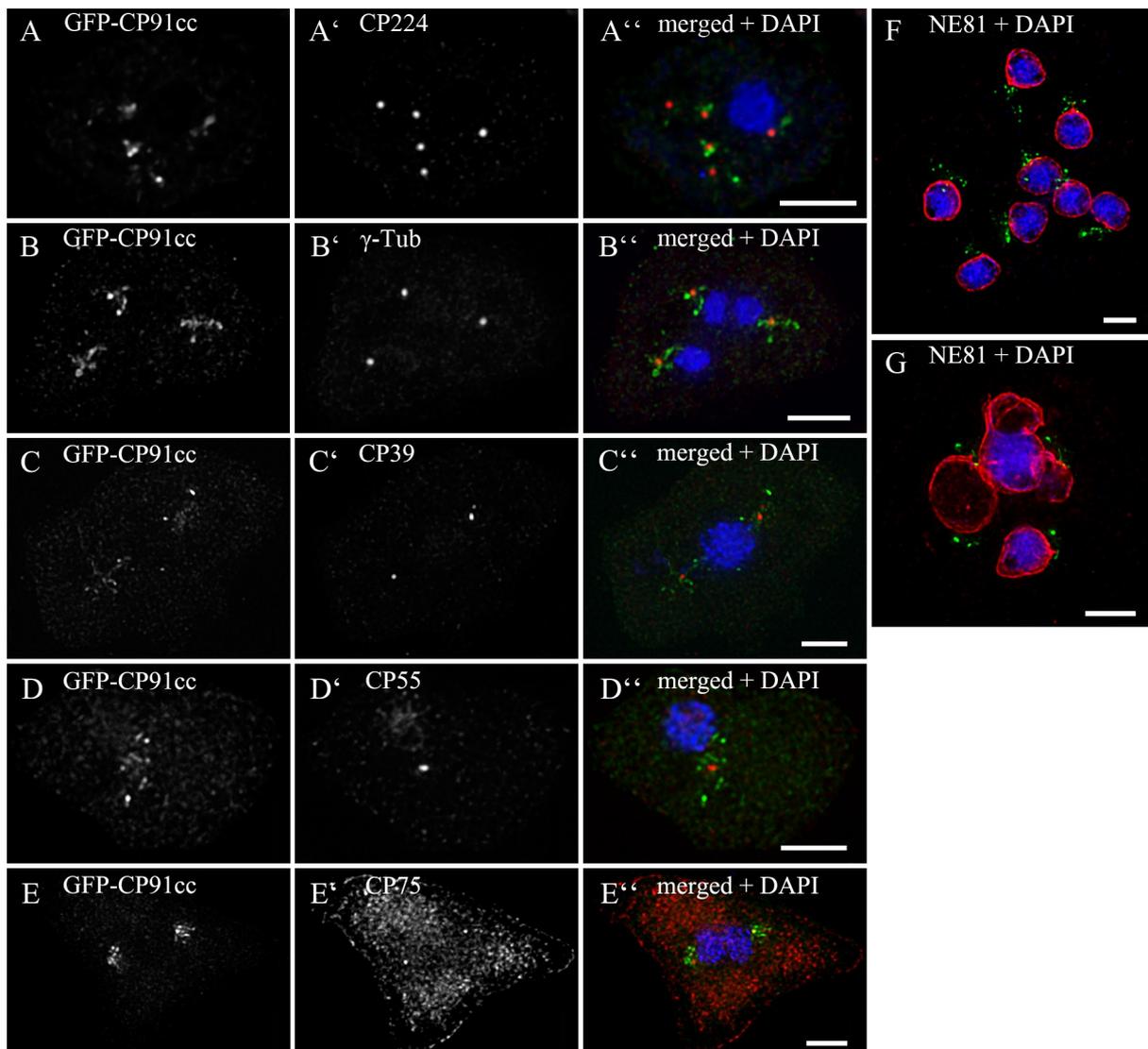


Abbildung 28: GFP-CP91cc verursacht cytosolische Cluster. Die cytosolischen GFP-Signale verbleiben in Interphasezellen (A, B, G) und mitotischen Zellen (C, D, E, F jeweils frühe Prophase erkennbar an dem kondensierten Chromatin und dem Vorhandensein der Core-Proteine) in der Nähe des Centrosoms. Die Coronamarker CP224 (A) und  $\gamma$ -Tubulin (B) und die Core-Proteine CP39 (C), CP55 (D) und CP75 (E) zeigen keine bzw. eine unvollständige Kollokalisierung mit diesen cytosolischen GFP-CP91cc Signalen. G zeigt Ausstülpungen in der Kernmembran markiert durch Laminmarker NE81 (F und G). Zellen A-E sind mit Methanol, F und G mit Glutaraldehyd fixiert. Antikörperfärbung sind rot und die DNA mit DAPI (blau) gefärbt. Die GFP-Fluoreszenz ist in Grün dargestellt. Balken = 5  $\mu$ m

## Ergebnisse

Abbildung 28 (C, D und E) zeigt jeweils frühe Prophasen, erkennbar an dem kondensierten Chromatin und dem Vorhandensein der Core-Proteine CP39 (C), CP55 (D) und CP75 (E). Das GFP-CP91cc Konstrukt zeigt hier keine Kolokalisation mit anderen Core-Proteinen. Die cytosolischen GFP-Foci repräsentieren daher sicher keine kompletten Centrosomen. In der Interphase zeigen die Coronamarker CP224 (A) und  $\gamma$ -Tubulin (B) ebenfalls keine Kolokalisation mit dem GFP-CP91cc Signal. Bei einigen Zellen konnten zudem starke Ausstülpungen der Kernhülle beobachtet werden (Abbildung 28 G). In lebenden GFP-CP91cc Zellen mit *cherry*-Histon-2B verringerte sich das GFP-Signal während der Mitose deutlich. Die Zeitreihe (Abbildung 29, Video-Mitose4 auf CD im Anhang) zeigt eine verminderte zellzyklusabhängige Expression des GFP-CP91cc. Die Stärke des GFP-Signals nimmt im Verlauf der Prophase ab und hat zu Beginn der Metaphase (14.0 min) den geringsten Wert, verschwindet aber zu keiner Zeit ganz. Im Verlauf der Telophase nimmt das GFP-CP91cc Signal wieder an Stärke zu.

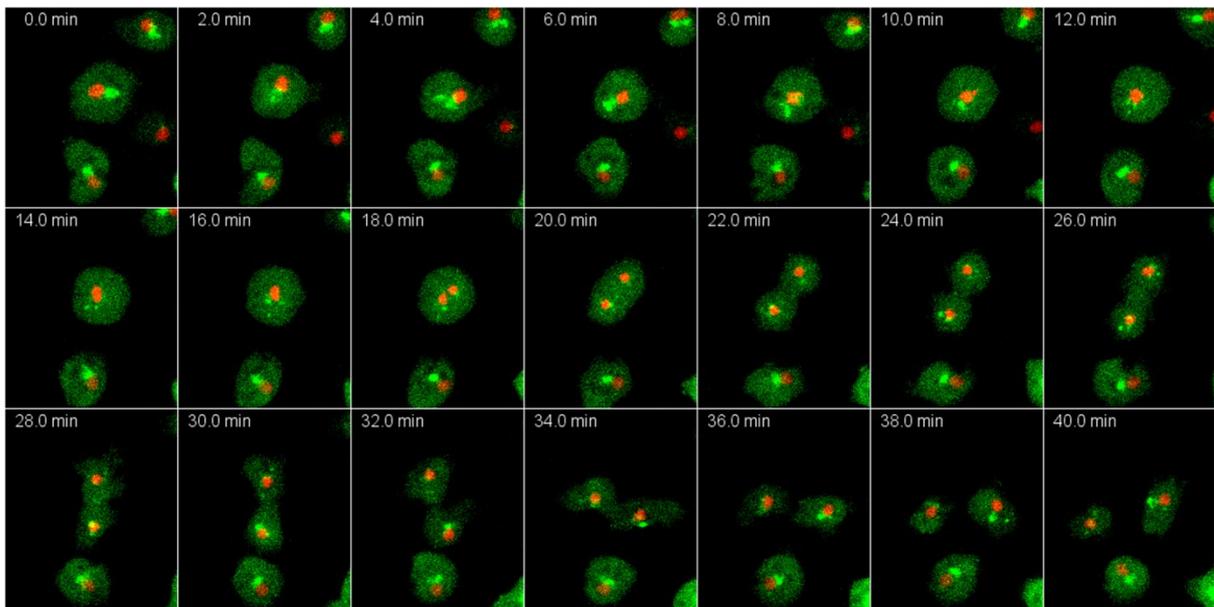


Abbildung 29: Mitose einer GFP-CP91cc exprimierenden Zelle nach Transformation mit einem *cherry*-Histon-2B Konstrukt, welches die DNA rot färbt. Die Zeitreihe zeigt eine verminderte zellzyklusabhängige Expression des GFP-CP91cc. Die Stärke des GFP-Signals nimmt im Verlauf der Prophase ab und hat zu Beginn der Metaphase (14.0 min) den geringsten Wert. Im Verlauf der Telophase nimmt das GFP-CP91cc Signal wieder an Stärke zu. Die Aufnahmen erfolgten mit einem Weitfeldmikroskop. Die Fluoreszenzüberlagerung zeigt das GFP-CP91cc in Grün und des *cherry*-Histon-2B (DNA) in Rot. Für jeden Zeitpunkt wurde ein z-Stapel mit je sechs Bildern in einem Intervall von 0,5  $\mu$ m aufgenommen. Dargestellt sind die "Maximum-Intensity"-Projektionen.

### 2.1.15 GFP-CP91 C-Terminus zeigt eine diffuse cytosolische Lokalisation

Das GFP-CP91 C-Terminus Protein ist nur 139 AS lang (GFP nicht einbezogen) und zeigte, neben einer schwachen centrosomalen, auch eine diffuse cytosolische Lokalisation des GFP Signals (Abbildung 30 A und B). Die schwachen punktförmigen Signale des GFP-CP91 C-Terminus an den Centrosomen kolokalisieren mit den Coronamarkern CP148 und CP224 (Abbildung 30 E und D). Im Verlauf des Zellzyklus verbleibt das centrosomal-lokalisierende Signal an den Spindelpolen (Abbildung 31), schwächt sich jedoch im Verlauf der Prophase leicht ab. Das cytosolische GFP-Signal schwächt sich zu Beginn der Prophase ebenfalls leicht ab. In Interphasezellen konnte auch eine leichte Anreicherung der Fluoreszenz im Zellkern bzw. den Nucleoli beobachtet werden (Pfeile in Abbildung 30 B, C und Interphase Abbildung 31). Die Nucleoli verschwinden in der Mitose und sind nur in der Interphase zu beobachten.

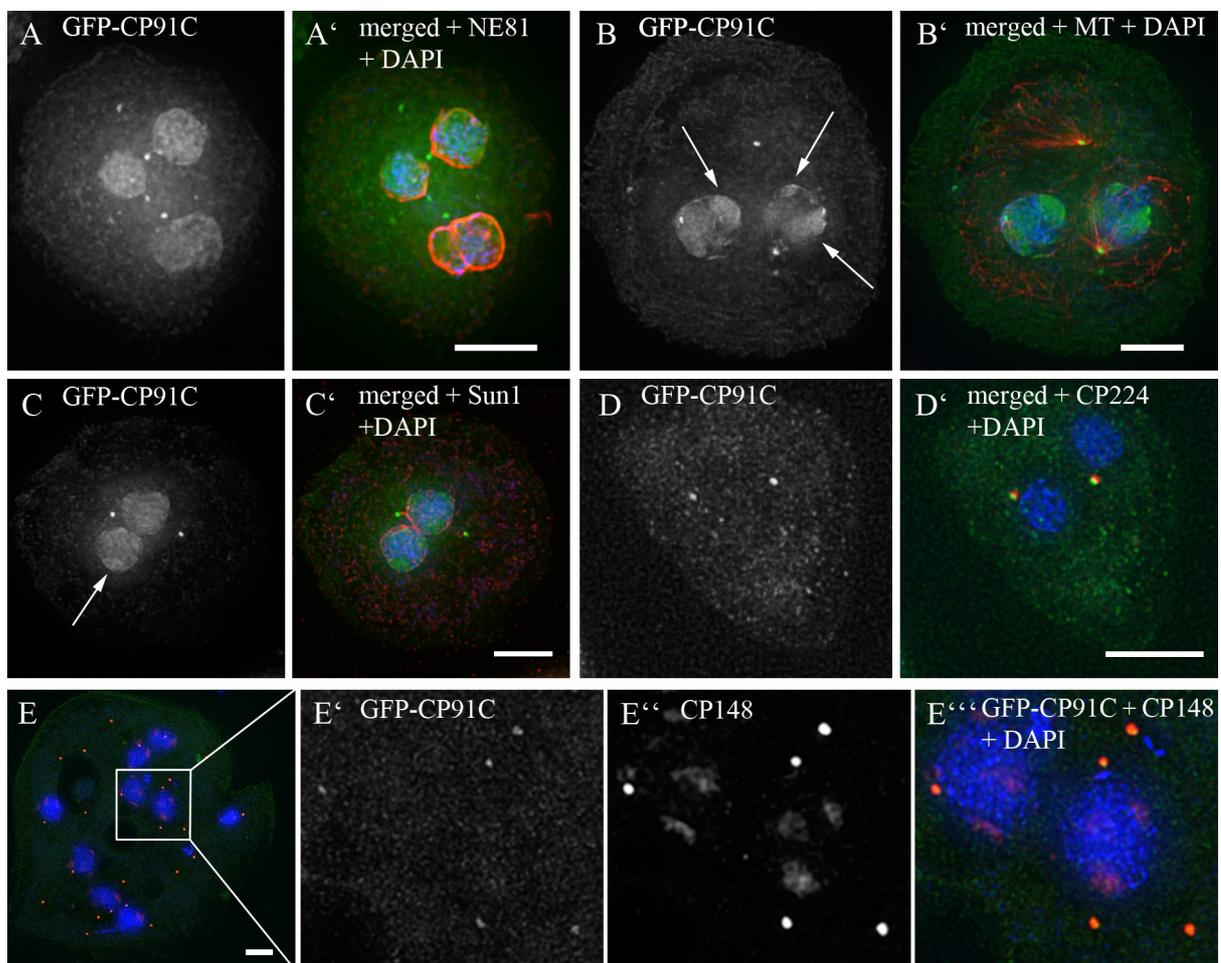


Abbildung 30: Diffuse Lokalisation des GFP-CP91 C-Terminus Fusionsproteins. Es zeigte sich eine diffuse cytosolische Lokalisation und eine schwache Lokalisation an den Centrosomen. Es konnten freie überzählige Centrosomen beobachtet werden. GFP-CP91 C-Terminus ist in den Abbildungen mit GFP-CP91C abgekürzt und kolokalisiert mit den Coronamarkern CP224 (D) und CP148 (E). E' bis E'' sind ein vergrößerter Ausschnitt aus E. Die Zellen wurden mit Glutaraldehyd fixiert und mit anti-NE81(A), anti-Tubulin (B), anti-Sun1 (C) in Rot bzw. mit Methanol fixiert und mit anti-CP224 (D), anti-CP148 (E) in Rot und die DNA mit DAPI (blau) gefärbt. Die GFP-Fluoreszenz ist in Grün dargestellt. Die Methanol-fixierten Zellen (D und E) zeigten ein stark abgeschwächtes GFP-Signal und keine diffusen GFP-Signale im Zellkern. Dies ist wahrscheinlich eine Folge der Methanolfixierung, da auch die nicht fixierten lebenden Zellen oft starke diffuse GFP-Signale im Zellkern zeigten. Nucleoli sind mit Pfeilen gekennzeichnet. Balken = 5 µm

## Ergebnisse

Die gesamte Zellpopulation war zudem sehr heterogen. Die Abbildungen zeigen jeweils Zellen mit deutlicher Expression des Fusionsproteins. Im überwiegenden Teil der Zellpopulation verteilte sich die GFP-Fluoreszenz stark im Cytosol und war nur mit einer längeren Belichtungsdauer zu detektieren. In der Phänotypauswertung konnte daher die Anzahl der Centrosomen nicht genau bestimmt werden. Es konnten aber oft freie überzählige Centrosomen beobachtet werden.

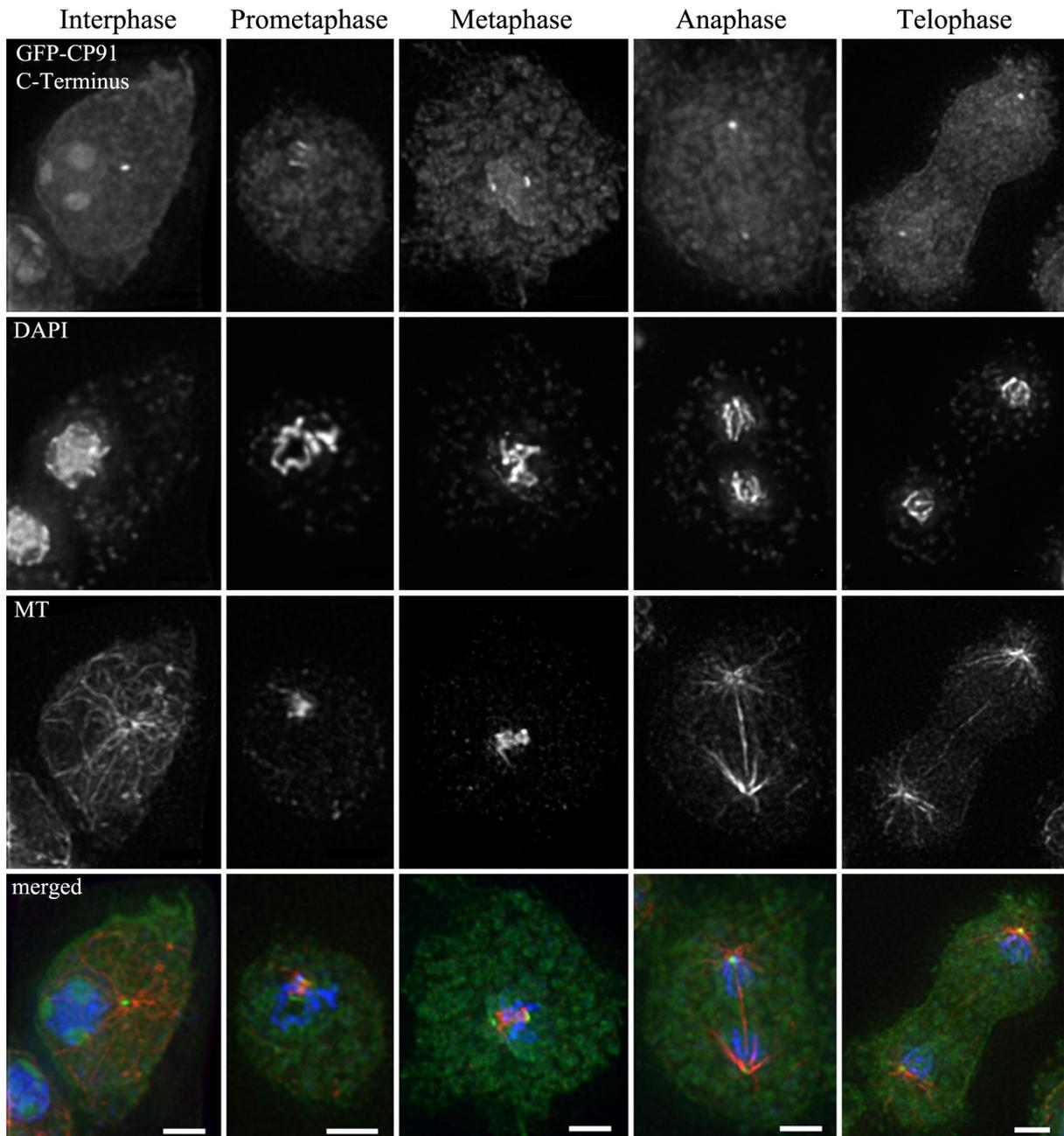


Abbildung 31: Lokalisation des GFP-CP91 C-Terminus Fusionsproteins während des Zellzyklus. GFP-CP91 C-Terminus verbleibt während der gesamten Mitose am Centrosom. Nucleoli sind mit Pfeilen gekennzeichnet. Weiter Beschreibung siehe Textabschnitt 2.1.15. Die Zellen wurden mit Glutaraldehyd fixiert und mit anti-Tubulin (MT) in Rot und die DNA mit DAPI (blau) gefärbt. Das GFP-Signal wurde zudem mit einem GFP-Booster Atto488 verstärkt. Die GFP-Fluoreszenz ist in Grün dargestellt. Balken = 2  $\mu\text{m}$

### 2.1.16 Die Überexpression der CP91 Deletionsfragmente zeigen einen ähnlichen Phänotyp wie das CP91 Vollängenprotein

Wie in Abschnitt 2.1.7 beschrieben wurden für alle Phänotypauswertungen nur intakte MTOCs mit centrosomaler Färbung ausgezählt. Um eindeutige Aussagen in der Auswertung zu treffen und Missverständnisse in der Diskussion zu vermeiden sind in allen folgenden Phänotypauswertungen die ausgezählten Centrosomen ebenfalls mit MTOCs gleichzusetzen. Die untersuchten GFP-CP91 Deletionsfragmente zeigten, ähnlich dem CP91 Vollängenkonstrukt, starke Phänotypveränderungen der transformierten *Dictyostelium* Zellen. Überzählige Centrosomen (Abbildung 32 A bzw. 33 A) und erhöhte Kernanzahl (Abbildung 33 B) wurden begleitet von deutlich erhöhten Zellflächen und einer Verdopplung der Kernfläche (Abbildung 33 C/D). Auch die Anzahl von kernassoziierten Centrosomen bei allen

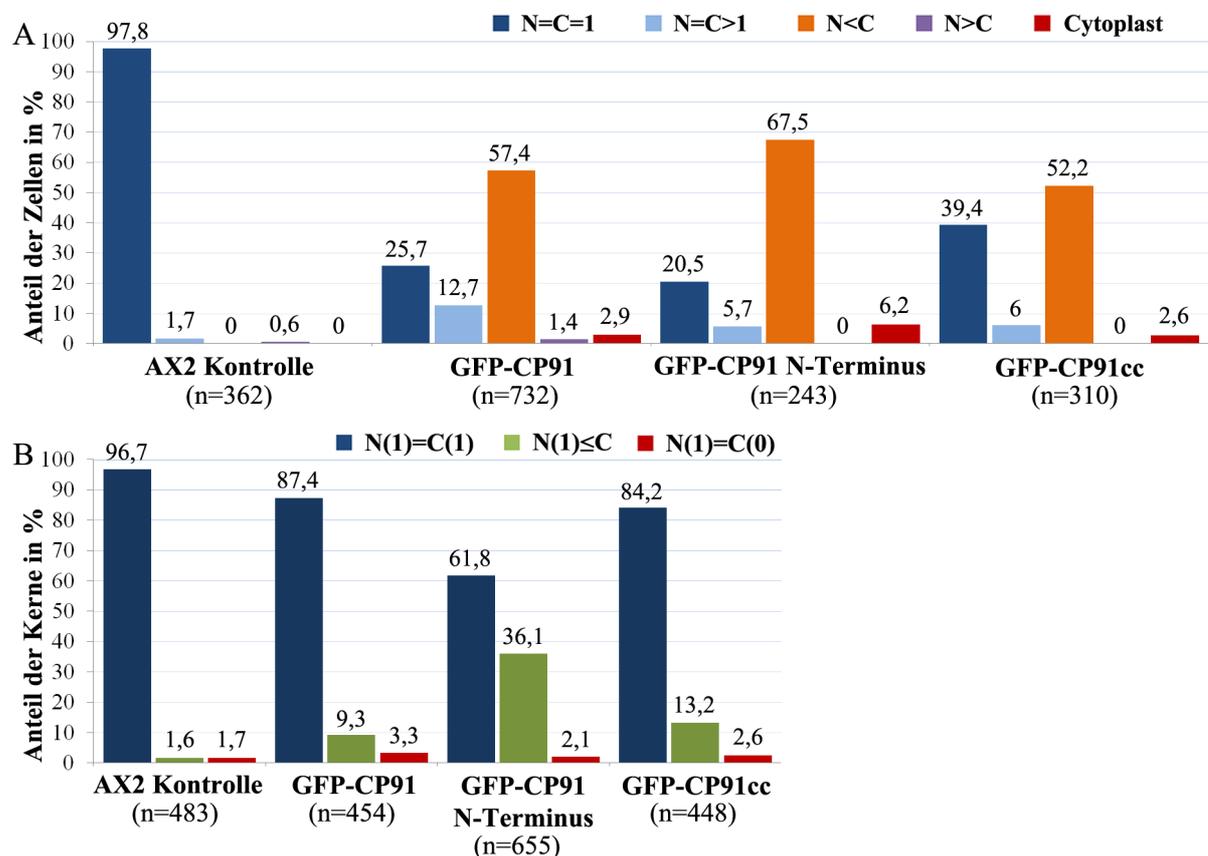


Abbildung 32: Die N-terminalen GFP-Konstrukte verursachen überzählige freie und überzählige kernassoziierte Centrosomen. Zusammenfassung der Phänotypauswertung der Deletionsfragmente im Vergleich zur AX2 Kontrolle und GFP-CP91. (A) Dargestellt ist das prozentuale Verhältnis der Kerne und Centrosomen einzelner Zellen in adhären wachsender Kultur (n=Anzahl der ausgewerteten Zellen). GFP-CP91 N-Terminus (n=243), GFP-CP91cc (n=310) im Vergleich mit einer AX2 Kontrolle (n=362) und GFP-CP91 (n=732). Auf der Y-Achse ist der prozentuale Anteil der Zellen an der ausgewerteten Gesamtzellzahl dargestellt. Die X-Achse gibt das Centrosomen/ Kern-Verhältnis an wobei N für Nukleus / Kern und C für Centrosom steht. (B) Dargestellt ist das prozentuale Verhältnis der Zellkerne mit kernassoziierten Centrosomen in adhären wachsender Zellkultur (n=Anzahl der ausgewerteten Zellkerne). GFP-CP91 N-Terminus (n=655), GFP-CP91cc (n=448) im Vergleich mit einer AX2 Kontrolle (n=483) und GFP-CP91 (n=454). Auf der Y-Achse ist der prozentuale Anteil der Kerne an der ausgewerteten Gesamtkernzahl dargestellt. Die X-Achse gibt den Anteil von Kernen mit kernassoziierten Centrosomen an wobei N für Nukleus / Kern und C für Centrosom steht. N(1)≤C sind Kerne mit 2 oder mehr assoziierten Centrosomen. N(1)=C(0) sind Kerne ohne assoziierte Centrosomen, wobei das Ausschlusskriterium ein Kern-Centrosomen-abstand von 2µm war.

Konstrukten ist im Vergleich zur Kontrolle erhöht (Abbildung 32 B). Das erklärt auch die Probleme bei der Chromosomensegregation. Cytosolische überzählige Centrosomen stören hier nicht, da sie wegen der geschlossenen Mitose nicht mit den DNA Massen interferieren können. Wenn sie kernassoziiert sind, können sie sich dagegen beim Spindelaufbau beteiligen und multipolare Spindeln bilden, die dann zu Tochterkernen mit verändertem Karyotyp führen (Leo *et al.* 2012). Das GFP-CP91-N-Terminus Konstrukt zeigte des Weiteren zwei Besonderheiten. Es hatte den höchsten Prozentsatz der Zellen mit überzähligen Centrosomen (67,5%; Abbildung 32 A) und an Kernen mit zwei oder mehr kernassoziierten Centrosomen (36,1%; Abbildung 32 B). Es übertraf damit sogar das GFP-CP91 Vollängenkonstrukt, obwohl es bei allen anderen ausgewerteten Parametern jenes nicht in den Schatten stellte. Das kleinere GFP-CP91cc Protein zeigte ebenfalls einen ähnlich starken Phänotyp mit 52,2% der Zellen mit überzähligen Centrosomen (Abbildung 32 A) und 13,2% der Kerne mit zwei oder mehr kernassoziierten Centrosomen (Abbildung 32 B). Bei der GFP-CP91 C-Terminus Mutante konnte aufgrund der hohen Heterogenität der GFP-Expression und zu schwacher GFP-Signale die Anzahl der Centrosomen nicht genau bestimmt werden. Es konnte daher kein genauer Vergleich mit den anderen Proteinfragmenten erfolgen. Die ähnlich hohen Werte der Kernanzahl pro Zelle ( $\bar{\sigma}=1,76$ ; Abbildung 33 B) bzw. Zell- und Kernfläche ( $156,29 \mu\text{m}^2$  bzw.  $10,5 \mu\text{m}^2$ ; Abbildung 33 C/D) aber zeigten, dass auch der 139 AS lange GFP-CP91 C-Terminus starke Phänotypveränderungen erzeugte. Einen großen Unterschied zum Vollängenprotein zeigten die Deletionsfragmente hauptsächlich in der Lokalisation während der Mitose. Alle getesteten Fragmente vermitteln auch während der Mitose eine Centrosomenbindung und diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass CP91 wahrscheinlich mehrere Bindungspartner am Centrosom aufweist.

## Ergebnisse

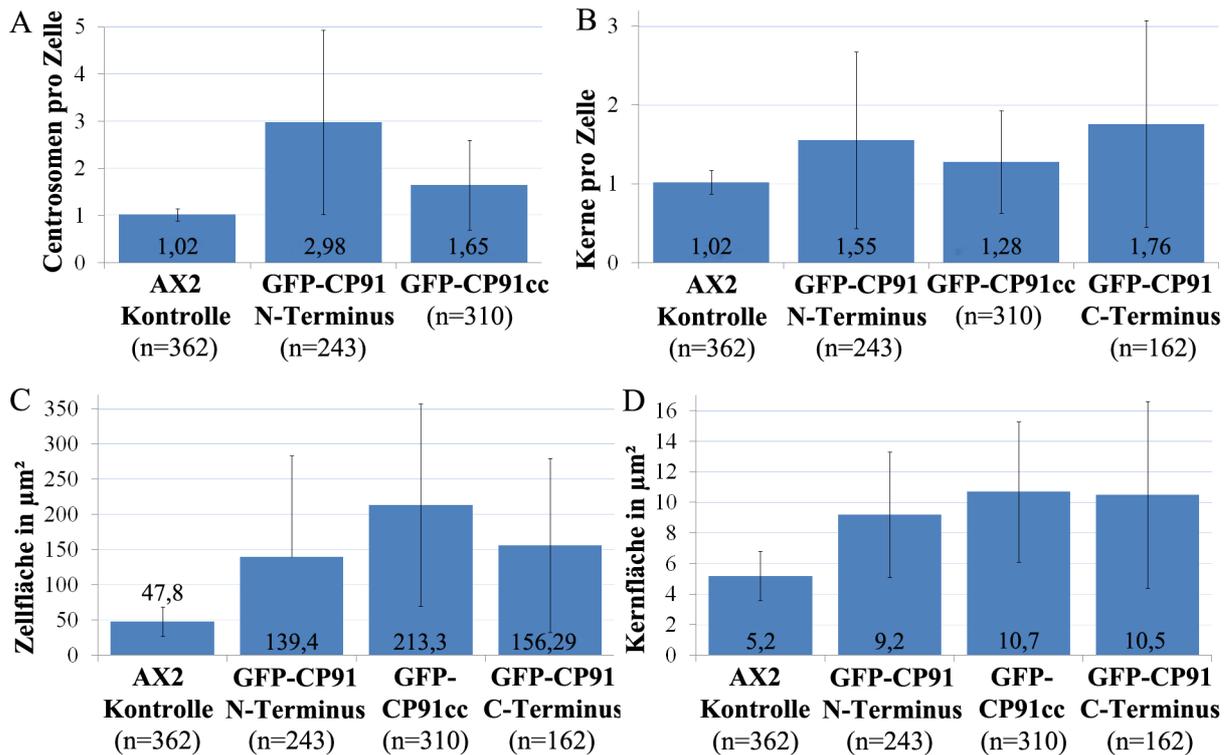


Abbildung 33: Vergleichende Phänotypauswertung des GFP-CP91 N-Terminus / GFP-CP91cc / GFP-CP91 C-Terminus. Dargestellt ist die durchschnittliche Anzahl der Centrosomen (A) und Kerne (B) einzelner Zellen in adhären wachsender Kultur GFP-CP91 N-Terminus (n=243); GFP-CP91cc (n=310) und GFP-CP91 C-Terminus (n=162) im Vergleich mit einer adhären wachsenden AX2 Kontrolle (n=362). Die Centrosomenanzahl konnte für GFP-CP91 C-Terminus nicht genau bestimmt werden. Auswertung der Zellfläche (C) und Kernfläche (D) der GFP-CP91-N-Terminus / GFP-CP91cc / GFP-CP91 C-Terminus Überexpression. Dargestellt in 30 C ist die durchschnittliche Zellfläche ( $\mu\text{m}^2$ ) in adhären wachsender Kultur GFP-CP91 N-Terminus (n=243); GFP-CP91cc (n=310) und GFP-CP91 C-Terminus (n=162) im Vergleich mit einer adhären wachsenden AX2 Kontrolle (n=362). Die mittlere Zellfläche der adhären wachsenden Mutanten ist im Vergleich mit der AX2-Kontrolle verdreifacht bzw. vervierfacht. (D) Dargestellt ist die durchschnittliche Kernfläche ( $\mu\text{m}^2$ ) in adhären wachsender Kultur GFP-CP91 N-Terminus (n=243); GFP-CP91cc (n=310) und GFP-CP91 C-Terminus (n=162) im Vergleich mit Kernen einer adhären wachsenden AX2 Kontrolle (n=362). Die Fragmente zeigen im Durchschnitt eine Verdopplung der Kernfläche im Vergleich zur Kontrolle. Mittelwerte  $\pm$  S.D. sind angegeben.

### 2.1.17 Herstellung einer CP91-RNAi Mutante

Die Abwesenheit eines Proteins in einer Zelle kann, wie die Überexpression, wertvolle Hinweise auf die Funktion des Proteins in der Zelle geben. Bei dem Versuch eine CP91-Knockout Mutante herzustellen konnten keine Mutanten selektiert werden. Eine Ursache dafür könnte eine essentielle Funktion des CP91 sein, was bis auf CP55 (Kuhnert *et al.* 2012) bisher für alle untersuchten integralen centrosomalen Proteine gilt. In einem haploiden Organismus wie *Dictyostelium* wirkt ein Knockout solcher Proteine daher meist letal und macht die Selektion eines lebensfähigen Knockout-Stammes unmöglich. Daher wurde ein CP91-RNAi Konstrukt hergestellt und in GFP- $\alpha$ -Tubulin exprimierende *Dictyostelium* Zellen transformiert. Die Expression von GFP- $\alpha$ -Tubulin in *Dictyostelium* Wildtypzellen hat keinen Einfluss auf die Mitose bzw. den Phänotyp (Kimble *et al.*, 2000; Neujahr *et al.*, 1998), erleichtert aber

Lebendzellanalysen. Es konnten im Verlauf mehrerer Transformationen ca. 40 Klone selektiert werden. Diese wurden adhärent angezogen. 35 Klone zeigten ein ähnliches Wachstumsverhalten wie AX2 Zellen. Diese zeigten entsprechend auch keinen relevanten Phänotyp und nach immunfluoreszenzmikroskopischer Untersuchung mit dem polyklonalen anti-CP91 Serum keine Verringerung des endogenen CP91 Signals. Der Promotor für das RNAi-Konstrukt ist auf Bakterien inaktiv und wird erst bei Kultur in Flüssigmedium induziert. Daher ist anzunehmen, dass das RNAi-Konstrukt in den 35 Klonen nicht stabil war. Mit zunehmender Kultivierungsdauer zeigten die verbliebenen 5 Klone im Vergleich mit AX2 einen stark veränderten Phänotyp. Die sehr langsam wachsenden Mutanten fielen durch extrem große Zellen auf, die teilweise für das bloße Auge sichtbar waren. Zudem wuchsen die Zellen nur beschränkt adhärent, besonders die großen Zellen der Kultur. Bei normaler Handhabung der Zellkulturflasche (nicht schütteln) konnte ein Großteil der Zellen vom Boden gelöst werden, was bei AX2-Zellen nicht der Fall war. Für fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen und die Fixierung mit Methanol bzw. Glutaraldehyd wurde versucht die Zellen vorher, wie üblich durch Schwerkraft, auf ein Deckglas absetzen zu lassen (2-3h). Anscheinend war das jedoch für die Mutanten nicht ausreichend, um sich an den Untergrund heften zu können, sodass nach der Fixierung nur vereinzelte kleine, bis mittelgroße Zellen auf den Objektträgern beobachtet werden konnten. Deshalb wurden für weitere Untersuchungen die CP91-RNAi Mutanten auf 24-Well Zell-kulturplatten, in denen sich jeweils ein steriles Deckgläschen befand, verteilt und adhärent herangezogen. Nach einigen Tagen konnten die bewachsenen Deckgläschen direkt für die Fixierung verwendet werden. CP91-RNAi Zellen verloren in Schüttelkultur ihren Phänotyp bzw. revertierten zum Wildtyp oder stellten das Wachstum vollständig ein. Für die Untersuchungen wurden somit nur die adhärent wachsenden Mutanten verwendet. Für die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der Expressionsstärke von CP91 im CP91-RNAi und zur Gewährleistung gleicher Färbbedingungen wurden die transformierten CP91-RNAi Zellen im gleichen Verhältnis mit AX2 Zellen gemischt, mit Methanol fixiert und mit anti-CP91 (Abbildung 34 B; rot in B') bzw. die DNA mit DAPI (blau) gefärbt. Die densitometrische Auswertung der Centrosomen erfolgte mit der Software *ImageJ*. Dabei wurde die Intensität des Fluoreszenzsignals der Interphasecentrosomen in einem definierten Bereich gemessen. Die AX2-Wildtypzellen konnten durch das Fehlen des grün fluoreszierenden GFP- $\alpha$ -Tubulin von den RNAi-Zellen unterschieden werden. Die Abbildung 34 A zeigt die normalisierte CP91-Intensität. Die Expression des CP91 war im CP91-RNAi (n=82) auf ca. 22% des normalisierten Wertes der AX2-Kontrolle (n=55) vermindert. Für die biochemische Untersuchung der Expressionsstärke

## Ergebnisse

von CP91 wurden jeweils 20µg Protein aus Kernextrakten von adhärent wachsenden CP91-RNAi und AX2 Zellen mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Mit dem polyklonalen CP91-Antikörper wurde das endogene CP91 nachgewiesen. Für die Ladekontrolle wurde ein Antikörper gegen den Coronamarker CP224 verwendet. Die Detektion der Proteinbanden erfolgte mittels alkalischer Phosphatase. Der Vergleich von CP91-RNAi und dem Wildtyp zeigte eine deutliche Verminderung der endogenen CP91 Expression (Abbildung 34 C). Nach densitometrischer Auswertung der Signalintensität mit *ImageJ* zeigte sich eine Verminderung des CP91 im RNAi um den Faktor sieben.

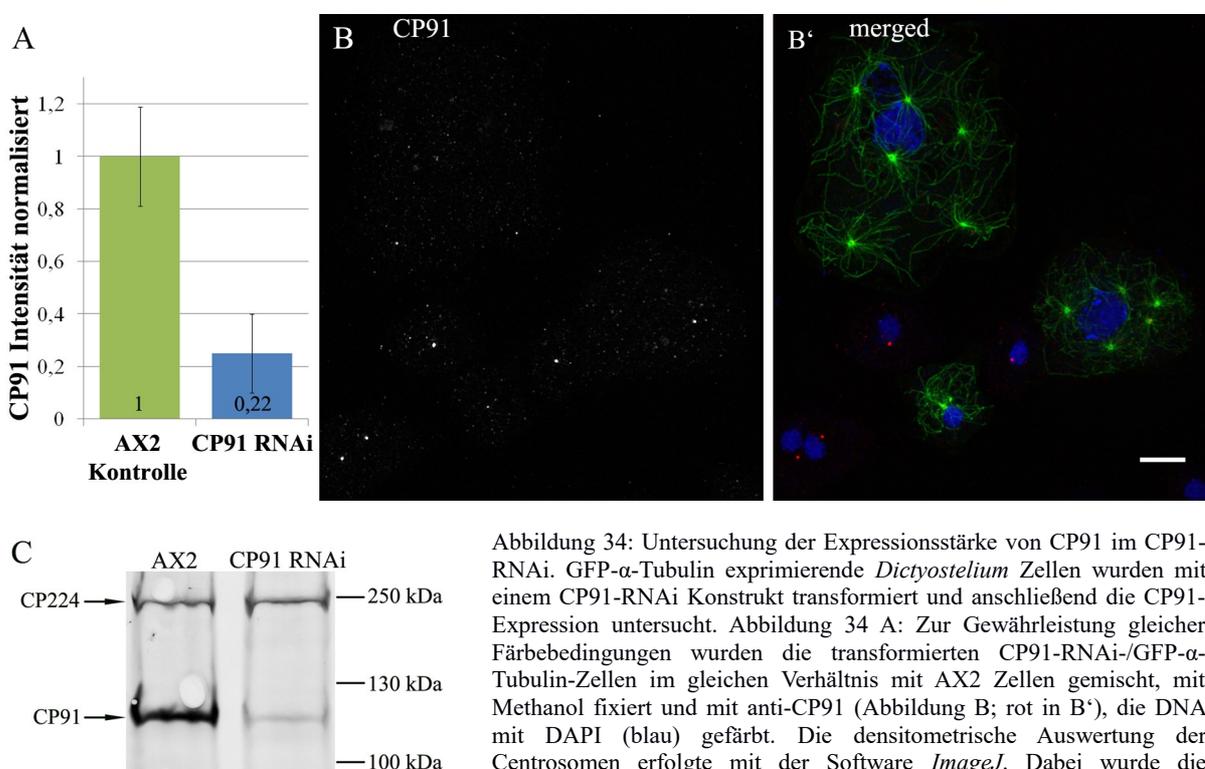


Abbildung 34: Untersuchung der Expressionsstärke von CP91 im CP91-RNAi. GFP- $\alpha$ -Tubulin exprimierende *Dictyostelium* Zellen wurden mit einem CP91-RNAi Konstrukt transformiert und anschließend die CP91-Expression untersucht. Abbildung 34 A: Zur Gewährleistung gleicher Färbebedingungen wurden die transformierten CP91-RNAi/GFP- $\alpha$ -Tubulin-Zellen im gleichen Verhältnis mit AX2 Zellen gemischt, mit Methanol fixiert und mit anti-CP91 (Abbildung B; rot in B'), die DNA mit DAPI (blau) gefärbt. Die densitometrische Auswertung der Centrosomen erfolgte mit der Software *ImageJ*. Dabei wurde die Intensität des Fluoreszenzsignals der Centrosomen in einem definierten

Bereich gemessen. Die AX2-Wildtypzellen konnten durch das Fehlen des grün fluoreszierenden GFP- $\alpha$ -Tubulin von den RNAi-Zellen unterschieden werden. Abbildung 34 A zeigt die normalisierte CP91-Intensität. Die Expression des CP91 war im CP91-RNAi (n=82) ca. 22% im Vergleich zur AX2-Kontrolle (n=55). Mittelwerte  $\pm$  S.D. sind angegeben. Balken = 5 µm. Abbildung 34 C: Western Blot Analyse; jeweils 20µg Protein aus CP91RNAi- und AX2-Kernextrakten wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Die Nitrocellulosemembran wurde zur Ladekontrolle mit einem anti-CP224 Antikörper (Coronamarker) angefärbt, um zu zeigen, dass gleiche Proteinmengen aufgetragen wurden. Das endogene CP91 wurde mit einem polyklonalen CP91 Antikörper nachgewiesen. Die Detektion der Proteinbanden erfolgte mittels alkalischer Phosphatase. Das Molekulargewicht des Standards ist jeweils angegeben. Der Vergleich der CP91-Signalintensität im Wildtyp und CP91 RNAi Stamm zeigt eine deutliche Verminderung des endogenen CP91 im RNAi um den Faktor 7 (auf ~15% des Wildtyps). Die densitometrische Auswertung erfolgte mit der Software *ImageJ*.

### **2.1.18 Die CP91-RNAi Zellen zeigen eine verminderte Expression der centrosomalen Core-Proteine CP55 und CP39**

Bei der Untersuchung der CP91 Überexpression zeigte sich, dass jedes CP91 Signal auch mit centrosomalen Markern der Core-Region und der Corona kolokalisiert. Es zeigte sich eine Korrelation zwischen der Größe bzw. Stärke der GFP-CP91 Signale und der Stärke der centrosomalen Core-Proteine CP55 und CP39 (Abbildung 14). Im CP91-RNAi wurde die Expressionsstärke von CP55 und CP39 in Interphasecentrosomen ebenfalls fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Parallel zur Untersuchung der Expressionsstärke von CP91 wurden CP91-RNAi Zellen im gleichen Verhältnis mit AX2 Zellen gemischt, mit Methanol fixiert und mit anti-CP55 (Abbildung 35 B; rot in B') bzw. anti-CP39 (Abbildung 35 D; rot in D') und die DNA mit DAPI (blau) gefärbt. Die Messung und Auswertung erfolgte wie bei CP91. Die Abbildung 35 A zeigt, dass die Intensität von CP55 im CP91-RNAi (n=35) ca. 34% des normalisierten Wertes der AX2-Kontrolle (n=21) ist. Abbildung 35 C zeigt für CP39 im CP91-RNAi (n=35) ca. 41% des normalisierten Wertes der AX2-Kontrolle (n=30). Die biochemische Untersuchung der Expressionsstärke von CP55 und CP39 erfolgte wie bei CP91, im Abschnitt 2.1.17 beschrieben. Dabei bestätigte sich die Verminderung der beiden Core-Proteine. Abbildung 35 E zeigt die deutliche Verminderung des endogenen Core-Proteins CP55 um den Faktor 3,8 im CP91-RNAi, mit anti-CP224 als Ladekontrolle. CP55 wurde mit einem polyklonalen CP55-Antikörper nachgewiesen. In Abbildung 35 E' wurden die Core-Proteine CP55, CP39 und CP91, sowie der Coronamarker CP148\* (Ladekontrolle) und CEP192 mit polyklonalen Antikörpern nachgewiesen. Die Ladekontrollen CP224 und CP148 zeigen, dass jeweils gleiche Proteinmengen (jeweils 20µg Kernextrakt) aufgetragen wurden. Der CP91-RNAi zeigt im Vergleich mit dem Wildtyp, neben der Verminderung von CP55, ebenfalls eine Verminderung des Core-Proteins CP39, sowie von CEP192 (siehe nächsten Abschnitt). Im Bereich von CP55 und CP39 wurde der Kontrast in Abbildung 35 E' mit der Autokontrastfunktion von Photoshop verstärkt. Aufgrund der diffusen schwachen Banden erfolgte keine densitometrische Auswertung der CP39 Intensitätsverminderung im Western Blot. Diese Ergebnisse wurden jeweils in drei verschiedenen Western Blot mit drei verschiedenen CP91-RNAi Klonen bestätigt. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass mit einer Veränderung der CP91 Expression ebenfalls eine Reduzierung der Lokalisation der centrosomalen Core-Proteine CP55 und CP39 einhergeht.

## Ergebnisse

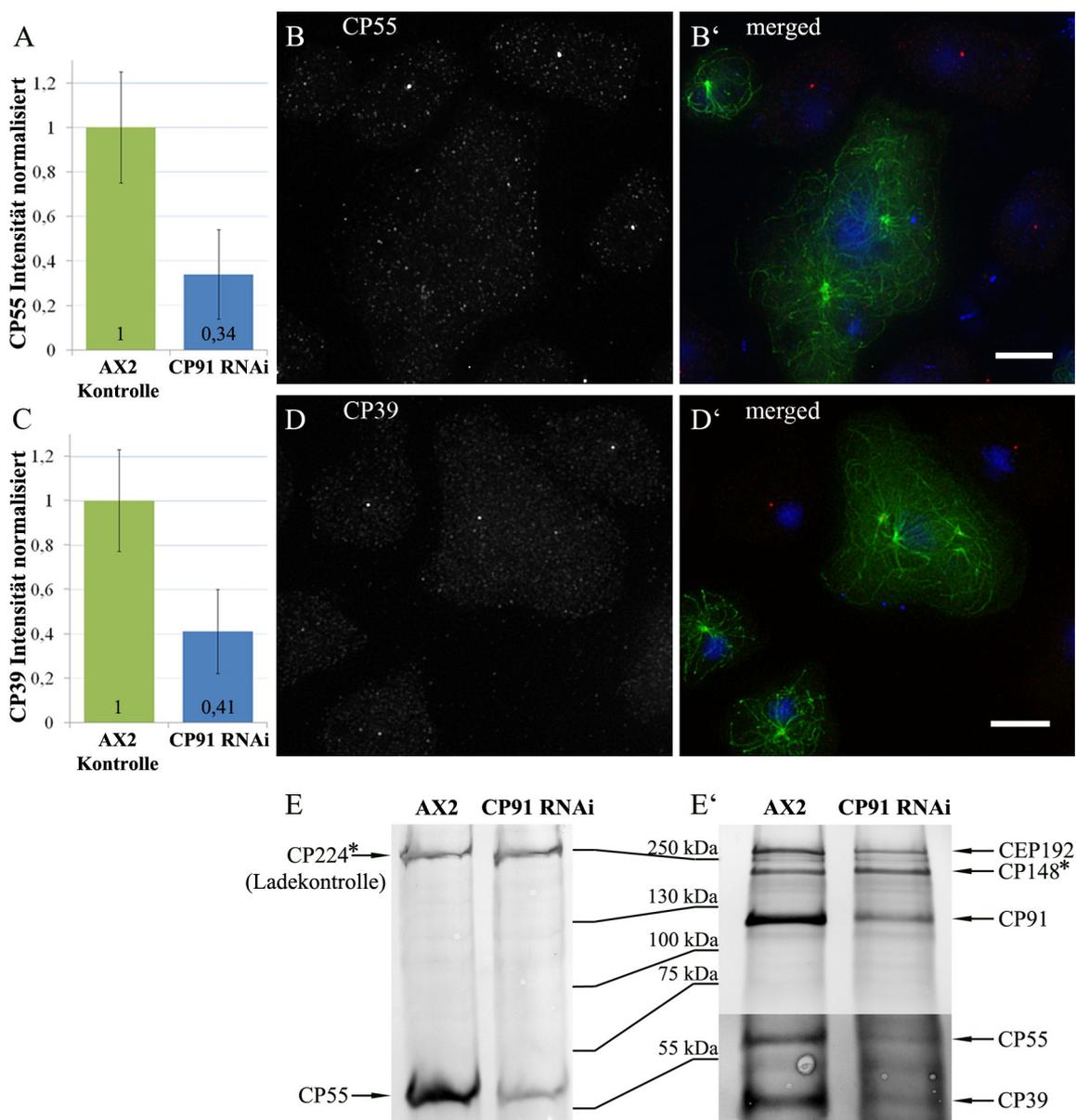


Abbildung 35: CP91-RNAi Zellen zeigen eine verminderte Expression der centrosomalen Core-Proteine CP55 und CP39. GFP- $\alpha$ -Tubulin exprimierende *Dictyostelium* Zellen wurden mit einem CP91-RNAi Konstrukt transformiert und die CP55- bzw. CP39-Expression untersucht. Zur Gewährleistung gleicher Färbebedingungen wurden die transformierten CP91-RNAi-/GFP- $\alpha$ -Tubulin-Zellen im gleichen Verhältnis mit AX2 Zellen gemischt, mit Methanol fixiert und mit anti-CP55 (Abbildung B; rot in B'), anti-CP39 (Abbildung D; rot in D'), bzw. die DNA mit DAPI (blau) gefärbt. Die densitometrische Auswertung der Centrosomen erfolgte mit der Software *ImageJ*. Dabei wurde die Intensität des Fluoreszenzsignals der Centrosomen in einem definierten Bereich gemessen. Die AX2-Wildtypzellen konnten durch das Fehlen des Grün fluoreszierenden GFP- $\alpha$ -Tubulin von den RNAi-Zellen unterschieden werden. Abbildung 35 A zeigt die normalisierte CP55-Intensität. Die Expression des CP55 war im CP91-RNAi (B, B', n=35) 34% im Vergleich zur AX2-Kontrolle (n=21). Abbildung 35 C zeigt die normalisierte CP39-Intensität. Die Expression des CP39 war im CP91-RNAi (D, D', n=35) 41% im Vergleich zur AX2-Kontrolle (n=30). Mittelwerte  $\pm$  S.D. sind angegeben. Balken = 5  $\mu$ m. Abbildung 35 E und E': Western Blot Analyse; jeweils 20  $\mu$ g Protein aus CP91-RNAi und AX2-Kernextrakten wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Die Nitrocellulosemembran wurde zur Ladekontrolle(\*) mit Antikörpern gegen die Coronamarker CP224 (E) bzw. CP148 (E') angefärbt, um zu zeigen, dass gleiche Proteinmengen aufgetragen wurden. Die Detektion der Proteinbanden erfolgte mittels alkalischer Phosphatase. Das Molekulargewicht des Standards ist jeweils angegeben. Abbildung 35 E zeigt die deutliche Verminderung des endogenen Core-Proteins CP55 um den Faktor 3,8 im CP91-RNAi. Die densitometrische Auswertung erfolgte mit der Software *ImageJ*. CP55 wurde mit einem polyklonalen CP55-Antikörper nachgewiesen. In Abbildung 35 E' wurden die Core-Proteine CP55, CP39 und CP91, sowie der Coronamarker CP148\*(Ladekontrolle) und CEP192 mit polyklonalen Antikörpern nachgewiesen. Die Ladekontrolle CP148 zeigt das gleiche Proteinmengen (jeweils 20  $\mu$ g Kernextrakt) aufgetragen wurden. Der Vergleich des CP91-RNAi mit dem Wildtyp zeigt neben der Verminderung von CP55, CP91 ebenfalls eine Verminderung des Core-Proteins CP39, sowie CEP192 (siehe nächsten Abschnitt). Im Bereich von CP55 und CP39 wurde der Kontrast mit der Autokontrastfunktion von Photoshop verstärkt. Aufgrund der diffusen schwachen Banden erfolgte keine densitometrische Auswertung der CP39 Intensitätsverminderung im Western Blot.

### 2.1.19 CP91-RNAi Zellen zeigen ein verminderte Expression von CEP192

CEP192 ist ein humanes centrosomales Protein und spielt eine wichtige Rolle in der Centriolenverdopplung (Zhu *et al.*, 2008). Das echte Ortholog in *Dictyostelium*, ebenfalls CEP192 genannt, lokalisiert im Centrosom zwischen Corona (CP224 und  $\gamma$ -Tubulin) und der Zentralstruktur. Es stellt vermutlich einen Hauptbestandteil der äußeren Lagen dieser Zentralstruktur dar (Schulz *et al.*, 2009). Im CP91-RNAi wurde die Expressionsstärke von CEP192, wie bei CP91 im Abschnitt 2.1.17 beschrieben, untersucht. Die Messung und Auswertung erfolgte wie bei CP91, sowie den Core-Proteinen CP55 und CP39. Die Auswertung der Signalintensität von CEP192 in der Immunfluoreszenz des CP91-RNAi zeigte eine Verminderung der CEP192-Signalintensität auf 53% im Vergleich zur AX2-Kontrolle (Abbildung 36 A). Im Western Blot zeigt sich eine Verminderung des endogenen CEP192 um den Faktor 2 (Abbildung 36 C).

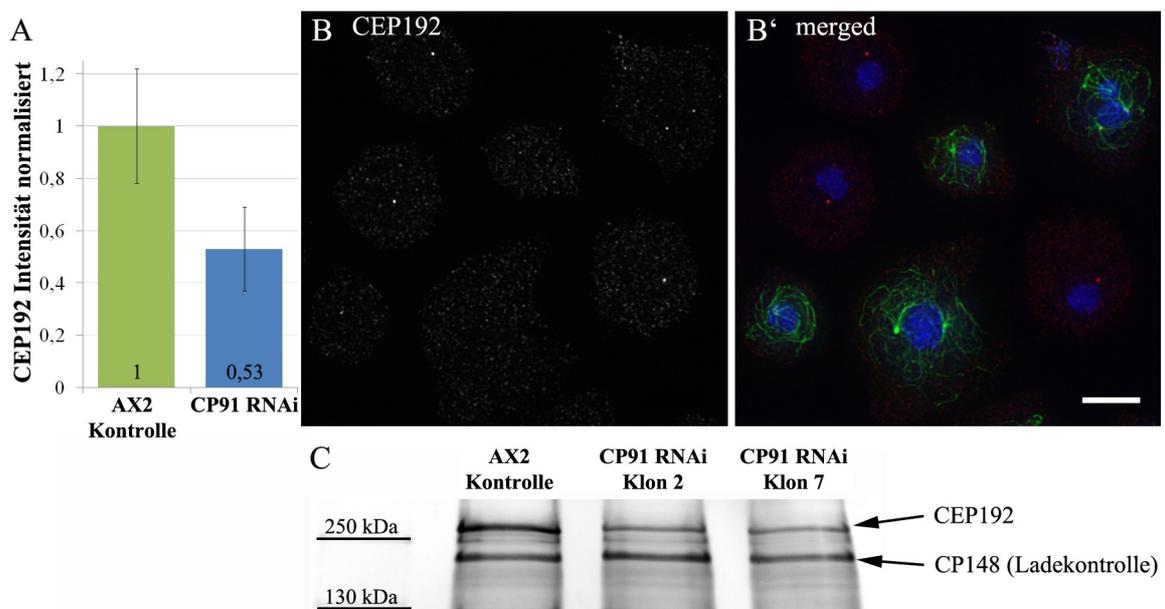


Abbildung 36: CP91-RNAi Zellen zeigen eine verminderte Expression von CEP192. GFP- $\alpha$ -Tubulin exprimierende *Dictyostelium* Zellen wurden mit einem CP91-RNAi Konstrukt transformiert und die CEP192-Expression untersucht. Zur Gewährleistung gleicher Färbekonditionen wurden die transformierten CP91-RNAi-/GFP- $\alpha$ -Tubulin-Zellen (Klon 7) im gleichen Verhältnis mit AX2 Zellen gemischt, mit Methanol fixiert und mit anti-CEP192 (Abbildung B; rot in B') bzw. die DNA mit DAPI (blau) gefärbt. Durchführung, Messung und Auswertung erfolgte wie bei CP91 und CP55. Abbildung 36 A zeigt die normalisierte CEP192-Intensität. Die Expression des CEP192 war im CP91-RNAi (B, B', n=83) 53% im Vergleich zur AX2-Kontrolle (n=162). Mittelwerte  $\pm$  S.D. sind angegeben. Balken = 5  $\mu$ m. Abbildung 36 C: Western Blot Analyse von 2 verschiedenen CP91-RNAi Stämmen mit polyklonalen Antikörpern CEP192 und CP148 als Ladekontrolle. Durchführung, Messung und Auswertung erfolgte ebenfalls wie bei CP91 und CP55. Der Vergleich des CP91-RNAi mit dem Wildtyp zeigt eine Verminderung des endogenen CEP192 um den Faktor 2. Die densitometrische Auswertung erfolgte mit der Software *ImageJ*.

### 2.1.20 CP91-Verlust beeinflusst die Organisation der Centromere in der Interphase

Das Centromer-Markerprotein Cenp68 bindet in Wildtypzellen die Centromere, welche während der G2-Phase bzw. der gesamten Mitose geclustert vorliegen. Sie stehen über die Kernhülle hinweg zu jeder Zeit mit dem Centrosom in Verbindung. (Schulz *et al.*, 2009; Kaller, Euteneuer, and Nellen, 2006). Die Funktion von Cenp68 ist weitgehend unbekannt. Wegen seiner zellzyklusunabhängigen Lokalisation an den Centromeren ist Cenp68 ein praktischer Marker für diese Strukturen. Es konnte auch gezeigt werden, dass eine Cenp68 Null-Mutation zu keinem ersichtlichen Phänotyp führt, also auch die Clusterung der Centromere und damit die Verteilung der Chromosomen nicht beeinträchtigt wird (Samereier *et al.* 2011).

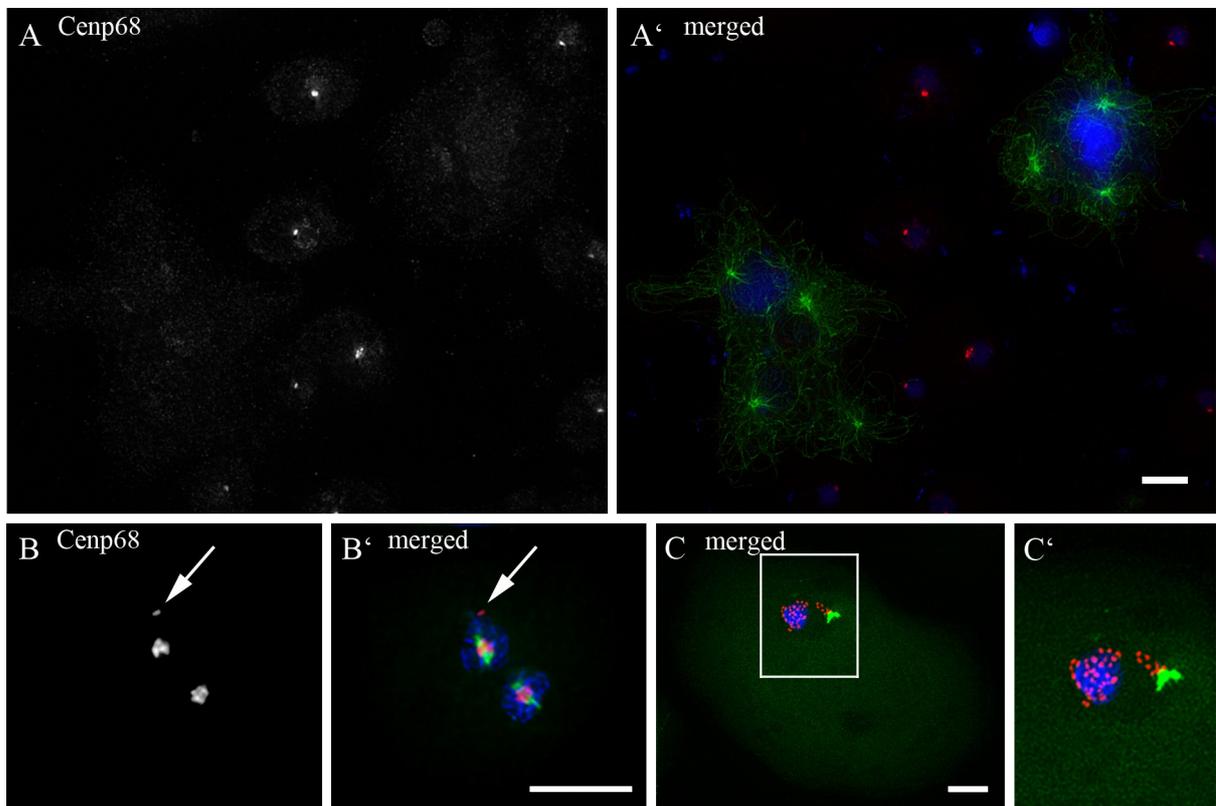


Abbildung 37: CP91-RNAi hat einen Einfluss auf Cenp68 in der Interphase. Analyse von Cenp68, einem Centromer-Markerprotein. GFP- $\alpha$ -Tubulin exprimierende *Dictyostelium* Zellen wurden mit einem CP91-RNAi Konstrukt transformiert und die CP91-Expression untersucht. Zur Gewährleistung gleicher Färbebedingungen wurden die transformierten CP91-RNAi-/GFP- $\alpha$ -Tubulin-Zellen im gleichen Verhältnis mit AX2 Zellen gemischt, mit Methanol fixiert und mit anti-Cenp68 (rot) bzw. die DNA mit DAPI (blau) gefärbt. Die AX2-Wildtypzellen konnten durch das Fehlen des Grün fluoreszierenden GFP- $\alpha$ -Tubulins von den RNAi-Zellen unterschieden werden. Balken = 5  $\mu$ m.

Bei der Untersuchung des CP91-RNAi konnten keine Cenp68 Signale an den Centromeren in Interphasezellen beobachtet werden (Abbildung 37 A und A', AX2-Zellen zeigen keine grünen Mikrotubuli). In mitotischen Zellen hingegen war das Cenp68 Signal an den Centromeren vorhanden. Es zeigten sich jedoch Beeinträchtigungen bei der Clusterung der Centromere in der Mitose. Abbildung 37 B/B' zeigt eine Prometaphase, bei der ein einzelnes

Cenp68 Signal außerhalb des Clusters liegt (Pfeil). In mitotischen CP91-RNAi Zellen mit einem starken mutanten Phänotyp bzw. großen atypischen Zellkernen konnte auch eine erhöhte Anzahl von nicht geclusterten Cenp68 Signalen gezeigt werden. Abbildung 37 C und im Ausschnitt C' zeigt einer Prophase mit deutlich erhöhter Centromeranzahl, welche über den gesamten Zellkern verstreut sind. Dies ist ein Hinweis auf eine stark erhöhte Ploidie durch Defekte in der Chromosomensegregation und eine Störung der Centrosomen-Zellkern-Centromer-Verbindung.

### **2.1.21 CP91-RNAi führt zu Störung der Centrosomen-Zellkern-Centromer-Verbindung**

Die Untersuchung des CP91-RNAi mit Cenp68 weist auf eine Störung der Centrosomen-Zellkern-Centromer-Verbindung hin. Um diese Vermutung zu bestärken, wurde Sun1 untersucht. Sun1 ist ein Transmembranprotein der Kernhülle in *Dictyostelium* (Schulz *et al.*, 2009) und ein wichtiger Bestandteil dieser Verbindungsstruktur. Es lokalisiert konzentriert in der pericentrosomalen Region des Zellkerns von AX2 Kontrollzellen. CP91-RNAi Zellen zeigen im Gegensatz zu AX2-Zellen eine gleichmäßigere Verteilung von Sun1 in der Kernhülle. Abbildung 38 A/A' zeigt eine CP91-RNAi Zelle mit 9 MTOCs, 2 davon mit einem Sun1 Signal (unter beiden Pfeile). Nur ein MTOC ist mit der Kernhülle verbunden (A/A', linker unterer Pfeil). Im Vergleich mit der pericentrosomalen Region einer AX2-Kontrollzelle (Abbildung 38 A „Inset I“ oberer Pfeil, AX2-Zellen mit # gekennzeichnet) ist Sun1 im CP91-RNAi in der pericentrosomalen Region viel geringer konzentriert und dafür gleichmäßiger verteilt (Abbildung 38 A, A'; „Inset II“). Die Untersuchung mit einem weiteren Kernhüllenprotein, dem Lamin-ähnlichen NE81, zeigten keine Unterschiede der Lokalisation im Vergleich zu Wildtypzellen. NE81 war hier gleichmäßig in der Kernhülle verteilt (Abbildung 38 B). Es zeigten sich, wie beim Sun1 (nicht gezeigt), aber oft „Ausstülpungen“ in der Kernmembran die keine DNA enthielten. Es konnten auch Teile von Kernmembranfragmenten, die mit freien MTOCs assoziiert waren, beobachtet werden (Abbildung 38 B“; Pfeil).

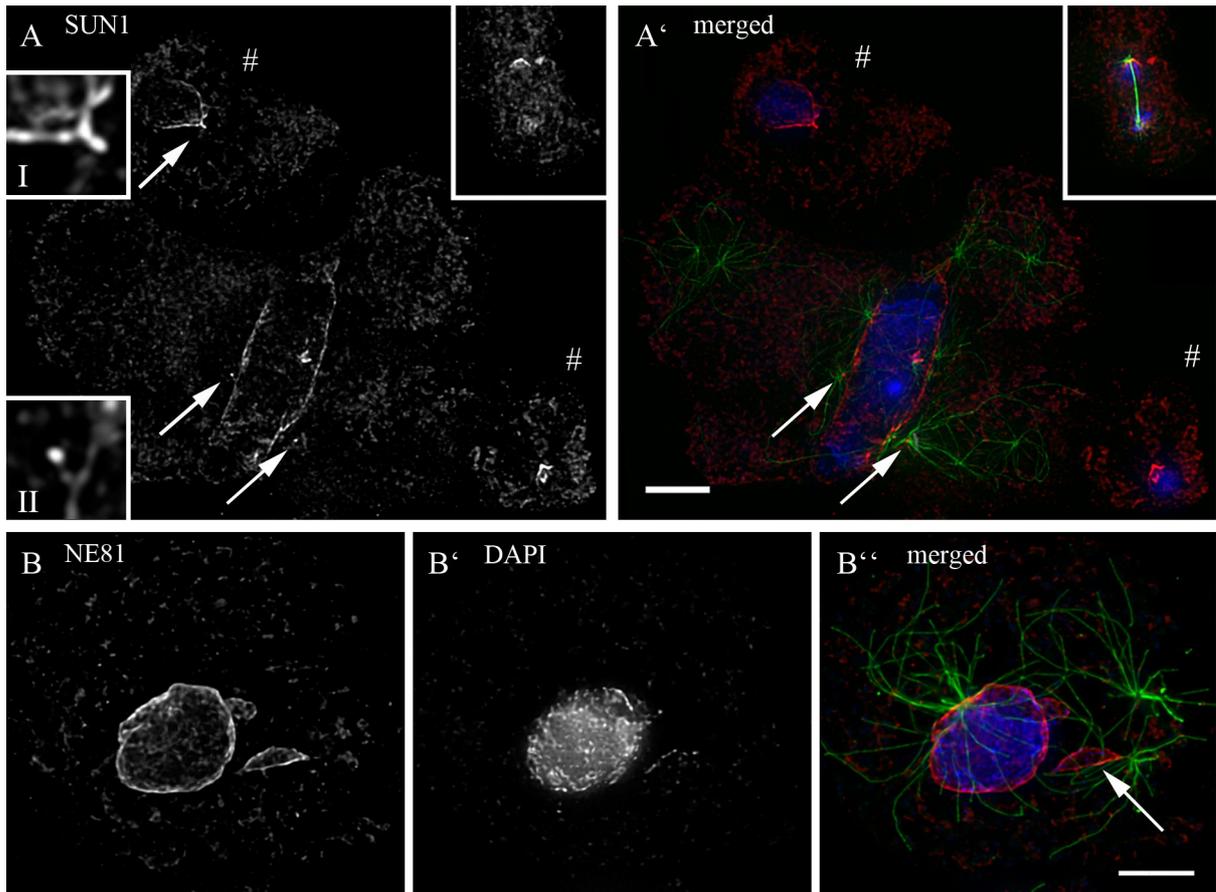


Abbildung 38: CP91-RNAi führt zu Störung der Centrosomen-Zellkern-Centromer-Verbindung. Analyse der Kernhüllenproteine Sun1 und NE81 im CP91-RNAi. GFP- $\alpha$ -Tubulin exprimierende *Dictyostelium* Zellen wurden mit einem CP91-RNAi Konstrukt transformiert und die CP91-Expression untersucht. Zur Gewährleistung gleicher Färbebedingungen wurden die transformierten CP91-RNAi-/GFP- $\alpha$ -Tubulin-Zellen im gleichen Verhältnis mit AX2 Zellen gemischt, mit Glutaraldehyd fixiert und mit anti-Sun1 (A, A', rot), anti-NE81 (B, B', B'', rot) bzw. die DNA mit DAPI (blau) gefärbt. Die AX2-Wildtypzellen konnten durch das Fehlen des Grün fluoreszierenden GFP- $\alpha$ -Tubulin von den RNAi-Zellen unterschieden werden. Balken = 5  $\mu$ m.

### 2.1.22 CP91-RNAi führt zu überzähligen kernassoziierten Centrosomen

Für die Phänotypisierung des CP91-RNAi wurde ebenfalls die Anzahl und Verteilung der Centrosomen und Kerne untersucht. Wie in Abschnitt 2.1.7 und 2.1.16 beschrieben wurden für alle Phänotypauswertungen nur intakte MTOCs mit centrosomaler Färbung ausgezählt. Um eindeutige Aussagen in der Auswertung zu treffen und Missverständnisse in der Diskussion zu vermeiden sind in allen folgenden Phänotypauswertungen die ausgezählten Centrosomen ebenfalls mit MTOCs gleichzusetzen. Der RNAi von CP91 führte, wie die Überexpression, zu einer stark erhöhten Centrosomenanzahl und multinukleären Zellen. Da in Schüttelkultur der Phänotyp verloren ging oder die Zellen nicht wuchsen, konnten nur die adhärent wachsenden Klone untersucht werden. Zwei untersuchte CP91-RNAi Klone (7 und 12) zeigten einen ähnlichen Phänotyp (Abbildung 39 A) wie die Überexpressionsmutanten (Abbildung 11). Zwischen 45-57 % der Zellen zeigten überzählige, Mikrotubuli-nukleierende

## Ergebnisse

Centrosomen, die kernassoziiert oder frei im Cytoplasma vorlagen (Abbildung 39 A;  $N < C$ ). Weniger als ein Drittel der Zellen zeigten einen wildtypischen Phänotyp ( $N=C=1$ ). Im Vergleich zur Überexpression konnten beim CP91-RNAi aber vermehrt Cytoplasten, 9-13% der Zellen, beobachtet werden. Aufgrund der geschlossenen Mitose in *Dictyostelium* nehmen aber nur kerngebundene Centrosomen an der Segregation der Chromosomen teil (Roos, 1975b; Moens, 1976). Deshalb wurde nun das Verhältnis der Centrosomen an einzelnen Kernen untersucht. Abbildung 39 B zeigt bei den CP91-RNAi Klonen einen hohen Anteil an Kernen, 58,3% und 52,2%, mit zwei oder mehr kernassoziierten Centrosomen. Das erklärt auch die schwerwiegenden Probleme bei der Kernteilung.

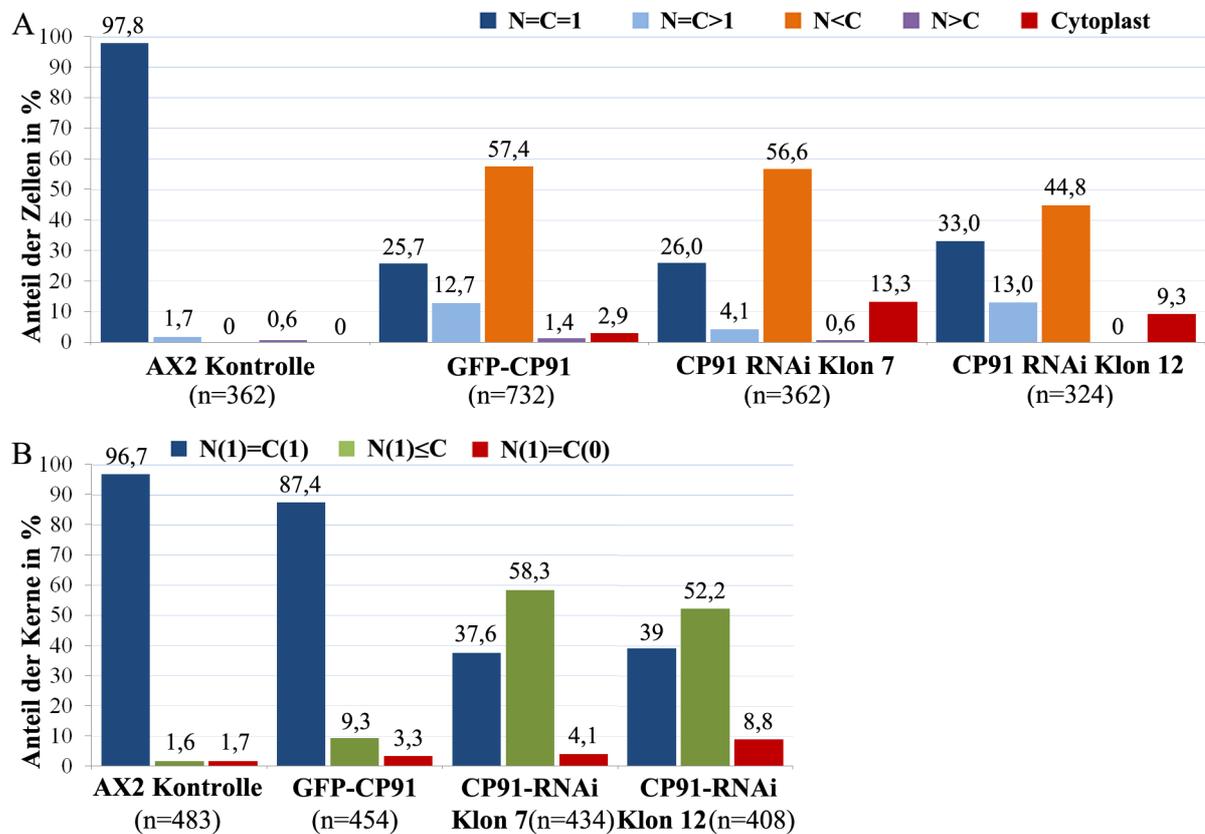


Abbildung 39: CP91-RNAi führt zu überzähligen kernassoziierten Centrosomen. Zusammenfassung der Phänotypauswertung des CP91-RNAi. (A) Untersucht wurden zwei RNAi Klone. Dargestellt ist das prozentuale Verhältnis der Kerne und Centrosomen einzelner Zellen in adhären wachsender Kultur (CP91-RNAi Klon 7; n=362 und CP91-RNAi Klon 12; n=324) im Vergleich mit einer adhären wachsenden AX2 Kontrolle (n=362). Auf der Y-Achse ist der prozentuale Anteil der Zellen an der ausgewerteten Gesamtzellzahl dargestellt. Die X-Achse gibt das Centrosomen-Kern-Verhältnis einzelner Zellen an, wobei N für Nukleus / Kern und C für Centrosom steht. Es gab kaum Karyoplasten, aber viele Cytoplasten. (B) Dargestellt ist das prozentuale Verhältnis von Kernen mit kernassoziierten Centrosomen in adhären wachsender Kultur (GFP-CP91; n=454 / CP91-RNAi Klon 7; n=434 / CP91-RNAi Klon 12; n=408) im Vergleich mit einer adhären wachsenden AX2 Kontrolle (n=483). Auf der Y-Achse ist der prozentuale Anteil der Kerne an der ausgewerteten Gesamtkernzahl dargestellt. Die X-Achse gibt den Anteil von Kernen mit kernassoziierten Centrosomen an, wobei N für Nukleus / Kern und C für Centrosom steht.  $N(1) \leq C$  sind Kerne mit 2 oder mehr assoziierten Centrosomen.  $N(1)=C(0)$  sind Kerne ohne assoziierte Centrosomen, wobei das Ausschlusskriterium ein Kern-Centrosomenabstand von  $2\mu\text{m}$  war.

## Ergebnisse

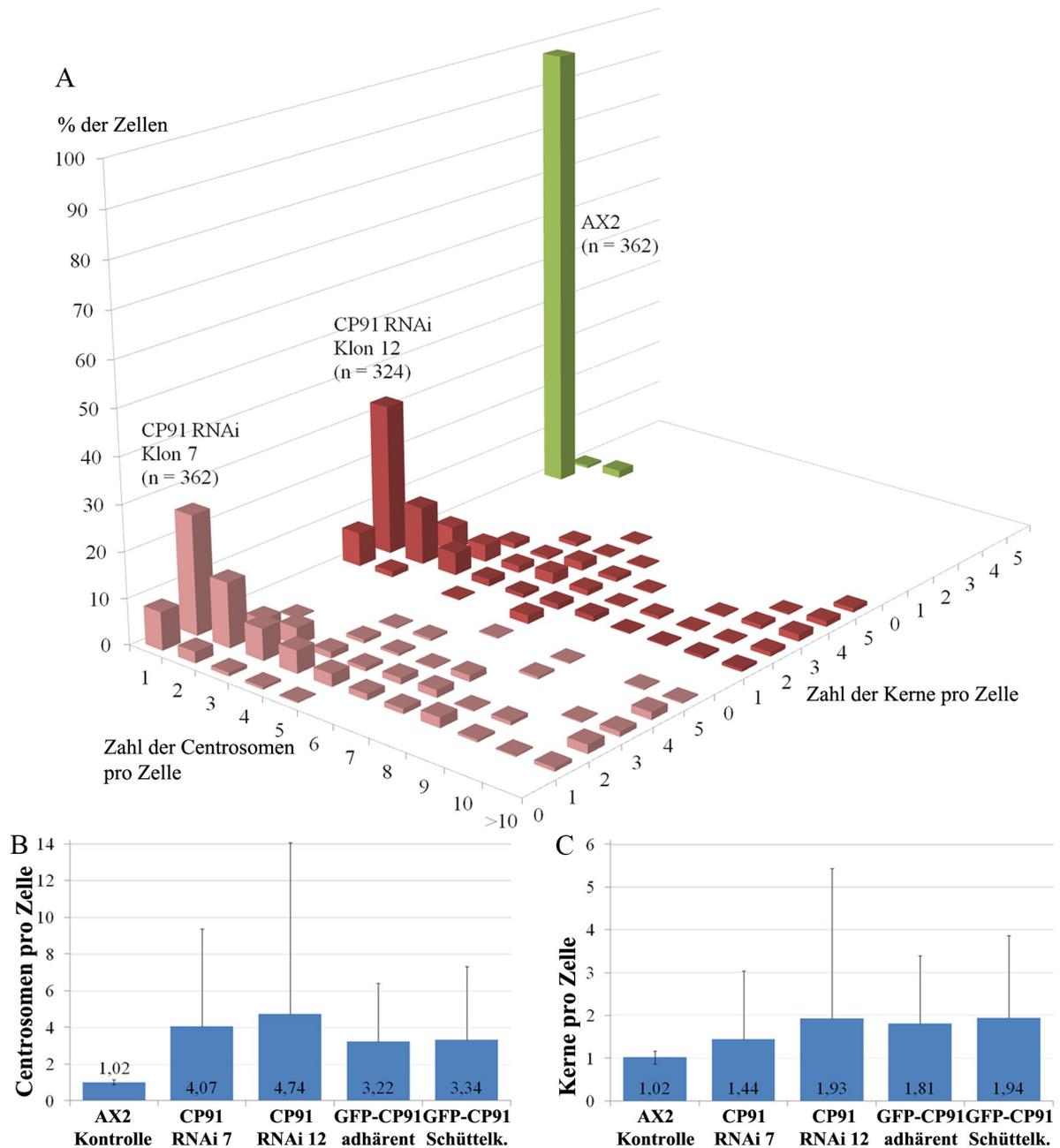


Abbildung 40: Vergleichende Phänotypauswertung des CP91-RNAi. (A) Dargestellt ist die Verteilung der Kerne und Centrosomen einzelner Zellen in adhären wachsender Kultur zweier untersuchter Klone (CP91-RNAi Klon 7, n=362 und CP91-RNAi Klon 12, n=324) im Vergleich mit einer adhären wachsenden AX2 Kontrolle (n=362). Auf der Y-Achse ist der prozentuale Anteil der Zellen an der ausgewerteten Gesamtzellzahl dargestellt. Die X-Achse gibt die Anzahl der Centrosomen einzelner Zellen und die Z-Achse die Anzahl der Kerne einzelner Zellen an. Es gab keine Karyoplasten (Zellen mit Zellkern, aber ohne Centrosom), dafür aber viele Cytoplasten (kein Zellkern). Die Ausgangsdaten der Abbildung 40 A befinden sich ebenfalls in einer tabellarischen Form im Anhang. (B) Darstellung der durchschnittlichen Centrosomenanzahl pro Zelle. Es zeigte sich im Durchschnitt mehr als eine Vervierfachung der Centrosomenanzahl pro Zelle im Vergleich zu der AX2 Kontrolle. (C) Darstellung der durchschnittlichen Kernanzahl pro Zelle. Es zeigte sich fast eine Verdoppelung der Kernanzahl zum Vergleich einer AX2 Kontrolle. Zum Vergleich ist die GFP-CP91 Überexpression mit angegeben. Mittelwerte  $\pm$  S.D. sind angegeben.

Abbildung 40 A zeigt die Verteilung der Centrosomen und Kerne einzelner Zellen im Vergleich zweier Phänotyp-starker RNAi Klone (CP91-RNAi Klon 7, n=362 und CP91-RNAi Klon 12, n=324) zu einer AX2 Kontrolle (n=362) in einem dreidimensionalen Diagramm. Es zeigten sich wieder Ähnlichkeiten zur CP91 Überexpression. Größere Unterschiede zeigten sich dagegen in der Anzahl der Centrosomen. Die durchschnittliche Centrosomenanzahl pro Zelle war vier bis fünf Mal größer im Vergleich zum Wildtyp (Abbildung 40 B). Die durchschnittliche Kernanzahl pro Zelle zeigte wie die Überexpression eine Verdopplung (Abbildung 40 C). CP91-RNAi Klon 12 hebt sich besonders durch eine extrem hohe Variabilität in der Centrosomenanzahl bzw. Kernanzahl einzelner Zellen hervor. Das wird durch die hohe Standardabweichung verdeutlicht.

### **2.1.23 CP91-RNAi zeigt eine erhöhte Ploidie**

Bei der Analyse der Immunfluoreszenzpräparate des CP91-RNAi waren ebenfalls eine Vergrößerung der Zellfläche, Kernfläche und sehr oft untypische DAPI-Färbungen auffällig (Abbildung 41). Die Quantifizierung der Zellfläche von CP91-RNAi Zellen im Vergleich zu Wildtypzellen ergab eine durchschnittliche Größenzunahme um den Faktor fünf bis neun (Abbildung 42 A). Es konnten aber auch Zellen mit einer Zellfläche von mehr als  $10000\mu\text{m}^2$  beobachtet werden, dies entspricht einem Faktor größer 200. Die Kernfläche von CP91-RNAi Zellen im Vergleich zu Wildtypzellen ergab eine mittlere Größenzunahme um den Faktor 3,5 bis vier (Abbildung 42 B). Im Vergleich zu der CP91 Überexpression zeigten sich hier deutliche Unterschiede, besonders in der hohen Variabilität der Werte von individuellen RNAi Zellen (hohe Standardabweichung). Darüber hinaus deuteten die DAPI Färbungen und die Färbungen mit dem Centromer-Marker Cenp68 (Abbildung 37) häufig auf eine durch CP91-RNAi verursachte Aneuploidie hin. Daher konnte es nicht überraschen, dass der DNA-Gehalt pro Zellkern in CP91-RNAi/GFP- $\alpha$ -Tubulin-Zellen im Vergleich mit AX2-Zellen im Durchschnitt um den Faktor 4,7 erhöht war (Abbildung 42 C). Erstaunlich waren auch die extrem großen Unterschiede im DNA-Gehalt individueller CP91-RNAi Zellen, welche bis zum 90-fachen des normalisierten Wertes erreichen konnten (Abbildung 42 E). Zusammenfassend zeigten 55% der CP91-RNAi Zellen einen mehr als zweifachen DNA-Gehalt. In Verbindung mit beobachteten überzähligen Centromeren (Abbildung 37) kann man auf eine erhöhte Ploidie schließen.

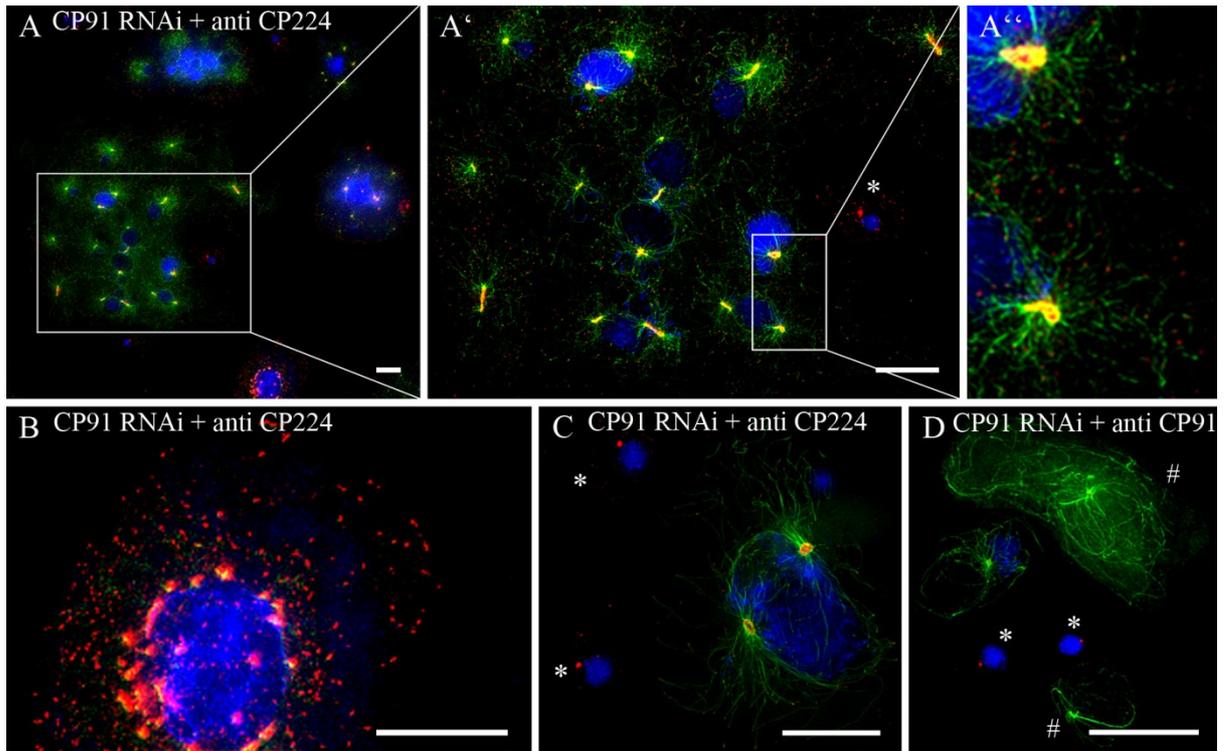


Abbildung 41: Auftreten riesiger Zellen und Cytoplasten im CP91 RNAi. Abbildung A zeigt ein Übersichtsbild von Interphasezellen einer CP91-RNAi Mutante. Abbildungen A' und A'' zeigen Ausschnitte einer riesigen multinuklearen CP91-RNAi Zelle mit über 100µm im Durchmesser. Zum Vergleich sind AX2-Wildtypzellen (durchschnittlich 10-15µm im Durchmesser) mit \* gekennzeichnet. Der Coronamarker CP224 zeigt zudem vergrößerte Coronastrukturen der Centrosomen bei ausgeprägten Phänotypen (A'', B, C). Abbildung B und C zeigen CP91-RNAi Zellen mit stark vergrößertem Zellkern. Centrosomen können kernassoziiert (C) oder auch frei (B) vorliegen. (D) Cytoplasten sind mit # gekennzeichnet. CP91-RNAi-/GFP- $\alpha$ -Tubulin-Zellen wurden im gleichen Verhältnis mit AX2 Zellen gemischt, mit Methanol fixiert und mit anti-CP224 (rot in Abbildung A, A', A'', B und C) bzw. rot in anti-CP91 (Abbildung D) und die DNA mit DAPI (blau) gefärbt. Balken = 10 µm.

## Ergebnisse

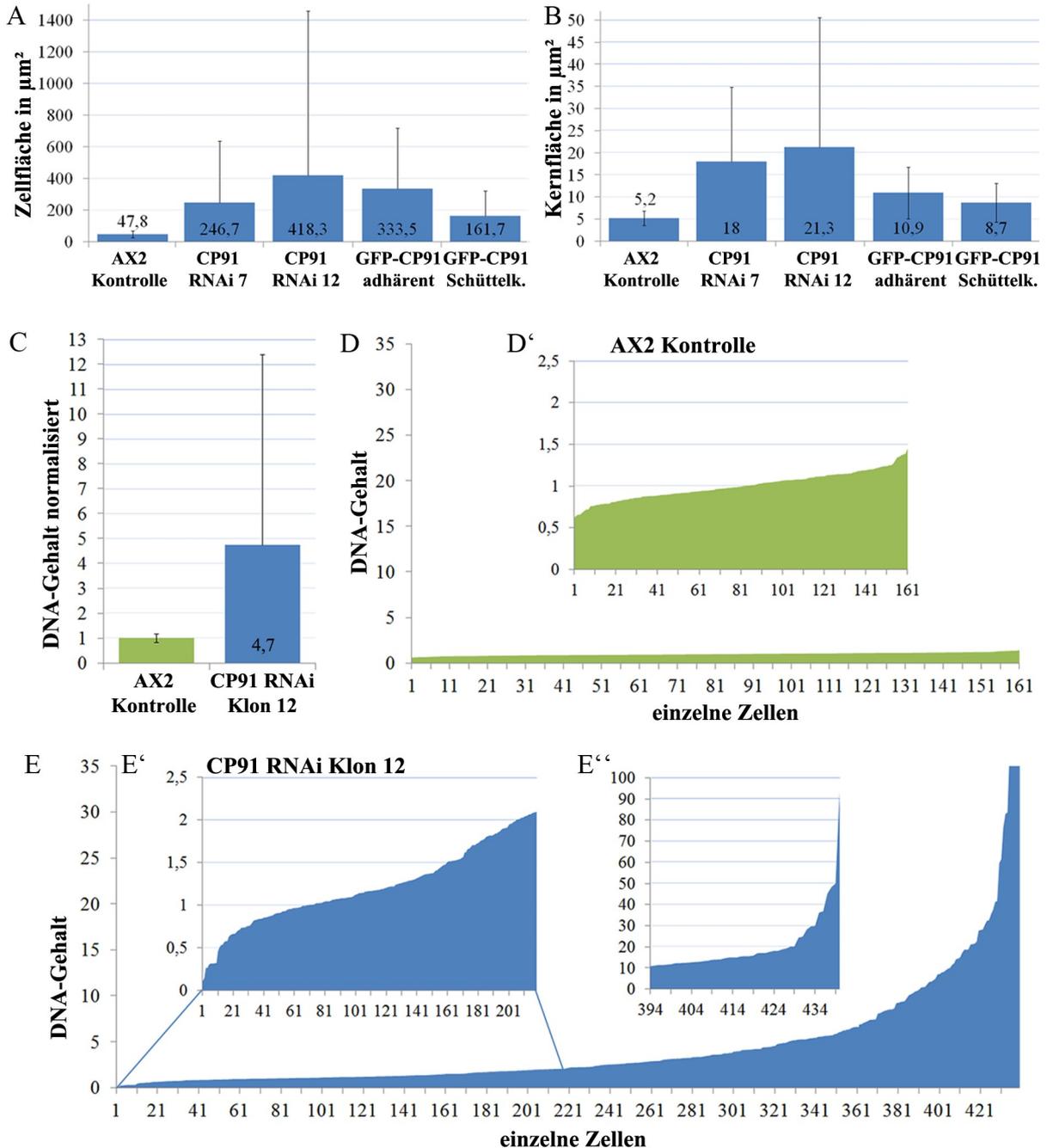


Abbildung 42: CP91-RNAi führt zu einer erhöhten Ploidie. CP91-RNAi resultiert in einer Vergrößerung der Zellfläche (A), Kernfläche (B) sowie einen erhöhten DNA-Gehalt (C, D, D', E, E', E''). Um den DNA-Gehalt von AX2 und GFP- $\alpha$ -Tubulin/CP91-RNAi-Zellen bestimmen zu können, wurden beide Stämme 1:1 gemischt und mit anti-CP91 gefärbt (Alexa 568 anti-Kaninchen). Die AX2 Zellen konnten nun anhand des fehlenden Grün fluoreszierenden Tubulins von den RNAi-Zellen unterschieden werden. (A) Die Fläche der Zellen im Phasenkontrastbild wurde als Maß für die Größe der Zellen verwendet. AX2 Zellen zeigten im Mittel eine Fläche von ca.  $48 \mu\text{m}^2$  ( $n=362$ ), CP91 RNAi-Zellen dagegen  $246,7 \mu\text{m}^2$  (Klon 7;  $n=362$ ) bzw.  $418,3 \mu\text{m}^2$  (Klon 12;  $n=324$ ). Die Flächen der GFP-CP91 Überexpression, adhären ( $n=333$ ) und in Schüttelkultur ( $n=401$ ), sind als Vergleich mit angegeben. Mittelwerte  $\pm$  S.D. sind angegeben. (B) Die Fläche des DAPI-Signals wurde als Maß für die Größe der Kerne verwendet. AX2 Zellen zeigten im Mittel eine Kernfläche von ca.  $5,2 \mu\text{m}^2$  ( $n=511$ ), CP91-RNAi Zellen dagegen  $18 \mu\text{m}^2$  (Klon 7;  $n=457$ ) bzw.  $21,3 \mu\text{m}^2$  (Klon 12;  $n=440$ ). Die Kernflächen der GFP-CP91 Überexpression, adhären ( $n=343$ ) und in Schüttelkultur ( $n=351$ ), sind als Vergleich mit angegeben. (C, D, D', E, E', E'') Der DNA-Gehalt wurde als Produkt aus gemessener Kernfläche [ $\mu\text{m}^2$ ] und Intensität der DAPI-Färbung (16-Bit Graustufen) berechnet. Die Werte für CP91-RNAi Klon 12 ( $n=440$ ) wurden auf den Mittelwert von AX2 Zellen (=1) ( $n=161$ ) normalisiert und als Diagramm in (C) dargestellt. Die Grafiken in (D, D', E, in Ausschnitten E' und E'') zeigen den normalisierten DNA Gehalt jeder einzelnen Zelle (y-Achse), der nach steigender Größe (x-Achse) angeordnet wurde. Diagramm E'' zeigt einen Ausschnitt der Zellen mit sehr hohem DNA-Gehalt, die das 10-fache des normalen Wertes überschreiten. Der Vergleich der beiden Diagramme (D und E) zeigt einen erhöhten Anteil von Zellen mit aberranter Ploidie

bei CP91-RNAi-Zellen. Circa 240 von 440 CP91 RNAi-Zellen (E, E') weisen einen mehr als doppelten DNA-Gehalt im Vergleich zum normalisierten Mittelwert der AX2 Zellen auf.

### 2.1.24 CP91-RNAi führt, wie die Überexpression, zu starken Wachstumsdefekten

Der CP91-RNAi zeigte, wie die GFP-CP91 Überexpression einen abnormen Karyotyp, sowie starke Störungen in der Mitose und Cytokinese. Adhärenz wachsende CP91-RNAi Zellen zeigten ein sehr stark verlangsamtes Wachstum. In einem Wachstumsexperiment mit GFP-CP91 und AX2 Kontrollzellen wurde gleichzeitig auch der CP91 RNAi in der Schüttelkultur getestet (Abbildung 43). Der CP91-RNAi wächst bis 50 Stunden genauso langsam wie die GFP-CP91 Überexpression. Nach 50 Stunden zeigt der CP91-RNAi eine leichte exponentielle Wachstumsphase wie die AX2 Kontrollzellen nach 30 Stunden, kommt aber dennoch nicht an die Wachstumsrate des Wildtyps heran. Eine maximale Zelldichte von ca.  $1,1 \times 10^7$  Zellen/ml erreichte der RNAi nach 4 Tagen. Da der RNAi in Schüttelkultur seinen Phänotyp verlor, kann man vermuten, dass die RNAi-Zellen teilweise zum Wildtyp revertierten. Der starke Selektionsdruck gegen den CP91-RNAi führte wahrscheinlich, wie bei der GFP-CP91 Überexpression, zu einem deutlich verminderten mutanten Phänotyp und somit zu einem schnelleren Wachstum.

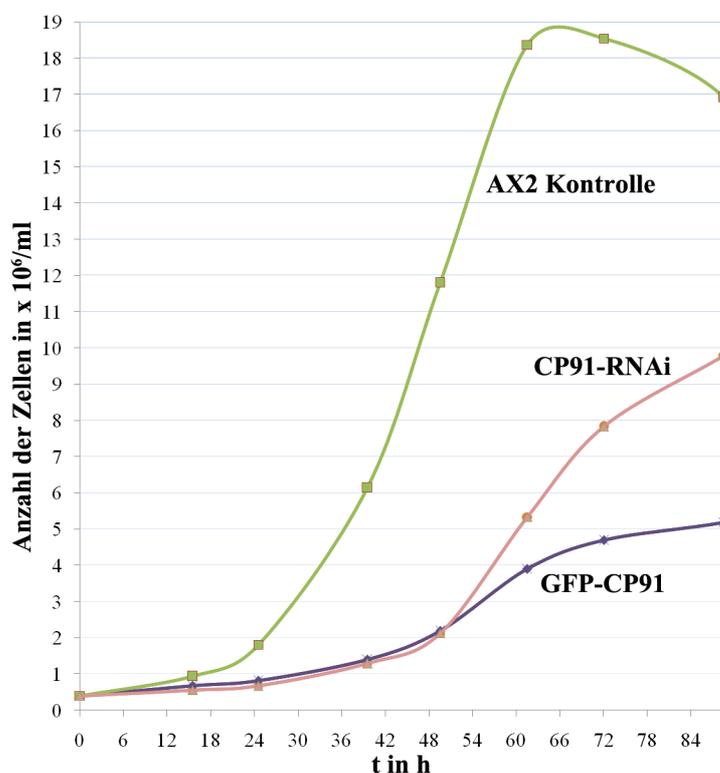


Abbildung 43: Wachstumsverhalten des CP91-RNAi mit AX2 Kontrollzellen und GFP-CP91 in Schüttelkultur. Der CP91 RNAi zeigt wie die GFP-CP91 Überexpression zuerst ein stark verringertes Wachstum im Vergleich zu den AX2 Kontrollzellen. Nach 50 Stunden zeigt der CP91-RNAi eine leichte exponentielle Wachstumsphase, wie die AX2 Kontrollzellen nach 30h, kommt aber dennoch nicht an die Wachstumsrate des Wildtyps heran. Da der RNAi in Schüttelkultur seinen Phänotyp verlor kann man vermuten, dass der CP91-RNAi teilweise zum Wildtyp revertierte. GFP-CP91 zeigte keine exponentielle Wachstumsphase. Auf der x-Achse ist die Zeit in Stunden, auf der y-Achse die Zelldichte in Zellen pro ml aufgetragen. Die Zellzahl wurde mit einer Neubauer *improved*-Zählkammer (0,100 mm Tiefe) bestimmt.

### 2.1.25 CP91 spielt eine Rolle bei der Cytokinese und dem Spindelaufbau

Es konnte schon bei der CP91-Überexpression ein starker Karyokinese- bzw. Cytokinesedefekt festgestellt werden. Neben erhöhter Centrosomen- bzw. Kernanzahl zeigte auch der CP91-RNAi eine stark vergrößerte Zell- und Kernfläche (Abbildung 42 A/B). Abbildung 44 zeigt die Größenverteilung der Zellfläche von zwei untersuchten CP91-RNAi Klonen. Im Vergleich mit der CP91 Überexpressionsmutanten konnte man beim RNAi

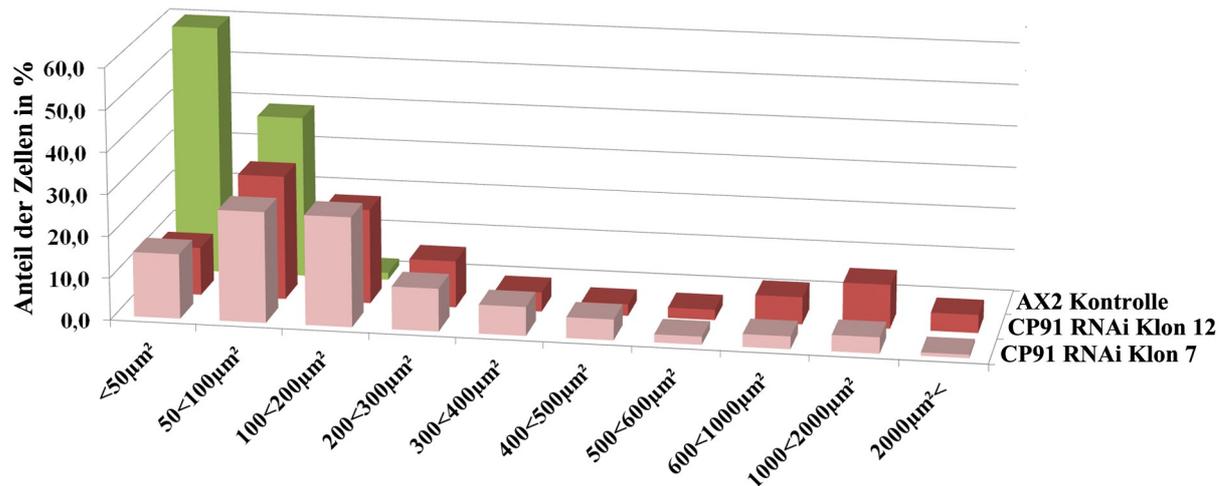


Abbildung 44: CP91 spielt eine Rolle bei der Cytokinese. Größenverteilung (Zellfläche) des CP91-RNAi. Adhärenz wachsende Zellen (CP91-RNAi Klon 7; n=362 / CP91-RNAi Klon 12; n=324) im Vergleich mit einer adhärenz wachsenden AX2 Kontrolle (n=362). Auf der Y-Achse ist der prozentuale Anteil der Zellen an der ausgewerteten Gesamtzellzahl dargestellt. Die X-Achse gibt die Zellflächenbereiche an.

von CP91 eine besonders große Anzahl an Zellen über 600 µm² Zellfläche beobachten (vereinzelt bis 10000µm²). Bei CP91 Überexpressionsmutanten zeigten sich keine Probleme bei der Zelladhäsion. CP91-RNAi Zellen hingegen wiesen Probleme bei der Zell-adhäsion auf, besonders bei großen Zellen. Sie „schwammen auf“ und lösten sich bei leichter Erschütterung vom 24-Well Zellkulturplattenboden (siehe Abschnitt 2.1.17). Ein großer Teil der CP91 RNAi Zellen wurden somit verstärkt bei der Fixierung mit Methanol vom Untergrund abgelöst. Die Größenverteilung (Abbildung 44) als auch die mittlere Zellfläche (Abbildung 42 A) zeigen daher nicht den vollen Umfang des extremen Phänotyps der lebenden CP91-RNAi Zellen, sondern „nur“ verringerte Werte. Beim CP91-RNAi war der Cytokinesedefekt daher viel ausgeprägter, als aus den Daten hervorgeht.

Bei der Untersuchung von lebenden GFP-CP91/*cherry*-Histon-2B überexprimierenden Zellen konnten Defekte bei der Segregation der Chromosomen beobachtet werden (Abschnitt 2.1.11; Abbildung 20). Viele der Aufnahmen zeigten zudem Zellteilungen, bei denen keine vollständige Cytokinese stattfinden konnte (Film Mitose). Im CP91-RNAi konnte man die

Effekte, die das Mikrotubuli-Cytoskelett betreffen, besser untersuchen, da das CP91 RNAi Konstrukt in GFP- $\alpha$ -Tubulin exprimierende Zellen transformierte wurde.

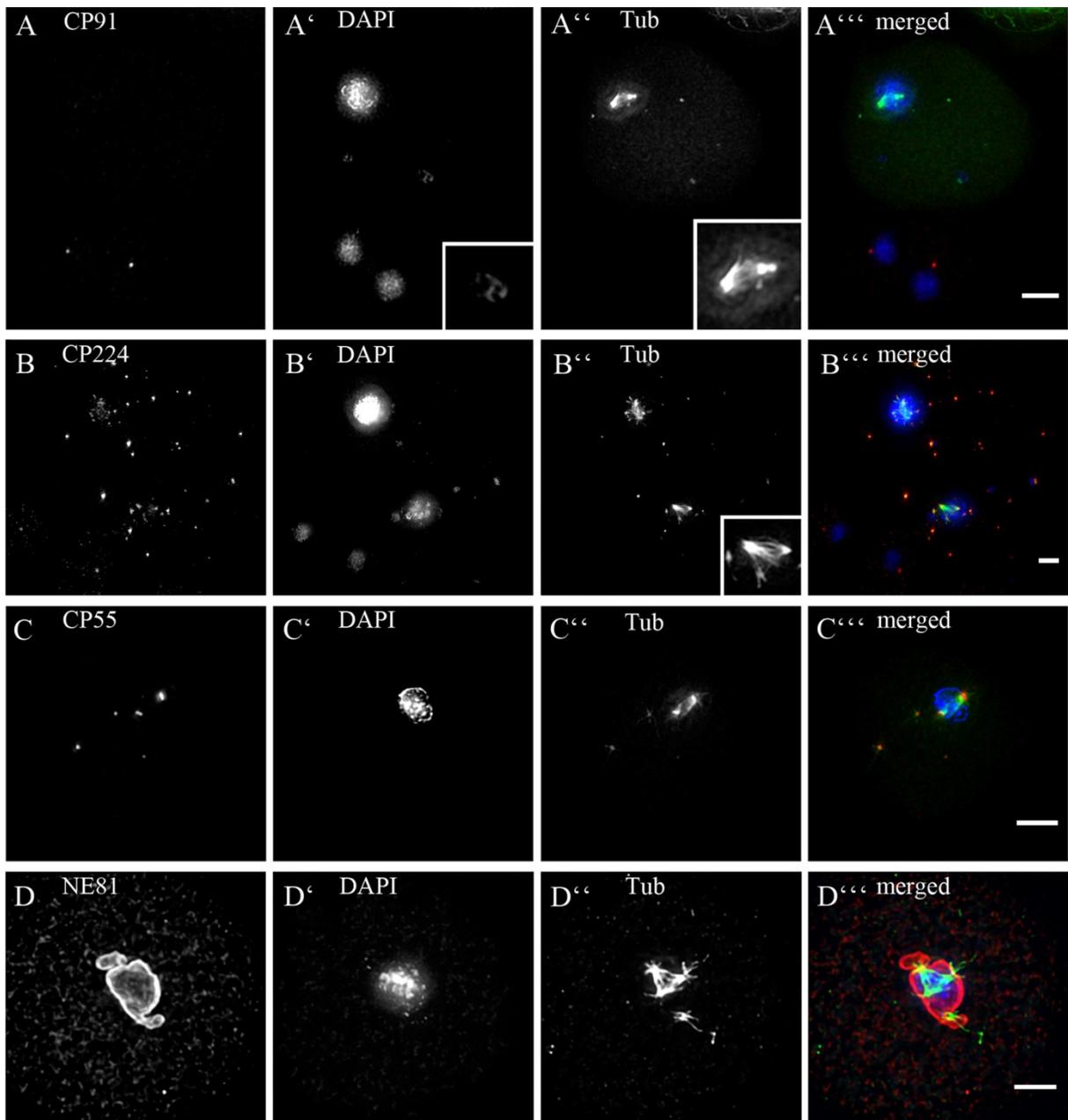


Abbildung 45: Metaphasestadien des CP91-RNAi mit starken Spindeldefekten. Deformierte oder teilweise unterbrochene Mitosespindeln sowie Mikrotubuli-assoziierte Centrosomenbruchstücke mit Bestandteilen der Corona (CP224) und der centrosomalen Core-Region (CP55) sind in der Metaphase zu beobachten. CP91-RNAi-/GFP- $\alpha$ -Tubulin-Zellen wurden im gleichen Verhältnis mit AX2 Zellen gemischt, mit Methanol fixiert, mit anti-CP91 (A), anti-CP224 (B), anti-CP55 (C) bzw. Glutaraldehyd fixiert und mit anti-NE81 (D) in Rot angefärbt und die DNA mit DAPI (blau) gefärbt. Balken = 3  $\mu$ m.

In der Immunfluoreszenzmikroskopie zeigten CP91-RNAi Zellen häufig schwere Mitosedefekte, die deformierte oder teilweise unterbrochene Mitosespindeln aufwiesen. Abbildung 45 zeigt Mikrotubulifehlbildungen in der Metaphase. Die „Insets“ in Abbildung 45 A'' und B'' zeigen die Mikrotubuli der deformierten Metaphasespindeln vergrößert im Ausschnitt. In Abbildung 45 D''' sieht man eine Zelle im Metaphasestadium, deren Kern mit

## Ergebnisse

mehr als einem Centrosom assoziiert ist, und drei Spindelpole aufweist. Abbildung 45 A‘/A‘‘ zeigen zusätzliche kleine DNA-Massen bzw. einzelne Chromosomen, welche oft mit Mikrotubuli assoziiert waren. Daraus kann man schließen, dass die Zellen zur korrekten Segregation der Chromosomen nicht in der Lage sind. In Lebenduntersuchungen von GFP-CP91 überexprimierenden Zellen konnte die Entstehung von überzähligen Centrosomen in der Metaphase bzw. frühen Anaphase beobachtet werden (Abbildung 18). In Abbildung 45 B‘‘ und C‘‘ kann man an den Mikrotubulibruchstücken jeweils Komponenten der Corona (CP224, B) bzw. der centrosomalen Core-Region (CP55, C) beobachten. Das lässt darauf schließen, dass im CP91 RNAi die strukturelle Integrität der Centrosomen durch das Fehlen von CP91 gestört ist. Centrosomenfragmente bzw. kleine aktive Funktionseinheiten könnten im Verlauf der Mitose durch Zugkräfte der Mikrotubuli gelöst werden und somit zu zusätzlichen Centrosomen führen. Daraus resultierende multipolare oder defekte Spindeln könnten den korrekten Ablauf der Mitose verhindern.

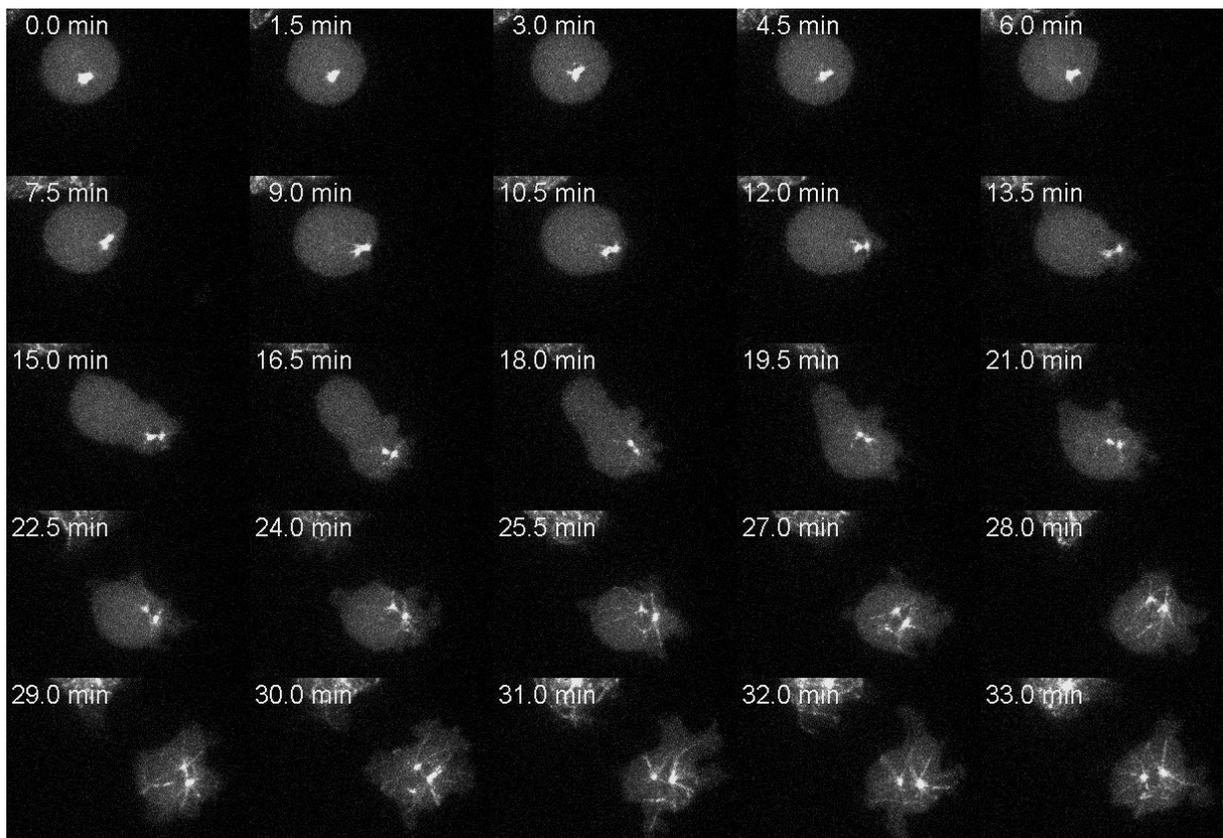


Abbildung 46: Fehlschlagen der Spindelbildung bei lebenden GFP- $\alpha$ -Tubulin/CP91-RNAi Zellen. Es entsteht ein Zelle mit vergrößertem Zellkern und 2 kernassoziierten Centrosomen. Die Aufnahmen erfolgten mit konfokaler-Spinning-Disk-Mikroskopie; Zeitraffer der Akquisition betrug 4 Stacks pro Minute (bei einer Bildrate von 10 fr/s); maximale Intensitätsprojektion von 7 Ebenen pro Bildstapel. (Video5 auf CD im Anhang)

Abbildung 46 zeigt eine Bildreihe einer lebenden CP91-RNAi Zelle, bei der die Spindelbildung fehlschlägt. Es konnte hier zwischen den duplizierten Centrosomen keine Spindel ausgebildet werden. Die verdoppelten Chromosomen konnten nicht getrennt werden und

## Ergebnisse

resultieren in einem vergrößerten Zellkern der mit zwei Centrosomen assoziiert ist. Es kommt hier gar nicht zu einer Cytokinese (Video-Mitose5 auf CD im Anhang). Oft verblieben die mitotischen RNAi Zellen eine längere Zeit in der Prometaphase (bis zu 50 Minuten) bis es zur Trennung der Spindelpole und Ausbildung der Spindel kam. Bei AX2 Kontrollzellen dauert die Prometaphase dagegen durchschnittlich nur 2 Minuten (Ueda *et al.*, 1999; Rehberg *et al.*, 2002).

Es konnten aber auch fehlerhafte Cytokinesen beobachtet werden. Abbildung 47 zeigt in einer Bildreihe den erfolgreichen Aufbau einer Spindel und die Elongation. Bei 6 Minuten reißt die Spindel und eine Teilungsfurche bildet sich, welche bis 8,4 Minuten zu sehen ist. Anschließend löst sich die Einschnürung wieder auf, die beiden Tochterzellen vereinigen sich und bilden wieder Interphase-Mikrotubuli. Hier zeigten sich Defekte bei der Kontraktion der Teilungsfurche mit der Folge, dass die Cytokinese nicht erfolgreich stattfinden konnte. Dieser Ablauf verbildlicht, wie vergrößerte multinukleare Zellen mit gleicher Anzahl von Kernen und Centrosomen entstehen können (Video-Mitose6 im CD Anhang).

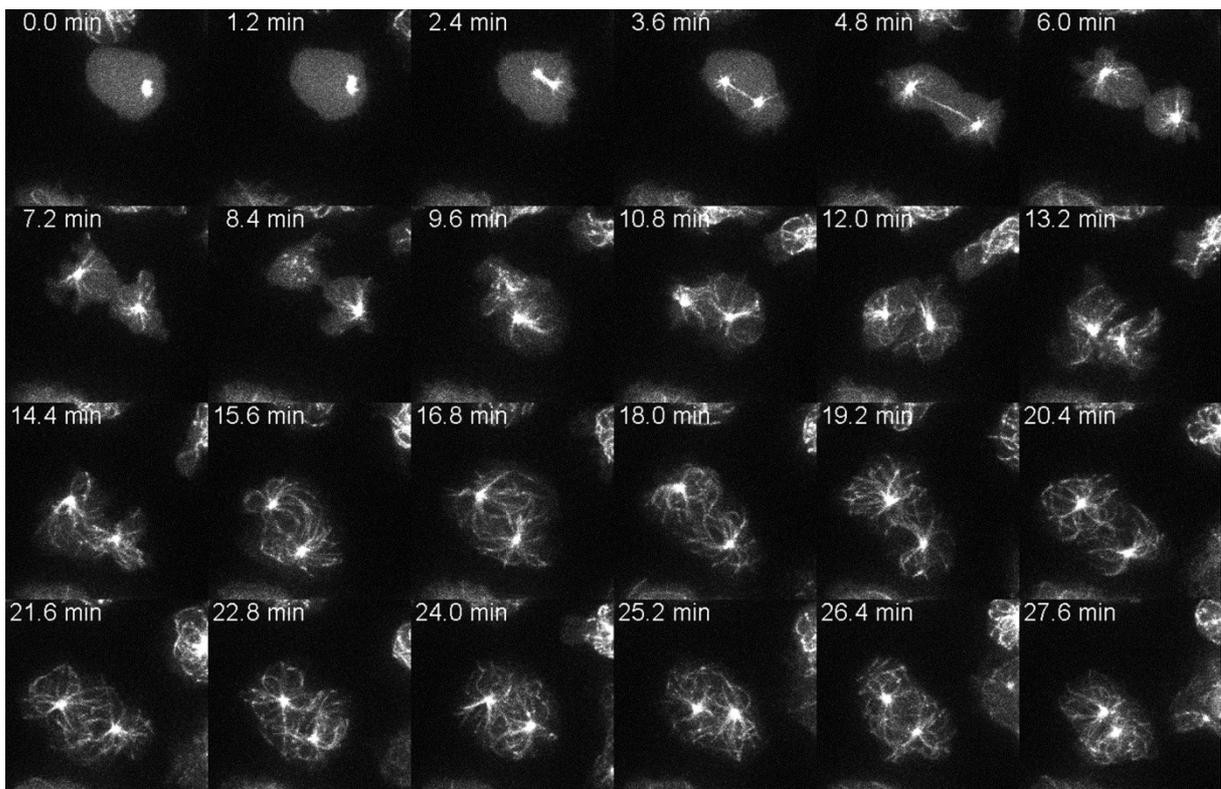


Abbildung 47: Fehlschlagen der Cytokinese bei lebenden GFP- $\alpha$ -Tubulin/CP91-RNAi-Zellen. Es entsteht ein Zelle mit vergrößertem Zellkern und 2 kernassoziierten Centrosomen. Die Aufnahmen erfolgten mit konfokaler-Spinning-Disk-Mikroskopie; Zeitraffer der Akquisition betrug 4 Stacks pro Minute (bei einer Bildrate von 10 fr/s); maximale Intensitätsprojektion von 7 Ebenen pro Bildstapel. (Video-Mitose6 auf CD im Anhang)

## Ergebnisse

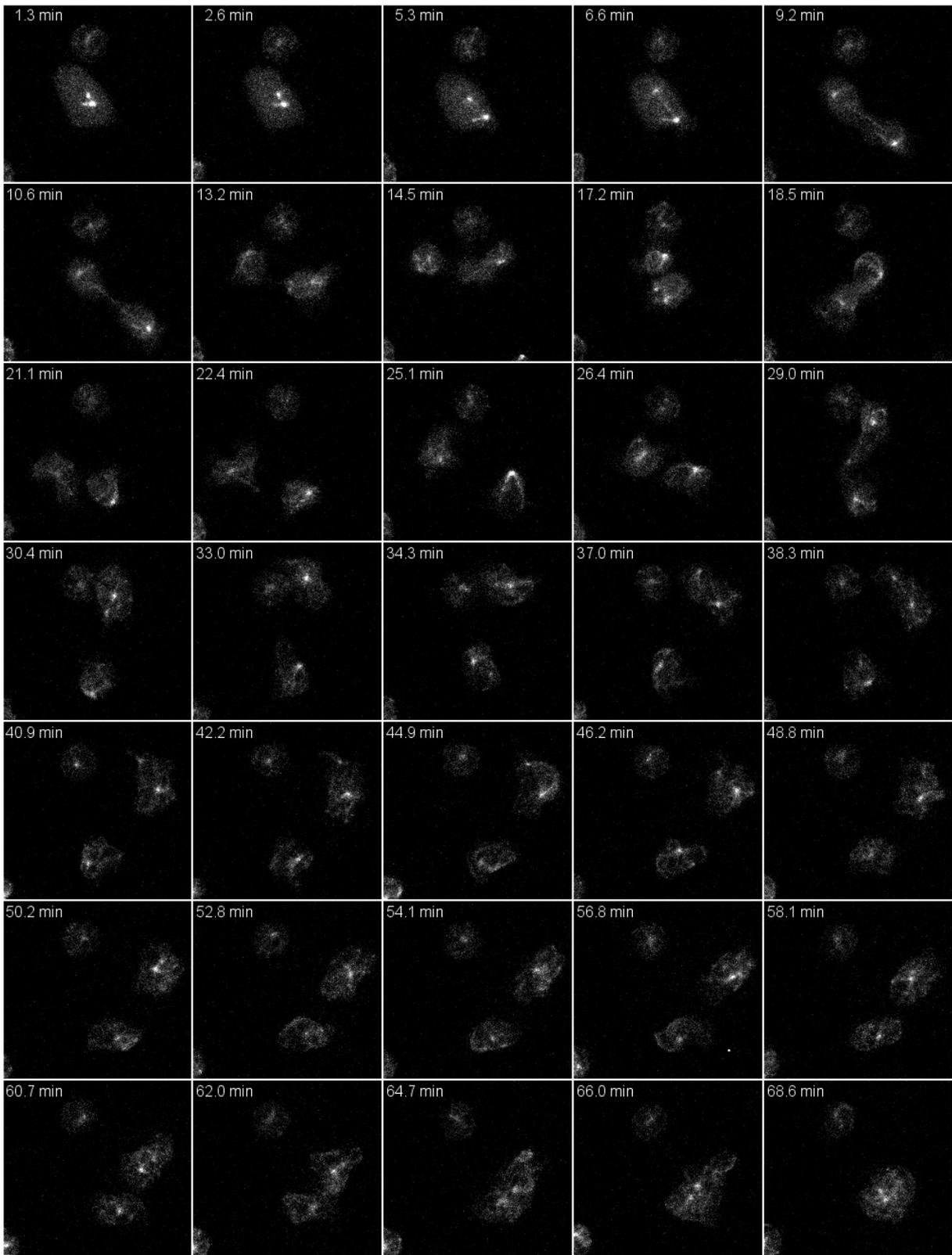


Abbildung 48: Fehlschlagen der Cytokinese bei lebenden GFP- $\alpha$ -Tubulin/CP91-RNAi-Zellen. Nach augenscheinlich erfolgreicher Cytokinese fusionieren die Tochterzellen wieder miteinander. Die Aufnahmen erfolgten mit konfokaler-Spinning-Disk-Mikroskopie; Zeitraffer der Akquisition betrug 4 Stacks pro Minute (bei einer Bildrate von 10 fr/s); maximale Intensitätsprojektion von 7 Ebenen pro Bildstapel. (Video-Mitose7 auf CD im Anhang)

## Ergebnisse

Die Bildreihe in Abbildung 48 zeigt nach dem Auflösen der Teilungsfurche eine scheinbar erfolgreiche Cytokinese. Die Tochterzellen bewegen sich zunächst separat, aber zu einem späteren Zeitpunkt fusionierten die Zellen wieder und bildeten eine multinukleare Zelle (Video-Mitose7 im CD Anhang). Falls nach Ausbildung der Spindel die Chromosomen bzw. DNA nicht separiert werden, aber die Cytokinese erfolgreich stattfindet, können auch Cytoplasten mit den überzähligen Centrosomen entstehen (Abbildung 46 A). Da die DNA in den RNAi-Stämmen nicht markiert war, konnte in der Lebendzellmikroskopie nicht eindeutig bestimmt werden, ob auch Cytoplasten entstanden sind. In immunfluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen konnten Zellen beobachtet werden, die durch lange interzelluläre „Brücken“ und einzelne Mikrotubulistränge verbunden waren (Abbildung 49 D, B, C). Teilweise konnten solche Verbindungen eine bis zu vierfache Länge des Zelldurchmessers haben.

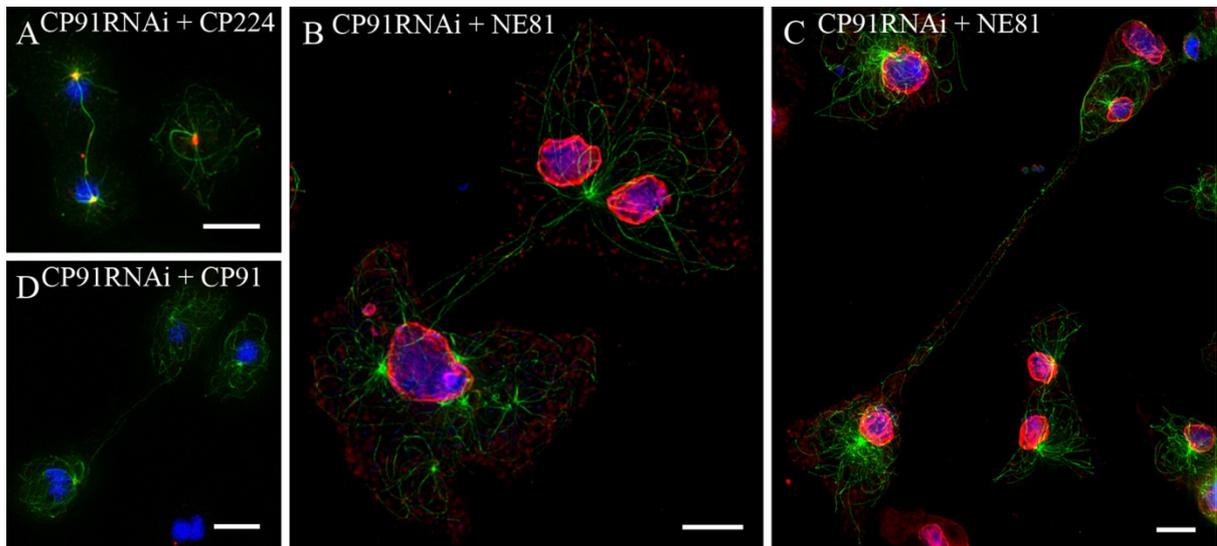


Abbildung 49: Nach fehlgeschlagener Cytokinese, Tochterzellen bleiben verbunden mit dünnen interzelluläre „Brücken“ (B, C, D). Dies konnte im CP91-RNAi oft beobachtet werden. Abbildung A zeigt eine Telophase und einen Cytoplasten. CP91-RNAi-/GFP- $\alpha$ -Tubulin-Zellen wurden im gleichen Verhältnis mit AX2 Zellen gemischt, mit Methanol fixiert, mit anti-CP224 (A) und anti-CP91 (D) bzw. Glutaraldehyd fixiert und mit anti-NE81 (B, C) rot angefärbt und die DNA mit DAPI (blau) gefärbt. Balken = 5  $\mu$ m.

## 3 Diskussion

### 3.1 CP91 ist ein Bestandteil der inneren Schicht der Core-Region

Die Ergebnisse der Lokalisationsstudien von GFP-CP91 und dem endogenen CP91 stehen in Übereinkunft mit der Lokalisation in der centrosomalen Core-Region. Diese repräsentiert die Verdopplungseinheit des *Dictyostelium* Centrosoms und kann in diesem vereinfachten Centrosomentypus analog zu Centriolen betrachtet werden. Die Abwesenheit des CP91 von den mitotischen Spindelpolen zu Beginn der Prometaphase bis zur Anaphase weist stark darauf hin, dass CP91 ein Bestandteil der zentralen Schicht der Core-Region ist. Diese zentrale Schicht verschwindet im Verlauf der Trennung der beiden äußeren Schichten in der Prometaphase. Somit könnte CP91 innerhalb der zentralen Schicht als Verknüpfung zwischen den beiden äußeren Schichten dienen.

### 3.2 Domänenanalyse, Regulation und Bindungsverhalten von CP91

CP91 lokalisiert zellzyklusabhängig am Centrosom. Die Dissoziation des CP91 während der Centrosomenverdopplung könnte durch Phosphorylierung mit Hilfe einer mitotischen Kinase ausgelöst werden. Für GFP-CP91 N-Terminus und Teile von GFP-CP91 C-Terminus, im folgenden Text fortan als GFP-CP91N und GFP-CP91C abgekürzt, konnte keine solche mitotische Regulierung beobachtet werden, denn sie verblieben während der gesamten Mitose an den Spindelpolen. Daher ist es wahrscheinlich, dass das hauptsächlich bestimmende Regulierungsereignis an der cc-Domäne erfolgt, welche bei GFP-CP91N und GFP-CP91C fehlt. Die cc-Domäne (AS 350-660) beinhaltet eine Konsensussequenz für eine *Polo-like*-Kinase (PLK) bei AS 633-639. PLKs regulieren centrosomale Proteine durch Phosphorylierung. Beispiele für intensiv untersuchte Kinasen sind die *Polo-like*-Kinase Plk4 in *Drosophila* und Mensch und ihr Homolog ZYG-1 in *C. elegans* (Andersen *et al.*, 2003; Kleylein Sohn *et al.*, 2007). Die Überexpression der Kinase verursacht überzählige Centriolen, während bei einer Verminderung der Plk4-Expression die Centriolenverdopplung scheitert (Bettencourt-Dias *et al.*, 2005; Rodrigues-Martins *et al.*, 2007; Cunha-Ferreira *et al.*, 2009). Die Regulierung der Centriolenbiogenese benötigt aber noch weitere Faktoren. Die centrosomalen Proteine Cep152 und Cep192 binden an Plk4, rekrutieren und regulieren die Kinase an die Centriolen (Fu *et al.*, 2015; Kim *et al.*, 2013). Interessanterweise interagieren die beiden Proteine im Wettstreit untereinander mit der Polo Box von Plk4 durch homologe N-terminale Sequenzen, welche Asparagin- und Glutamin-reiche Motive (N/Q) enthalten und damit die Plk4 vom Centrosom delokalisieren (Kim *et al.*, 2013). CP91 besitzt ebenfalls viele

N/Q-reiche Motive in den N-terminalen und C-terminalen Domänen. Es besteht somit die Möglichkeit, dass N/Q-reiche Core-Proteine, wie CP91, über N/Q-reiche Motive miteinander interagieren und auch an *Polo-like-Kinase* binden. In *Dictyostelium* wurden potentielle Orthologe von CEP192 und *Polo-like-Kinase* Plk identifiziert. Diese lokalisieren am Centrosom in der Interphase und an den Spindelpolen in der Metaphase und könnten bei der Centrosomenverdopplung in *Dictyostelium* eine große Rolle spielen (Schulz *et al.*, 2009b). Gräf *et al.* (2016, unpublizierte Daten) konnten mit Hilfe der BioID-Methode (Batsios *et al.*, 2016) eine Interaktion von Plk1 und CEP192 mit CP91 nachweisen. Das bestärkt die

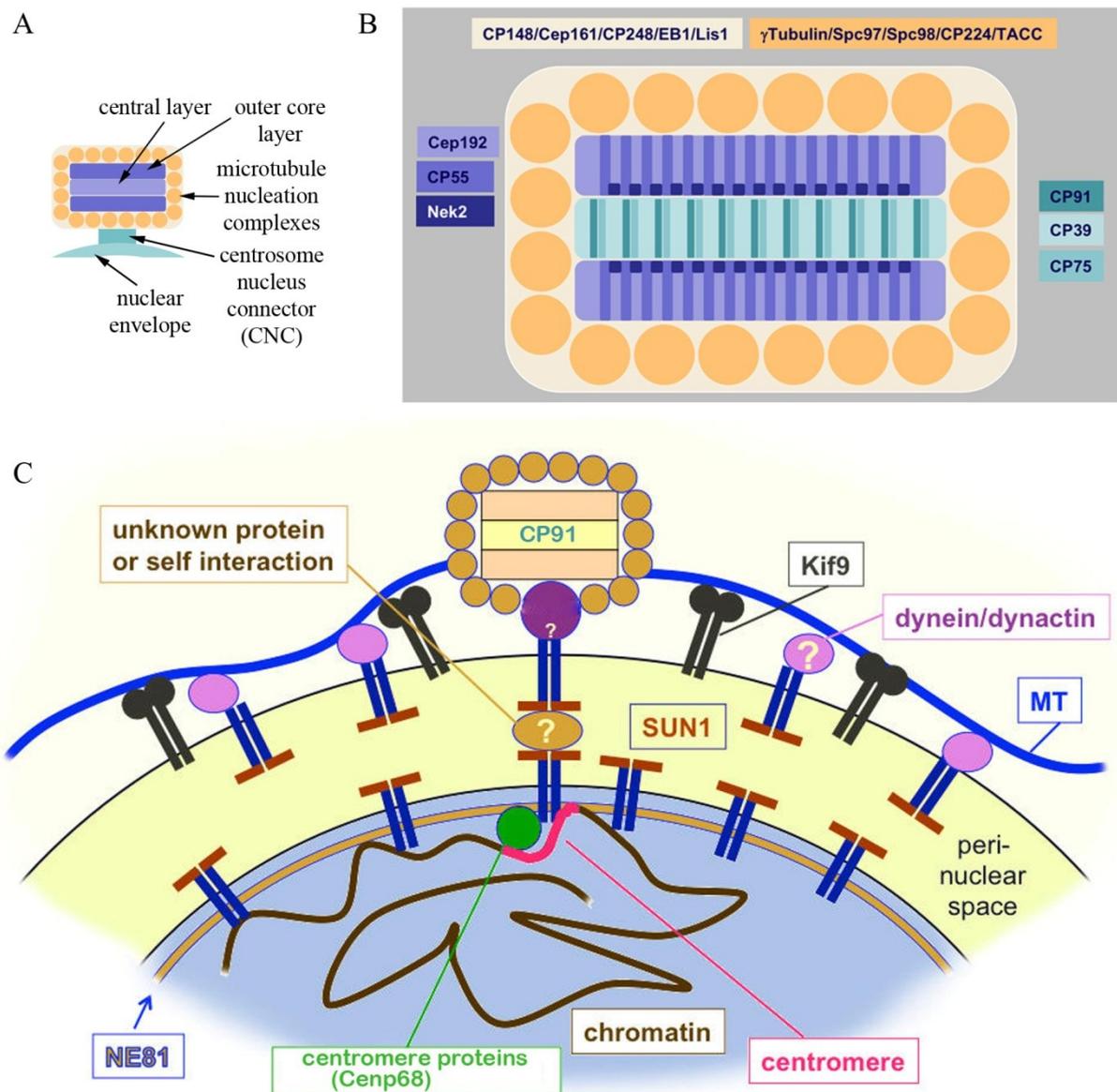


Abbildung 50: Aktueller Stand des Wissens. (A) Schema des *Dictyostelium* Centrosoms mit Legende. (B) Vergrößerte Darstellung des *Dictyostelium* Centrosoms mit den bekannten Komponenten der Corona und der geschichteten Core-Region. CP91 befindet sich in der zentralen Schicht der Core-Region. Weitere Details siehe Text. Abbildung A und B wurden von Prof. Dr. Ralph Gräf (2016) zur Verfügung gestellt. (B) Schema zur Centrosomen-Kern-Centromer Verbindung (CNC) in *Dictyostelium*. Sun1 und Kif9 spielen eine zentrale Rolle bei dieser Verbindung. Bisher noch unbekannte oder fehlende Interaktoren sind mit einem Fragezeichen gekennzeichnet. Modifiziert nach Schulz *et al.* 2009b.

Vermutung, dass Plk bei der Regulation von CP91 eine Rolle spielt. In CP91-RNAi Zellen konnte zudem eine Verminderung von CEP192 in der Immunfluoreszenz und mittels Western Blot nachgewiesen werden (Abbildung 36). Den aktuellen Stand des Wissens über die Verteilung der centrosomalen Proteine im *Dictyostelium* Centrosom gibt die Abbildung 50 B wieder. Neben CP91 besitzen auch andere centrosomale Proteine der zentralen Schicht, wie CP39 und C75 (unpublizierte Daten), sowie der äußeren Schicht, wie CP55 (Kuhnert *et al.*, 2012b), Konsensussequenzen für eine Regulation durch die PLK. Zusätzlich zu der Verminderung von CEP192 konnte auch eine Verminderung von CP39 und CP55 in der Immunfluoreszenz und Western Blot von CP91-RNAi Zellen nachgewiesen werden (Abbildung 35). Gräf *et al.* konnten hier wieder mit Hilfe der BioID-Methode Interaktionen von CP39 und CP55 mit CP91 nachweisen. Die Auswertung der BioID-Daten der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Gräf zeigte, dass alle Komponenten der Core-Region miteinander interagieren (unpublizierte Daten). Das lässt auf eine komplexe Interaktion schließen. Das Verhalten der GFP-Konstrukte in der Mitose und die nachgewiesene Bindung von CP91 und Plk1 deuten auf eine zumindest teilweise Regulierung durch die vorhergesagte Plk-Site am Ende der cc-Domäne hin. Der nächste experimentelle Schritt wäre die Bestimmung der Sequenz in welcher die Proteine CP39, CP75 und CP91 während der Centrosomenbiogenese auftreten. Das könnte in einer Doppelmutante mit Zweifarbenlabeling in lebenden Zellen untersucht werden.

Weitere Konsensussequenzen für eine Phosphorylierung von CP91 durch CDK1, Nek2 und Cks1, konnten durch ELM vorhergesagt werden (Dinkel *et al.*, 2014). Die Cyclin-abhängige Kinase 1 (CDK1) und die *NIMA-related* Kinase (Nek2) spielen eine wichtige Rolle bei der Regulation von Centrosomen in höheren Zellen und besitzen eine hohe Aktivität in der frühen Mitose (Wang *et al.*, 2014), also zum Zeitpunkt des Verschwindens der zentralen Schicht im *Dictyostelium* Centrosoms. CDK1 ist bei der Initiation der M-Phase und beim *Disengagement* von Mutter- und Tochtercentriolen vor der Centrosomenverdopplung beteiligt (Wang *et al.*, 2014). In *Dictyostelium* sind die Funktionen von CDK1 noch wenig untersucht. Mittels ELM wurden fünf CDK1-Erkennungssequenzen am N-Terminus und zwei am C-Terminus von CP91 vorhergesagt (Dinkel *et al.*, 2015). Das humane Nek2 ist bei der Bildung einer bipolaren Spindel sowie der Rekrutierung von centrosomalen Proteinen beteiligt (Fry *et al.*, 1998). Das Homolog in *Dictyostelium* DdNek2 lokalisiert am Centrosom und scheint in die MTOC-Assemblierung involviert zu sein (Gräf, 2002). Mittels ELM wurden sieben potentielle Nek2-Erkennungssequenzen vorhergesagt, sechs im N-Terminus und eine im C-Terminus von CP91 (Dinkel *et al.*, 2015). CP91 besitzt auch drei potentielle Phospho-

rylierungsstellen für Cks1 ([dictybase.org/gene/DDB\\_G0271642](http://dictybase.org/gene/DDB_G0271642)). Cks1 bindet die katalytische Untereinheit einer CDK und ist essential für ihre biologische Funktion. Zusätzlich kann eine Interaktion von Cks1 mit einem Cyklin-gebundenen CDK die Spezifität und Effektivität einer Phosphorylierung des Substrates erhöhen (Kõivomägi *et al.*, 2013). In *Dictyostelium* sind die Funktionen von Cks1 ebenfalls wenig untersucht. In diesem Zusammenhang ist anzumerken, dass ELM auch drei potentielle Cyklin-Bindungsstellen in CP91 vorhersagt. Somit besitzt CP91 die Voraussetzung einer Regulierung durch einen Cyklin-CDK-Cks1-Phosphorylierung. Calmodulin ist ein hochkonserviert vorkommendes  $\text{Ca}^{2+}$ -bindendes Protein, welches ein weites Spektrum an verschiedenen zellulären Prozessen wie Zellwachstum, Zellteilung, Vermehrung, Bewegung, Differenzierung und centrosomale Funktionen reguliert (Takuwa *et al.*, 1995; Li *et al.*, 1999; Chin and Means, 2000). Für die CP91 Proteinsequenz wurden auch vier Calmodulin-Bindungsstellen (CaM) vorhergesagt (Mruk *et al.*, 2014). Falls in *Dictyostelium* eine Bindung von CaM ein centrosomales Targeting bewirkt (Flory *et al.*, 2000), eröffnet sich ebenfalls eine mögliche Erklärung für das Bindungsverhalten der verschiedenen Domänen. In der N-terminalen Domäne befinden sich zwei vorhergesagte CaM-Bindungsstellen im Bereich von AS 252-275 und AS 73-98. Diese könnten eine starke centrosomale Bindung des N-Terminus vermitteln. Zudem wurden am Ende der cc-Domäne (AS 350-660), beim Übergang zur C-terminalen Domäne (AS 660-799), sich zwei überlappende CaM-Bindungsstellen (AS 624-668) vorhergesagt. Die unvollständigen CaM-Bindungsstellen am Ende der cc-Domäne und am Anfang der C-terminalen Domäne vermitteln vielleicht nur ein ungenügendes centrosomales Targeting. Das könnte möglicherweise die cytosolischen Cluster der cc-Domäne erklären und die geringe centrosomale Affinität der C-terminalen Domäne. Um genauere Aussagen treffen zu können, müsste man das Verhalten der cc-Domäne und C-terminalen Domäne jeweils ohne bzw. mit vollständigen CaM-Bindungsstellen untersuchen.

Die Verdopplung des Centrosoms ist einer Vielzahl an Kontrollprozessen unterworfen. Das soll gewährleisten, dass die Verdopplung nur ein Mal pro Zellzyklus stattfindet (Nigg and Stearns, 2011). Neben einer reversiblen Proteinphosphorylierung wie im Abschnitt zuvor beschrieben, kann eine Regulierung auch durch irreversible Proteindegradation erfolgen (Hershko *et al.*, 1998). Die irreversible Proteindegradation geschieht im Proteasom. Durch das Anhängen von Ubiquitin-Molekülen an das abzubauenende Protein wird der Abbauprozess induziert. Die Ubiquitinierung der Proteine erfolgt unter anderem durch APC/C (*anaphase-promoting complex/cyclosome*) und F-Box-Proteine (Pagan and Pagano, 2011). Diese zwei Ubiquitin-Ligasen sind an der Regulation einiger Proteine, die für die Centrosomen-

verdopplung von Bedeutung sind, beteiligt (Strnad *et al.*, 2007). Mittels ELM wurden vier potentielle Ubiquitinierungsites für das F-Box Protein FBW7 am Anfang des N-Terminus vorhergesagt. Des Weiteren sind zehn SPOP-SBC-Bindungs-Motive über die Sequenz von CP91 verteilt. Proteine mit diesem Motiv sind oft das Substrat einer BTB-Cul3 Ubiquitin Ligase (Zhuang *et al.*, 2009). Genaue Aussagen über potentielle regulatorische Funktionen von CDK1, DdNek2, Cks1, Cyclin und CaM bei CP91 sowie einer Ubiquitinierung von CP91 sind Spekulationen und können ohne weitere Daten, aus Punktmutationen von funktionellen Bereichen, noch nicht getroffen werden.

### 3.3 CP91 beeinflusst die Stabilität der Centrosom-Zellkern-Centromer-Verbindung

Proteine mit SUN-Domänen sind in Eukaryoten gut konserviert und beteiligen sich an der Verbindung, welche die innere und äußere Kernmembran miteinander verknüpfen (Starr und Fridolfson, 2010). Das führt zur Stabilisierung der Kernmembran und bietet eine physikalische Verbindung die cytoplasmatische und nukleäre Aktivitäten miteinander koppelt. In der Interphase von Wildtyp *Dictyostelium* Zellen lokalisiert Sun1 konzentriert in der pericentrosomalen Region des Zellkerns (Schulz *et al.*, 2009; Tikhonenko *et al.*, 2012). Im CP91-RNAi ist Sun1 gleichmäßiger über die Kernhülle verteilt, was auf eine gestörte Centrosom-Zellkern-Centromer-Verbindung (CNC) hinweist. Falls diese Verbindung gestört ist, könnten über das Mikrotubuli-Array agierende kortikale oder cytosolische Kräfte das Centrosom vom Zellkern wegziehen. Bei der Auswertung von kernassoziierten Centrosomen konnte bei den GFP-Konstrukten ein leicht erhöhter Anteil an Kernen ohne assoziierte Centrosomen beobachtet werden (2,1 bis 3,3% der untersuchten Kerne). Beim CP91-RNAi waren es bei einem Klon 8,8% der Kerne, welche keine assoziierten Centrosomen hatten. In den Untersuchungen wurden alle Centrosomen mit einem Abstand von 2µm oder weniger als „noch“ kernassoziiert deklariert. Der Abstand in wildtypischen *Dictyostelium* Zellen liegt aber normalerweise nahe 1µm (Tikhonenko *et al.* 2009). Es zeigte sich somit oft ein vergrößerter Centrosom-Kern Abstand oder sogar ein Verlust der Centrosom-Zellkern-Verbindung. Bis jetzt sind aber keine Interaktionspartner zwischen Proteinen der centrosomalen Core-Region und Sun1 bekannt. Man könnte daher vermuten, dass auch keine direkte Interaktion zwischen CP91 und Sun1 stattfindet, sondern ein weiteres Protein an der Vermittlung einer Interaktion beteiligt ist. Kuhnert *et al.* (2012b) konnte zeigen, dass CP148 für die Aufrechterhaltung einer stabilen CNC-Verbindung benötigt wird. Damit wurde gezeigt, dass diese Verbindung nicht über die centrosomale Core-Region, sondern durch eine Interaktion von Corona-Proteinen mit Sun1 oder auch anderen Linkern erfolgt

kann. Es konnten aber keine Auffälligkeiten von CP148 in CP91-RNAi Zellen beobachtet werden. Im Western Blot wurden zur Bestimmung der Proteinmenge die Coronamarker CP148 und CP224 als Ladekontrolle verwendet, da sich ihr Gehalt im Wildtyp und im RNAi nicht veränderte (Abbildung 35 und 36). Auch in der Immunfluoreszenz zeigte sich bei CP91-RNAi Zellen keine Verminderung der CP148 Fluoreszenz in Interphasezellen (nicht gezeigt). CP148 wurde in der Mitose von CP91-RNAi Zellen nicht untersucht, da es zu Beginn der Mitose ebenfalls von den Centrosomen abdissoziiert oder abgebaut wird.

Ein weiterer Hinweis auf einen Defekt in der CNC-Verbindung sind die teilweise ungeclusterten Centromere in GFP-CP91 und CP91-RNAi Zellen während der Mitose. Die Centromere in Wildtypzellen liegen während der G2-Phase bzw. der gesamten Mitose geclustert vor. Sie stehen über die Kernhülle hinweg zu jeder Zeit mit dem Centrosom in Verbindung. (Schulz *et al.*, 2009; Kaller, Euteneuer and Nellen, 2006). Ist diese CNC-Verbindung gestört, können die Centromere ihre enge Verknüpfung mit dem Centrosom oder auch untereinander verlieren. Wegen seiner zellzyklusunabhängigen Lokalisation an den Centromeren ist Cenp68 ein praktischer Marker für diese Strukturen. Die Funktion von Cenp68 ist aber noch weitgehend unbekannt. In Interphasezellen von CP91-RNAi Zellen konnten keine Cenp68 Signale an den Centromeren beobachtet werden. Das hat vorerst keine so große Bedeutung. Es konnte gezeigt werden, dass eine Cenp68 Null-Mutation zu keinem ersichtlichen Phänotyp führt, also auch die Clusterung der Centromere und damit die Verteilung der Chromosomen nicht beeinträchtigt wird (Samereier *et al.* 2011). In mitotischen Zellen hingegen war das Cenp68 Signal an den Centromeren vorhanden. Es zeigten sich jedoch Beeinträchtigungen bei der Clusterung der Centromere in der Mitose, was wahrscheinlich ein sekundärer Effekt einer gestörten CNC-Verbindung ist.

Eine bestehende Verbindung des Centrosoms mit dem Zellkern ist in *Dictyostelium* keine Voraussetzung für den Eintritt in die Mitose oder die Centrosomenverdopplung. Sie wird aber benötigt, damit die Zelle sich zur Zellteilung „verpflichtet“, eine Spindel aufbaut, und die Centrosomenreduplikationsprozesse beschränkt. Leo *et al.* (2012) konnte in *Dictyostelium* zeigen, dass mitotische Zellkerne ohne integrierte Centrosomen eine umfassende negative Kontrolle über den Fortschritt der Mitose ausüben. In multinukleären *Dictyostelium* Zellen (Syncytia) verlaufen die Mitosephasen normalerweise synchron (Neujahr *et al.*, 1998; Leo *et al.*, 2012). Multinukleäre GFP-CP91 Zellen zeigten aber auch vereinzelt asynchrone Mitosephasen (Abbildung 11). Centrosomfreie Kerne könnten einen dominanten Effekt haben und somit den Fortschritt der Mitose von Kernen mit Centrosomen verzögern oder beeinflussen. Eine Erklärung dafür könnte ein frei diffundierbares „Warte“-Signal des

Spindelcheckpoints (SAC) aus einem centrosomfreien Kern sein, welches global den Fortschritt der Mitose aller anderen Kerne im Cytoplasma der Zelle beeinflusst.

Wildtyp-Zellen brauchen für eine vollständige Mitose ungefähr 15 Minuten (Leo *et al.*, 2012). CP91-RNAi Mutanten zeigten bei Lebendaufnahmen im Vergleich zu Wildtyp-Zellen oft längere Mitosen. Es konnten auch sehr oft Zellen in langen Prophase-ähnlichen Zuständen oder im Prometaphasearrest beobachtet werden. In diesen Fällen könnte eine fehlerhafte Verbindung des Centrosoms zum Zellkern den SAC aktiv halten und den Ablauf der Mitose verzögern (Musacchio und Salmon, 2007). Diese Verzögerung liefert ein Zeitfenster für cytosolische Centrosomen, durch Brownsche Bewegung, einen Centrosom-freien Kern zu finden und zu binden. Nach erfolgreicher Bindung kann die Mitose fortgesetzt werden. Obwohl der Checkpoint formell die Verbindung der Chromosomen mit der Spindel überwacht, wird er wahrscheinlich auch durch die centrosomale Verbindung zum Zellkern und die Belegung des Zellkerns mit Centrosomen beeinflusst.

### **3.4 Die Wege zur Vervielfältigung der Centrosomen**

Interessanterweise zeigen GFP-CP91, GFP-CP91N, GFP-CP91cc und CP91-RNAi Zellen überzählige MTOCs. GFP-CP91C zeigte in allen untersuchten Bereichen einen ähnlichen Phänotyp, nur die Anzahl der MTOCs konnte nicht genau bestimmt werden. Im Folgenden werden mögliche Mechanismen zur Entstehung der überzähligen MTOCs in diesen Stämmen diskutiert. Isolierte Kerne mit daran gebundenen Centrosomen aller vier Stämme besitzen eine deutlich reduzierte Menge an endogenem CP91 gegenüber der Kontrolle. Der mutante Phänotyp könnte dadurch begründet sein, dass alle GFP-Fusionsproteine nicht voll funktionsfähig und außerstande sind das endogene Protein zu ersetzen, welches in zu geringer Menge vorliegt, aber für den Zusammenhalt der beiden äußeren Schichten der Kernstruktur benötigt wird. Die Vermutung wird auch durch eine gewisse Korrelation zwischen der Verminderung des endogenen CP91 und der Ausprägungsstärke der Defekte bestätigt. Zeigten die GFP-Konstrukte mit 30 bis 60% des endogenen CP91 schon ausgeprägte mutante Phänotypen, waren CP91-RNAi Mutanten, mit nur 15% endogenem CP91, durch schwerste Defekte und extreme mutante Phänotypen gekennzeichnet. Bei dem Versuch eine CP91-Knockout Mutante herzustellen konnten keine Mutanten selektiert werden. Eine Ursache dafür könnte eine essentielle Funktion des CP91 sein, was bis auf CP55 (Kuhnert *et al.*, 2012) bisher für alle untersuchten integralen centrosomalen Proteine gilt. In einem haploiden Organismus wie *Dictyostelium* wirkt ein Knockout solcher Proteine daher meist letal und macht die Selektion eines lebensfähigen Knockout-Stammes unmöglich.

In dem Fall von GFP-CP91N könnte das Fehlen der cc-Domäne nicht nur die Dissoziation der Fusionsproteine von den Spindelpolen zu Beginn der Mitose verhindern, sondern auch eine CP91 vermittelte Anhaftung zwischen den beiden äußeren Schichten beeinträchtigen. Auf diese Weise könnte GFP-CP91N eine frühzeitige Centrosomenspaltung herbeiführen und nach der Trennung der beiden äußeren Schichten an diesen gebunden bleiben. Vorzeitig geteilte Centrosomen können anschließend ausreifen und als funktionelle Centrosomen agieren. Die Destabilisierung des Zusammenhalts der beiden äußeren Schichten, durch den Mangel an funktionsfähigem CP91 zwischen beiden Schichten, könnte nach dem Faltungsprozess der mitotischen Centrosomen in der Telophase auch zu einem Zerfall des noch in Bildung befindlichen neuen Centrosoms in der späten Mitose führen und so den Phänotyp der überzähligen Centrosomen in CP91-RNAi Zellen ebenfalls erklären. Da alle Stämme mit veränderter CP91 Expression schwach wachsen, verfügen sie nur über einen geringen Anteil an mitotischen Zellen. Es gibt noch kein gutes Protokoll für eine ordentliche Synchronisierung von *Dictyostelium* Zellen in der M-Phase. Deshalb konnten nur vereinzelte Beispiele aufgenommen werden, welche die Entstehung von überzähligen Centrosomen in lebenden Zellen zeigten. In GFP-CP91 Zellen konnte beobachtet werden, dass zusätzliche, kernassoziierte Centrosomen erst spät in der Mitose entstehen. Genau dann, wenn die Plaque-ähnlichen Spindelpole sich einem Faltungsprozess unterziehen, um die neu geschichtete Kernstruktur zu bilden (siehe Einleitung). Ein Mangel der vollen Funktionsfähigkeit des GFP-Fusionsproteins könnte eine Destabilisierung des Plaques verursachen, was wiederum eine Anfälligkeit zur Fragmentation zur Folge hat.

Andere Szenarien für die Bildung von überzähligen Centrosomen sind auch plausibel. Kernassoziierte überzählige Centrosomen können nach einer fehlerhaften Chromosomen-segregation entstehen. Der Spindelcheckpoint (SAC) in *Dictyostelium* wird nach einer verlängerten M-Phase inaktiviert, auch wenn keine Chromosomensegregation stattgefunden hat (Ma *et al.*, 1999; Leo *et al.*, 2012). Solche Zellen verlassen die Mitose mit verdoppelten, kernassoziierten Centrosomen und einer erhöhten Ploidie. Dieses Szenario konnte bei GFP-CP91 Zellen aber nicht direkt beobachtet werden, da die Centrosomen bzw. Spindelpole von der Prometaphase bis zur Anaphase keine Fluoreszenz zeigten. Wie in Abschnitt 3.3 beschrieben, ist die bestehende Verbindung des Centrosoms mit dem Zellkern für das Fortschreiten der Mitose und für eine Begrenzung von Centrosomreduplikationsprozessen wichtig. Leo *et al.* (2012) konnte zeigen, dass mitotische Zellkerne ohne integrierte Centrosomen eine umfassende negative Kontrolle über den Fortschritt der Mitose ausüben und es einen Endoduplikationsmechanismus geben muss, der, wenn ausgelöst, überzählige Centro-

somen erzeugt. Einzelne Centrosomen können sich während der Prometaphase im Cytosol, auch ohne Kernbindung, duplizieren und trennen (Leo *et al.*, 2012). Dieser Mechanismus könnte eine Art Failsafe sein um die Mitose zu „retten“. Um aus dem Prometaphasearrest herauszukommen versucht die Zelle zusätzliche Centrosomen zu generieren und damit die centrosomenfreien Kerne, welche die Ursache für den Arrest sind, zu besetzen. Im GFP-CP91 konnte das jedoch nicht beobachtet werden. Wie vorher beschrieben, entstanden zusätzliche, kernassoziierte Centrosomen erst spät in der Mitose, nämlich während der Anaphase am Zellkern. Ein ähnliches Verhalten konnte bei einer Überexpression von CP224, einem Coronaprotein, beobachtet werden (Gräf *et al.* 2003). Eine Erklärung könnte sein, dass ein sehr schwach gebundenes Centrosom am Zellkern den SAC schon inaktivieren könnte. Es wird vielleicht ein Schwellenwert (mechanische Spannung oder Signalkaskade) für die CNC-Verbindung unterschritten, welche ein Mitosearrest auslöst und einen sich anschließenden Duplikationsmechanismus aktiviert. Dann würde am Kern ein zusätzliches kernassoziiertes Centrosom in der Prometaphase entstehen. Falls die kernassoziierten Centrosomen nach der Verdopplung noch ein gewisses Maß an Affinität besitzen, bleiben sie aneinander haften bis die Bildung der astralen Mikrotubuli die beiden Tochtercentrosomen voneinander trennt. Ein Indiz dafür sind die hantelförmigen Centrosomensignale in der Metaphase von GFP-CP91 Zellen (Abbildung 10 A). Falls die Affinität der Tochtercentrosomen untereinander für eine erfolgreiche Trennung während der Anaphase zu stark ist, könnten sich größere Centrosomeinheiten bilden, wie bei Interphasezellen in Abbildung 10 B vermuten lässt. Dort sind in einem vergrößerten Coronasignal (CP224) zwei GFP-CP91 Signale eingebettet. Zudem könnten zwei Centrosomen miteinander verschmelzen. Dieser Prozess wird Centrosomenkoaleszenz genannt und wurde von Gräf *et al.* (2013) bei *Dictyostelium* beschrieben. Die Mitosen in Abbildung 20 und 21 könnte so eine Centrosomenkoaleszenz darstellen und die oft vergrößerten centrosomalen Signale in GFP-CP91 (Abbildung 14) und CP91-RNAi (Abbildung 41) erklären. Gleichzeitig würde die Centrosomenkoaleszenz in *Dictyostelium* einen Mechanismus darstellen um das normale 1:1 Centrosom-Kern Verhältnis wieder herzustellen und multipolare Spindeln in der Mitose zu verhindern. Ein weiterer Mechanismus ist die Absonderung von überzähligen Centrosomen in Cytoplasten (= kernfreie Zellfragmente), ebenfalls von Gräf *et al.* beschrieben. Ein erhöhter Anteil an Cytoplasten konnte bei allen GFP-Konstrukten (2,9 bis 6,2 % der Zellen) und im CP91-RNAi (9,3 bis 13,3 %) nachgewiesen werden. Da Cytoplasten auf Grund des fehlenden Zellkerns eine nur kurze Lebensspanne haben, findet dieses Ereignis womöglich noch häufiger statt als es die Prozentsätze vermuten lassen. Die Bildung von Cytoplasten ist mit der Cytokinese

koordiniert, aber es kann nicht ausgeschlossen werden, dass Cytoplasten in der Interphase durch *Cytofission* (Zellsplaltung) entstehen (Gräf *et al.* 2003).

Überzählige Centrosomen könnten aber auch *de novo* (lateinisch „von Neuem“) im Cytosol entstehen, wie in bestimmten Tierzellen beschrieben (Klos Dehring, 2013; Eckerdt *et al.*, 2008). In diesem Zusammenhang könnte überexprimiertes GFP-CP91 oder GFP-CP91N als Kristallisationskeim für die Anreicherung von centrosomalen Material dienen, ähnlich wie bei einer Überexpression der GFP-Nek2 Kinase in *Dictyostelium* (Gräf *et al.*, 2002).

### **3.5 Kernassoziierte überzählige Centrosomen als Ursache für erhöhte Ploidie**

Die Tatsache, dass eine Vervielfältigung der Centrosomen auch einen Defekt in der Chromosomensegregation verursacht und somit zu einem Versagen der Kernteilung führt, ist bemerkenswert, da Centrosomenamplifikation bei *Dictyostelium* nicht zwangsläufig mit Fehlern in der Chromosomensegregation einher geht. Dies wurde am Beispiel in einer CP224 Mutante gezeigt (Gräf *et al.*, 2003). Da es bei *Dictyostelium* keinen Zusammenbruch der Kernhülle während der Mitose gibt, haben freie cytosolische Centrosomen keinen Zugang zu Chromosomen und können daher auch nicht mit deren korrekter Segregation auf Tochterkerne interferieren. Kernassoziierte Centrosomen hingegen können sich an der Spindelorganisation beteiligen und bilden zusätzliche Spindelpole. Dies führt zu multipolaren Spindeln (Leo *et al.*, 2012). Überzählige kernassoziierte Centrosomen können auf verschiedenen Wegen entstehen: (1) sie könnten vor der Mitose durch zufällige Anheftung von überzähligen cytosolischen Centrosomen an den Kern entstehen, (2) sie könnten aus einer Vervielfältigung von kernassoziierten Centrosomen aufgrund einer Fehlregulation hervorgehen, (3) sie könnten aus dem Zerfall von kernassoziierten Centrosomen entspringen oder (4) sie könnten nach vor-schriftsmäßiger Centrosomenverdopplung aus einer im Anschluss fehlerhaften Kernteilung resultieren, was wegen des nicht strikten SAC (s.o.) leicht zu erklären ist.

Alle Szenarien führen zu einer multipolaren Spindel, da jedes kernassoziierte Centrosom an der Spindelorganisation und Bildung der Kinetochore-Mikrotubuli beteiligt ist, welche die Spindelpole und die Kinetochore verbinden. Wie oben erwähnt, können *Dictyostelium* Zellen aus der Mitose austreten und unabhängig von einer erfolgreichen Chromosomensegregation in die Interphase wieder eintreten. Eine fehlerhafte Spindel resultiert somit entweder in großen Zellkernen mit erhöhter Ploidie, zum Beispiel beim Ausbleiben der Kernteilung, oder in aneuploiden Zellkernen durch Fehlverteilung der Chromosomen. Das Auftreten von sehr kleinen als auch riesigen Kernen in CP91 Mutanten (alle GFP-Konstrukte und CP91-RNAi) unterstützt beide Szenarien. Das Auftreten von sehr großen Zellen im CP91-RNAi Stamm ist

sicherlich nicht nur auf fehlerhafte Zellteilungen nach ausgebliebenen Kernteilungen zurück zu führen. Ursache könnte auch ein Defekt in der Abtrennung von Tochterzellen während der Zytokinese sein.

### 3.6 CP91 spielt eine wichtige Rolle bei der Cytokinese

Die Kernteilungsspindel definiert während der Cytokinese den Ort der Teilungsfurche (Rappaport, 1986). Aber auch Centrosomen spielen eine wichtige Rolle bei der Vollendung der Cytokinese. Das chirurgische Entfernen von Centrosomen in Säugern führt zu einem Defekt in der Cytokinese, ohne die Spindelbildung und die Chromosomensegregation zu beeinflussen (Hinchcliffe *et al.*, 2001; Khodjakov und Rieder, 2001). Eine Verminderung centrosomaler Proteine durch RNAi, wie  $\gamma$ -Tubulin, Centrin, oder Centriolin resultierte in beständigen interzellulären „Brücken“ zwischen sich teilenden Zellen oder zur Verschmelzung entstehender Tochterzellen. Das führte zu einer Erzeugung von Syncytia, zweikernigen oder mehrkernigen Zellen (Shu *et al.*, 1995; Salisbury *et al.*, 2002; Gromley *et al.*, 2003; Fabbro *et al.*, 2005; Zou *et al.*, 2005). Die gleichen Beobachtungen konnte man bei der Verminderung von CP91 durch RNAi in *Dictyostelium* auch machen. Ähnliche Ergebnisse kann man auch durch Verdrängung eines centrosomalen Proteins durch eine Überexpression mit einer dominant-negativen Form dieses Proteins bekommen (Keryer *et al.*, 2003). Den gleichen Mechanismus könnte man bei der Überexpression mit den GFP-CP91 Konstrukten vermuten. Eine Überexpression von GFP-CP91 Konstrukten führt zu einer Verminderung oder auch Verdrängung des endogenen CP91 und somit zum teilweisen Funktionsverlust des Proteins bei der Centrosomenverdopplung und Cytokinese. Eine Verminderung des endogenen CP91 konnte bei allen GFP-CP91 Konstrukten im Western Blot bestätigt werden (Abbildung 24). In tierischen Zellen ist eine Abtrennung der Tochterzellen abhängig von centrosomalen Proteinen wie Centriolin (Gromley *et al.*, 2005) und Cep55 (Bastos und Barr, 2010; Lee *et al.*, 2008). Diese vermitteln die Organisation des Exocysten- und des ESCRT-Komplexes, welche für den letzten Schritt in der Zytokinese benötigt werden (Agromayor *et al.*, 2013). In ähnlicher Weise könnte CP91 für die Zytokinese und Abtrennung der Tochterzellen in *Dictyostelium* benötigt werden. Diese Vermutung wird durch die Beobachtung gestützt, dass GFP-CP91N, während der späten Anaphase und Telophase, schwach in der Midbody-Region der zentralen Spindel lokalisiert (Pfeil in Abbildung 25). Als ein centrosomales Protein der Kernstruktur, welches sich vor der Bildung der zentralen Spindel und des Midbody von mitotischen Centrosomen ablöst, wäre es ein geeigneter Kandidat für eine Rolle in der Abtrennung.

Wie in Abschnitt 3.2 beschrieben besitzt CP91 vier potentielle CaM-Bindungsstellen. CaM spielt zudem eine etablierte Rolle im Prozess der Cytokinese (Moser *et al.*, 1997; Lippincott and Li, 1998; Osman and Cerione, 1998). Falls CP91 und CaM interagieren, könnte eine Fehlregulation von CP91 durch CaM auch die beobachtbaren Störungen in der Cytokinese bei CP91-Mutanten erklären. Neben CaM gibt es aber noch eine weitere Gruppe von Ca<sup>2+</sup>-bindenden Proteinen, welche Einfluss auf die Cytokinese haben, die Centrine (s.o.). Centrine teilen signifikante Sequenzübereinstimmung mit CaM auf dem Aminosäurelevel und befindet sich centrosomal konzentriert am distalen Ende der Centriolen. (Salisbury *et al.*, 1995, 2002; Paoletti *et al.*, 1996). *Dictyostelium* besitzt zwei Centrine, CenA (DdCrp) und CenB (Daughterer *et al.*, 2001; Mana-Capelli *et al.*, 2009). Das in diesem Zusammenhang interessante CenB lokalisiert im Zellkern von Interphasezellen und verschwindet zu Beginn der Mitose. Ein Knockout von CenB führt neben einer anomalen Kernstruktur zum Verlust einer korrekten Centrosom-Kern Verankerung. Am Centrosom führt ein Verlust von CenB zu Defekten in der Organisation und Morphologie des MTOC, zu überzähligen Centrosomen und Centrosomen-ähnlichen Körpern. Es beteiligt sich somit an der Verdopplung der Centrosomen. Eine Verminderung von CP91 durch RNAi zeigte einen ähnlichen Phänotyp wie ein Knockout von CenB. Es wäre vielleicht möglich dass CenB und CP91 ebenfalls interagieren. Ein Beispiel für eine solche Interaktion von CaM, Centrin und einem weiteren centrosomalen Protein ist das CP110 (Tsang *et al.*, 2006). CP110 wurde in einem Screening von zellzyklusabhängigen CDK Substraten identifiziert und spielt eine wichtige Rolle bei der Verdopplung und Trennung von Centrosomen im Menschen (Chen *et al.*, 2002). Es kontrolliert die Reifung der Muttercentriole in der Cilienbiogenese bei Mäusen und übt ebenfalls eine regulatorische Funktion beim Aufbau von Centriolen in *Drosophila* aus (Yadav *et al.*, 2016; Franz *et al.*, 2013). Tsang *et al.* konnten zeigen dass CP110 mit CaM und Centrin direkt interagiert und zusammenwirken um die Cytokinese sowie die Genomstabilität von Zellen zu reguliert. Ob eine Interaktion von CP91 mit CaM und Centrin besteht und diese Interaktion sich auf andere Proteine der centrosomalen Core-Region auswirken, müssen weitere Experimente klären.

Eine interessante Beobachtung zu Abschluss. Adhärenz wachsende CP91-RNAi Zellen zeigten eine stark verminderte Adhäsion am Substrat (Zellkulturflasche und Deckgläschen). Während Wildtyp-Zellen gut am Untergrund hafteten, lösten sich CP91-RNAi Zellen sehr leicht, oft schon bei leichtesten Erschütterungen, vom Untergrund. Ein Teil der Zellen schwamm sogar auf und verlor den Kontakt zum Untergrund, auch ohne jegliche Erschütterungen. In tierischen Zellen können Bedingungen, wie Änderungen in der Zelladhäsion, sich ungünstig

auf die Bewegung der Centriolen/MTOCs auswirken und somit die Cytokinese verzögern (Doxsey 2001). In *Dictyostelium* hat eine starke Verminderung von CP91 vielleicht auch Auswirkungen auf die Substratanheftung an den Untergrund. Dass centrosomale Proteine auch an centrosomenfernen Prozessen beteiligt sein können, zeigt das Beispiel von CP55. Als Protein der Core-Region besitzt CP55 auch einen Einfluss auf die Ernährung der Zellen durch Phagozytose, indem es an der Reassemblierung der dispergierten Golgi-Vesikel nach der Mitose beteiligt ist.

### 3.7 Schlussfolgerungen

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass CP91 in *Dictyostelium* für die Integrität und Biogenese von Centrosomen, die Chromosomensegregation, die Stabilität der Centrosom-Zellkern-Centromer-Verbindung und den erfolgreichen Ablauf der Cytokinese von Bedeutung ist. Sowohl die Verminderung von CP91 durch RNAi als auch die Überexpression von GFP-Fusionsprotein bringen überzählige Centrosomen hervor, welche oft kernassoziiert sind und die Chromosomensegregation stören. Dabei ist die Erscheinung dieser Effekte wahrscheinlich dadurch begründet, dass alle GFP-Fusionsproteine nicht voll funktionsfähig und außerstande sind das endogene Protein zu ersetzen oder es vielleicht sogar verdrängen. CP91 interagiert mit anderen centrosomalen Komponenten wie CP39, CP55 und CEP192 und hat einen Einfluss auf die Centromere. Das Verhalten von GFP-CP91 in FRAP-Experimenten, die zellzyklusabhängige Lokalisation während der Mitose, zusammen mit dem Einfluss auf die Komponenten der centrosomalen Core-Region, deutet auf eine essentielle Funktion für den Strukturerthalt im *Dictyostelium* Centrosom hin. Zusätzlich könnte CP91 als zentraler Rekrutierungsfaktor und auch als Linker zwischen den äußeren Schichten der Core-Region dienen. Neben einer Vielzahl an Interaktionspartnern, bietet CP91 auch eine Fülle an potentiellen Regulationsmöglichkeiten, welche in zukünftigen Experimenten detailliert untersucht werden können. CP91 nimmt in *Dictyostelium* somit eine zentrale Schlüsselrolle für die Erforschung und Entschlüsselung der Prozesse zur Centrosomenbiogenese und Cytokinese ein.

## 4 Material und Methoden

### 4.1 Reagenzien, Antikörper und andere Materialien

#### 4.1.1 Chemikalien, Reagenzien, Antibiotika

Soweit nicht anders ausgewiesen, stammten die verwendeten Chemikalien und Reagenzien von Carl Roth (Karlsruhe), Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), Biomol (Hamburg) und AppliChem GmbH (Darmstadt) und hatten den Reinheitsgrad „p.a.“.

##### Antibiotika

Ampicillin	Carl Roth (Karlsruhe)
Blastizidin S	Carl Roth (Karlsruhe)
Geneticin (G418)	Carl Roth (Karlsruhe)
Penicillin/Streptomycin	PAA GmbH (Pasching, Austria)

#### 4.1.2 Antikörper

##### Primäre Antikörper

Anti-DdCP91, Kaninchen Antiserum	diese Arbeit
Anti-DdCP39, Kaninchen Antiserum	Meyer, nicht veröffentlicht
Anti-DdCP55, Kaninchen Antiserum	Kuhnert <i>et al.</i> , 2012
Anti-DdCenp68, Kaninchen Antiserum	Schulz <i>et al.</i> , 2009
Anti-DdCP148, Kaninchen Antiserum	Kuhnert <i>et al.</i> , 2012
Anti-DdCEP192, Kaninchen Antiserum	Schulz <i>et al.</i> , 2009
Anti-DdCP224, mAB 2/165	Gräf <i>et al.</i> , 1999
Anti-GFP, Kaninchen Antiserum	Chemicon (Billerica, MA, USA)
Anti-MBP, Kaninchen Antiserum	Gräf, 2001b
Anti-Tubulin, mAB YL1/2	Chemicon
Anti-Aktin, mAB 224-236-1	Westphal <i>et al.</i> , 1997
Anti-DdSun1, Kaninchen Antiserum	Schulz <i>et al.</i> , 2009
Anti-DdNE81, Kaninchen Antiserum	Biomers (Berlin)

##### Sekundäre Antikörper

Ziege anti-Maus alkalische Phosphatase Konjugat	Sigma (St. Louis, MO, USA)
Ziege anti-Kaninchen alkalische Phosphatase Konjugat	Sigma (St. Louis, MO, USA)
Ziege-anti-Maus Alexa Fluor 488 oder 568	Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
Ziege-anti-Ratte Alexa Fluor 488 oder 568	Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
Ziege-anti-Kaninchen Alexa Fluor 488 oder 568	Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
Ziege anti-Maus Meerrettich Peroxidase Konjugat	Dianova (Hamburg)
Ziege anti-Kaninchen Meerrettisch Peroxidase Konjugat	Dianova (Hamburg)
GFP-Booster Atto488	Chromotek (Planegg-Martinsried)

#### 4.1.3 Enzyme und Polymerasen

<i>Taq</i> polymerase	verschiedene Hersteller
Phusion Polymerase	Finnzymes(Espoo, Finland)
Proteinase K	Carl Roth (Karlsruhe)
DNase-1 (RNase frei)	Sigma (St. Louis, MO, USA)
Restriktionsenzyme	Fermentas (Burlington, Canada)

weitere Materialien

Roti-NC nitrocellulose membrane	Carl Roth (Karlsruhe)
Protein G sepharose 4 fast flow	GE Healthcare (Uppsala, Sweden)
NHS-activated sepharose 4 fast flow	GE Healthcare (Uppsala, Sweden)
Amylose resin E8021S	New England Biolabs (Ipswich, MA,USA)
Filtropur S Plus, Sterilfiltration	Sarstedt (Nümbrecht)
Polycarbonate filters, pore Ø 5µm	Whatman (Maidstone, UK)

**4.1.4 Allgemeine Puffer und Lösungen**

Spezielle Puffer wurden im Zusammenhang mit der jeweiligen Methode beschrieben.

Antikörperverdünnungspuffer

0.02 % NaN<sub>3</sub> in 0.1 % BSA Lösung

Harnstoffhaltiger Probenpuffer für SDS-PAGE (LöA)

10 % SDS; 9 M Harnstoff; 5 % 2-Mercaptoethanol

6x Laemmli Probenpuffer für SDS-PAGE

300 mM Tris/HCl; pH 6,8; 30 % Glycerin; 20 % SDS; 0,025 % Bromphenolblau;  
15 % 2-mercaptoethanol

Einbettmedium "Mowiol" für Immunfluoreszenz-Mikroskopie

120 mg/ml Polyvinyl Alkohol 4-88; 30 % Glycerol; 0.2 M Tris-HCl, pH 8.8

PBS

70 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 30 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 137 mM NaCl; 2.6 mM KCl; pH 7.4

50x PC (Protease Inhibitor Cocktail)

50 mM Pefabloc SC; 1.25 mg/ml Leupeptin; 0.5 mg/ml Tosyl-Arginine-Methylester; 0.5 mg/ml Soybean Trypsininhibitor; 50 µg/ml Aprotinin; 50 µg/ml Pepstatin; 100 mM Benzamidin

SDS Laufpuffer

100 mM Tris/HCl, pH 8.3; 0.1 % SDS; 100 mM Glycin

Phosphatpuffer / Soerensen Puffer (Malchow 1972)

14.6 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 2 mM Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; pH 6.0

6x TAE (Ladepuffer für Gelelektrophorese)

240 mM Tris; 6 mM EDTA; 0,6 % acetic; 1 % SDS; 30 % Glycerin; 0,025 % Bromphenolblau; pH 8,3

TAE Laufpuffer (für Agarosegelelektrophorese)

40 mM Tris; 0.1 % Essigsäure; 1 mM EDTA; pH 8.3

TBS

20 mM Tris/HCl; 150 mM NaCl; pH 7.4

TBST

20 mM Tris/HCl; 150 mM NaCl; 0.05 % Tween-20; pH 7.4

TE Puffer

10 mM Tris; 1 mM EDTA; pH 8.0

**4.1.5 Verwendete Plasmide**

p1ABsr8	(Gräf <i>et al.</i> , 2000)
Cherry-histone 2B	(Samereier <i>et al.</i> , 2011)
pLPBLP	(Faix <i>et al.</i> , 2004)
pIS76	(Schulz <i>et al.</i> , 2009)
pIS77	(Schulz <i>et al.</i> , 2009)
pI296	(Schulz <i>et al.</i> , 2009)
pI297	(Schulz <i>et al.</i> , 2009)
pMALc2	New England Biolabs (Ipswich, MA, USA)

**4.1.6 Bakterien Stämme**

Für die Klonierung wurde der *Escherichia coli* Stamm *Top10* (Invitrogen, Carlsbad, CA USA) verwendet. Die Stämme *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ , Rosetta sowie KS1000 (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) wurden für die bakterielle Proteinexpression und *Klebsiella aerogenes* (Williams & Newell 1976) für die Kultivierung von Dictyostelium Zellen verwendet.

**4.1.7 Dictyostelium Stämme**

Der *Dictyostelium discoideum* Stamm AX2-214, axenisch wachsendes Derivat des Isolats NC-1 (Raper, 1935), wurde als Wildtypstamm benutzt und als AX2 bezeichnet. Alle in dieser Arbeit generierten Mutanten basieren auf AX2-Zellen. Der Dictyostelium Stamm GFP-Tubulin (Rehberg und Gräf, 2002) wurde bei der Transformation der RNAi-Konstrukte verwendet.

**4.1.8 Verwendete Software und Online Programme**

Adobe Photoshop CS5 Extended v12.0, ApE plasmid editor v.1.10.4, Biorad Quantity One 4.0.3, Carl Zeiss Axiovision 4.8, MacBiophotonics ImageJ, Microsoft Office 2007, Varian Cary Win UV simple reads 2.0.

Dictyostelium Datenbank:	<a href="http://www.dictybase.org/">http://www.dictybase.org/</a>
NCBI Pubmed:	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed</a>
ExpASY Sequenz Analysen:	<a href="http://expasy.org/tools/#proteome">http://expasy.org/tools/#proteome</a>
Sequenz Vergleich:	<a href="http://www.genome.jp/tools/clustalw/">http://www.genome.jp/tools/clustalw/</a>
ELM motif search:	<a href="http://elm.eu.org/search/">http://elm.eu.org/search/</a>
Coiled coil- Vorhersage:	<a href="http://www.ch.embnet.org/software/COILS_form.html">http://www.ch.embnet.org/software/COILS_form.html</a>

## 4.2 Molekularbiologische Methoden

### 4.2.1 Verwendete Oligonukleotide

Alle verwendeten Oligonukleotide wurden bezogen von Biomers.net GmbH (Ulm).

Tabelle 1: Ausgewählte Oligonukleotide die während dieser Arbeit verwendet wurden

<b>Bezeichnung (forward/reverse)</b>	<b>Sequenz 5' -&gt;3' Richtung</b>
CP91-1Sal forw	TCCGGGTCGACTAATGTCATATCAATATGACCAACAAC
CP91-2Bam rev	GTGGATCCTTATCTTCTTACCGTTGAAGGG
CP91Sal-350forw	TCCGGGTCGACTATCAATAATTAATAAAGAGATTAGA
CP91Sal-660forw	TCCGGGTCGACTAGACAAATTAAGTCCAGGTTTC
CP91BAM-350rev	GTGGATCCTTAATCATTTCATCAATAAAATA
CP91BAM-660rev	GTGGATCCTTAAACTAAATCATGAAGATATTTT
CP91-KO-forward-SalI	GTCGACAATGATAAAAATAAGATTTTTTTT
CP91-KO-forward-PstI	CTGCAGAAGATTCAACAACCTCAA
CP91-KO-rev-HindIII	AAGCTTTGATATGACATTTTTGTAT
CP91-KO-rev-BamHI	GGATCCTTATCTTCTTACCGTTG
CP91-KO-3UTR-Testprimer	TTTAAATTTACAAGGTTCTTA
CP91-RNAi-Bam-rev	GCAATGGATCCTTATTTGGCAAAGCATCTTG
CP91-RNAi-Afl-for	TAAATTCTTAAGCAATGTCATATCAATATGACCAAC
CP91-RNAi-Kpn-rev	GCAATGGTACCTTATTTGGCAAAGCATCTTG
C-Term-CP91forKpnI	CGGGGTACCATGTCATATCAATATGACCAAC
C-Term-CP91revBamHI	CGCGGATCCTTCTTACCGTTGAAGGG
Forw-N-Term-Sun-Sal	GATACGCGTCGACTAATGAGTGGAGATTATAAACC
Sun1-801bp-Bam-rev	GCAATGGATCCTTATAAACTTTTATTACTACCATAATAAAAG

Zusätzliche Primer die aus anderen Quellen zur Verfügung gestellt wurden

Bsr forw (for)	CTCATTCCACTCAAATATACCCGAAATTA
sgGFP 605 (for)	ACCTGTCCACACAATCTGCC
myc rev (rev)	CTTCTTCTGATAATAATTTTTGTTCTA

### 4.2.2 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die Amplifikation von präparativen DNA-Fragmenten aus cDNA, genomischer DNA oder von Plasmiden für Klonierungen erfolgte mit der thermostabilen Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase (Finnzymes, Espoo, Finnland) und den mitgelieferten Puffern „HF“ bzw. „GC“. Für einen PCR-Reaktionsansatz von 50 µl wurden laut Herstellerprotokoll 0,5 µl (1,0 U) Enzym, jeweils 5 µl dNTPs (0,2 mM jedes) und 5 µl (50 mM) von jedem Primer eingesetzt. In Abhängigkeit von den jeweiligen Bedingungen wurde die MgCl<sub>2</sub> Konzentration variiert um ein sauberes PCR-Signal zu erhalten. Die Berechnung der Primer-Annealing-Temperatur erfolgte mit dem Plasmid Programm APE. Die genauen Zeiten für Denaturierung, Annealing und Elongation wurden entsprechend dem Protokoll von Finnzymes angepasst. Für analytische PCR Reaktionen wurde die Taq-Polymerase eingesetzt. Ein typischer Reaktionsansatz von 25 µl enthielt jeweils 0,8 mM dNTPs (0,2mM jedes Nukleotids), 25 pmol 5'- und 3'-Primer, 1 µl Taq Polymerase (1 U) und 2,5 µl vom 10-fach PCR

Puffer. Alle Reaktionen wurden zum Erreichen des jeweiligen Reaktionsvolumens mit ddH<sub>2</sub>O aufgefüllt. Der initiale Denaturierungsschritt erfolgte bei 95°C für 2 bis 5 min (abhängig von DNA Typ), gefolgt von 33 Zyklen von Denaturierung (95°C für 30 s), Annealing (48°C bis 58°C für 30 s) und der Elongation (68°C bis 72°C für 60 s bis 180 s). Die Zeit für den finalen Elongationsschritt betrug 5 bis 10min bei 68°C bis 72°C.

### 10-fach PCR Puffer für Taq-Polymerase Reaktionen:

100 mM Tris/HCl, pH 8,3; 500 mM KCl; 15 mM MgCl<sub>2</sub>; 0,1 % Gelatine

### **4.2.3 RNA-Präparation aus Dictyostelium-Zellen**

Polyadenylierte RNA (mRNA) wurde nach Herstellerangaben unter der Verwendung des RNA Isolation Spin-Kit (Applichem, Darmstadt) präpariert. Diese mRNA dient als Ausgangsmaterial für RT-PCR Reaktion zur Herstellung von cDNA. Die eluierte mRNA wurde in DEPC-behandeltem H<sub>2</sub>O gelöst und anschließend in RT-PCR Reaktionen eingesetzt bzw. gelagert. Für die Lagerung erfolgte die Zugabe von 1/10 Volumen 2 M K-Acetat pH 5,5 und 2,33 Volumen 100 % Ethanol. Die RNA wurde durch Zentrifugation bei 14000 rpm für 15 min (Hettich Universal 32R, 1653Rotor) pelletiert und bei -70°C gelagert.

### **4.2.4 Reverse-Transkriptions-PCR (RT-PCR)**

Als Template für PCR Reaktionen wurde eine unspezifische cDNA aus isolierter Gesamt-RNA mittels reverser Transkriptions-PCR gewonnen. Dafür wurden Oligo-dT Primer verwendet. Die RT-PCR wurde mit dem Protoscript<sup>®</sup> First Strand cDNA Synthesis Kit (NEB, Ipswich, MA, USA) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Reaktion erfolgte in einem Eppendorf Thermomixer Comfort (Eppendorf, Hamburg) unter Verwendung von 1 µg RNA pro Reaktion. Jeweils 2 µl der cDNA Lösung wurden als Template für die Amplifikation von spezifischen Gen-Sequenzen für darauffolgende PCR-Reaktionen eingesetzt.

### **4.2.5 Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten**

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten bezüglich ihrer Größe erfolgte in Gelen mit einem Agarosegehalt von 1% in TAE-Laufpuffer. Die zu trennende DNA-Proben wurde vor der Beladung des Gels mit 6 x TAE-Ladepuffers versetzt. Das Probenvolumen betrug zwischen 5 und 50 µl. Zur Beurteilung der DNA-Größe wurden 5 µl eines 1 kb Standard (GeneRuler<sup>TM</sup>, 1 kb DNA Ladder, Fementas) aufgetragen. Die Trennung erfolgte bei 5 V/cm. Zur Detektion der DNA wurde das Agarosegel für 30 min in TAE-Puffer mit 1 µg/ml Ethidiumbromid gefärbt. Die so angefärbten DNA-Banden wurden mit dem Gel Doc 2000-System (BioRad, Hercules, CA) mit UV-Beleuchtung sichtbar gemacht und dokumentiert.

#### **4.2.6 Aufreinigung von PCR Produkten, DNA-Fragmenten sowie DNA Extraktion aus Agarosegelen**

PCR Produkte, DNA-Fragmente nach Restriktionsverdau und DNA aus Agarosegelen wurden mit dem *NucleoSpin® Extract II Kit* (Macherey & Nagel, Düren) nach den Angaben des Herstellers aufgereinigt. Entsprechende DNA-Banden in Agarosegelen wurden zuvor durch Illumination mit dem ECX-20-M-UVilluminator (PeqLab, Erlangen) sichtbar gemacht und mit Hilfe eines sauberen Skalpellens aus dem Gel ausgeschnitten.

#### **4.2.7 DNA-Verdau durch Restriktionsendonukleasen**

Für den Restriktionsverdau von DNA wurden FastDigest® Enzyme von Fermentas (Vilnius, Litauen) verwendet und mit dem vom Hersteller empfohlenen Puffersystemen, Enzymmengen und jeweiligen Temperaturbedingungen durchgeführt. Die Inkubationszeit lag zwischen 2 bis 12 h, wobei PCR Produkte immer über Nacht verdaut wurden. Anschließend wurden die Proben mittels *NucleoSpin® Extract II Kit* (Macherey & Nagel, Düren) aufgereinigt und die Vollständigkeit des Restriktionsverdaus auf einem Agarosegel überprüft.

#### **4.2.8 Dephosphorylierung von DNA-Enden**

Um eine Religation von linearisierten Plasmiden nach dem Restriktionsverdau zu verhindern, wurden die 5'-Phosphatgruppen mit Antarctic Phosphatase (NEB, Ipswich, MA, USA) nach Herstellerangaben dephosphoryliert. Bei geeigneten Proben erfolgte die Dephosphorylierung gleichzeitig mit dem Restriktionsverdau anstatt in einer separaten Reaktion. Dafür wurden 1 µl Antarctic Phosphatase in der letzten Stunde des Restriktionsverdaus hinzugefügt. Im Anschluss erfolgte die Inaktivierung der Phosphatase bei 65°C für 15 min sowie eine anschließende Aufreinigung der DNA über ein Agarosegel.

#### **4.2.9 Ligation und Transformation von DNA-Fragmenten in *E.coli***

Die Ligation von gereinigten DNA-Fragmenten erfolgte mit der T4-DNA Ligase (NEB, Ipswich, MA, USA) nach Herstellerangaben. In einem Standard-Ligationsansatz von 10 µl Gesamtvolumen wurde 3- bis 5-mal so viel Insert wie Plasmid verwendet (molares Verhältnis). Die Konzentrationen der eingesetzten Plasmid-Insert Konzentration wurden vorher auf einem analytischen Agarosegel abgeschätzt. Der Ligationsansatz wurde entweder über Nacht bei 16°C oder bei Raumtemperatur (RT) für 2 h inkubiert. Für die folgende Transformation in *E.coli* wurden dem Ligationsansatz 100-200 µl chemisch kompetenter *E.coli*-Zellen hinzugegeben und für 45 min auf Eis inkubiert. Anschließend folgte ein Hitzeschock bei 42°C für 90 s. Der Ansatz wurde erneut für 5 min auf Eis inkubiert. Nach der Zugabe von vier Volumenteilen LB-Medium (Abschnitt 4.4.1), wurde das Gemisch aus chemisch kompetenten *E.coli* und ligiertem Plasmid für 60 min bei 37°C unter Verwendung eines Thermomixer Comfort (Eppendorf, Hamburg) geschüttelt. Die Selektion der Transformanten erfolgte durch Ausplattieren auf Antibiotika-haltigen LB-Agarplatten bei 37°C über Nacht.

#### 4.2.10 Mini- und Midi-Plasmid Präparation aus *E.coli*

Die Präparation von Plasmid DNA aus 2 ml Übernachtskultur erfolgte mit dem Plasmid-Mini Spin Isolation Kit (Applichem, Darmstadt) nach Herstellerangaben. Für die Aufreinigung von bis zu 100 ml Übernachtskultur (Midi-Plasmid Präparationen) wurde das Nucleobond PC 100 Kit (Macherey und Nagel, Düren) verwendet. Die aufgereinigte und getrocknete DNA wurde in ddH<sub>2</sub>O oder in 10 mM Tris pH 7.5 gelöst. Die Identifizierung der erwünschten Transformanten erfolgte nach Restriktionsverdau mit entsprechenden Enzymen und anschließender Analyse des Restriktionsverdaus auf einem Agarosegel.

#### 4.2.11 Bestimmung der DNA-Konzentration

Die DNA-Konzentration in Lösungen wurden durch Messung der Absorption bei 260 nm einer verdünnten Probe in einem Cary 50 Spektrometer (Varian, Darmstadt) bestimmt. Das Photometer wurde vorher gegen eine Pufferkontrolle kalibriert. Die OD<sub>260</sub> von 1,0 entspricht bei dsDNA ungefähr einer Konzentration von 50 µg/ml (Sambrook, *et al.*, 1989). Alternativ wurde die DNA-Konzentration durch den Vergleich der Bandenintensitäten mit einem Molekulargewichtsmarker in Ethidiumbromid gefärbten Agarosegelen abgeschätzt.

#### 4.2.12 Präparation genomischer DNA aus *Dictyostelium*

Für die Präparation von genomischer DNA wurde das Kit NucleoSpin® (Macherey und Nagel, Düren) nach Herstellerangaben verwendet. Die Elution der DNA erfolgte in 50-70 µl Elutionspuffer (Änderung zum Herstellerprotokoll).

#### 4.2.13 Herstellung chemisch kompetenter *E.coli*

Eine einzelne Kolonie einer Übernachtskultur von *E. coli* (*Top 10*) auf LB-Platten wurde in 5 ml  $\psi$ b-Medium transferiert und wuchs dort bei 37°C bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,3. Diese Vorkultur wurde anschließend zum Animpfen von 100 ml vorgewärmtem  $\psi$ b-Medium verwendet. Die Zellen wuchsen im Schüttelkolben bei 37°C bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,5. Nach Inkubation für 5 min auf Eis wurden die Zellen 5 min bei 3000 g (Hettich Rotana 460R, 5624 Rotor) zentrifugiert und in 40 ml eiskaltem TfbI-Puffer resuspendiert. Danach erfolgte eine erneute Zentrifugation, eine erneute Resuspendierung der Zellen in 4 ml TfbII-Puffer, 15 min Inkubation auf Eis und abschließend ein Einfrieren der 200 µl Proben in flüssigem Stickstoff. Die Lagerung der kompetenten Zellen erfolgte bei -70°C.

##### $\psi$ b-Medium:

20 g/l Trypton; 5 g/l Hefeextrakt; 5 g/l MgSO<sub>4</sub> (wasserfrei); pH 7.6 eingestellt mit KOH

##### TfbI:

30 mM Kaliumacetat; 100 mM Rubidiumchlorid (RbCl); 10 mM CaCl<sub>2</sub>; 15 % Glycerol; pH 6 eingestellt mit 0.2 M Essigsäure und Zusatz von 50 mM of MnCl<sub>2</sub>; finaler pH eingestellt auf 5.8

TfbII: 10 mM MOPS; 75 mM CaCl<sub>2</sub>; 10 mM Rubidiumchlorid (RbCl); 15 % Glycerol; pH 6.5 eingestellt mit KOH

#### 4.2.14 Retransformation eines Plasmids in *E.coli*

Für eine erneute Transformation chemisch kompetenter *E.coli* mit einem bereits vorliegenden, aufgereinigtem Plasmid werden von diesem 0,5 µg zu 50 µl kompetenten *E. coli* Zellen gegeben und für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wird die Suspension auf LB<sub>Amp</sub>-Agarplatten ausplattiert und bei 37 °C über Nacht inkubiert.

#### 4.2.15 Transformation von DNA in *Dictyostelium* (Elektroporation)

Alle Schritte während der Transformation wurden, soweit nicht anders angegeben, mit eiskalten Puffern bzw. auf Eis durchgeführt. *Dictyostelium* Zellen wurden bis zu einer maximalen Dichte von 2-3 x 10<sup>6</sup> Zellen/ml kultiviert, aus Schüttel- oder adhärenter Kultur geerntet und zweimal mit je 10 ml Phosphatpuffer gewaschen. Nach einem weiteren Wasch-schritt mit Elektroporationspuffer wurden die Zellen mit einer Endkonzentration von 1 x 10<sup>8</sup> Zellen/ml in Elektroporationspuffer resuspendiert, mit 15-30 µg Plasmid DNA vermischt und in eine vorgekühlte sterile Elektroporationsküvette transferiert (4mm Abstand zwischen den Elektroden, Peqlab, Erlangen). Nach 5-minütiger Inkubation auf Eis erfolgt die Elektroporation mit zwei Impulsen bei 1,1 kV, 3 µF Kondensatorkapazität in einer Elektroporationsapparatur (Gene Pulser, Biorad ,Hercules, CA, USA). Danach wurden die Zellen in eine sterile Zellkulturflasche überführt und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe einer 1 mM Mg<sub>2</sub>Cl/CaCl<sub>2</sub> Lösung (Endkonzentration) wurden die Zellen für weitere 15 min bei Raumtemperatur leicht geschwenkt. Für die Transformation Blastizidin resistenter Zellen wurden diese in 25 ml HL5c Medium (supplementiert mit Penicillin/Streptomycin von Sigma) aufgenommen und auf eine 24-Well-Zellkulturplatte verteilt. Nach einer Erholungsperiode von 24 h wurde durch Zugabe von Blastizidin (Endkonzentration 4 µg/ml) ein Selektionsdruck ausgeübt. Die Zellen wurden für 1-2 Wochen bei 22°C inkubiert, bis Kolonien resistenter Zellen auftraten und für Untersuchungen bzw. Subklonierungen entnommen werden konnten. Zur Selektion G418-resistenter Zellen wurden diese nach Beendigung der einzelnen Trans-formationsschritte in eine Zellkulturflasche überführt. 24 h nach der Elektroporation wurden die Zellen geerntet und dreimal mit Phosphatpuffer gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 2,5 ml Bakteriensuspension, *Klebsiella aerogenes* in Phosphatpuffer supplementiert mit 10 µg/ml G418 und Penicillin/Streptomycin, resuspendiert. Die dafür benötigten Bakterien wurden vorher frisch geerntet. Für die Gewinnung der Bakterien wurden diese am Tag der Transformation auf SM-Agar-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C kultiviert. Für das Ernten der Bakterien wurde 5 ml steriler Phosphatpuffer verwendet. Jeweils 500 µl Suspension, bestehend aus Bakterien und transformierten *Dictyostelium*-Zellen, wurden auf frisch hergestellte Phosphatagarplatten ausplattiert. Dem Phosphatagar wurde vor dem Gießen 100 µg/ml G418 zugesetzt. Die Phosphatagarplatten wurden bis zum ersten Auftreten von einzelnen Fraßplaques für 1-4 Wochen bei Raumtemperatur gelagert. Diese wurden dann mit einer sterilen Pipette in Flüssigmedium mit 10 µg/ml G418 überführt. Es handelt sich dabei jeweils um Einzelklone. Für die Generierung von Blastizidin/G418-Doppelmutanten wurde zuerst ein Stamm hergestellt, der das

Konstrukt mit der Blastizidinresistenz trug. In diesen Stamm wurde anschließend das G418 Konstrukt transformiert.

Elektroporationspuffer: 50 mM Saccharose; 10 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; pH 6.1

#### **4.2.16 Herstellung der verwendeten Plasmide und Dictyostelium Stämme**

Die Amplifikation der DNA Fragmente für die Herstellung der verschiedenen Plasmide bzw. Konstrukte erfolgte durch einzelne PCR-Reaktionen. Als Template diente cDNA, Plasmid DNA oder genomische DNA. Die erhaltenen PCR-Produkte wurden aufgereinigt (Abschnitt 4.2.6), mit den jeweiligen Restriktionsendonukleasen geschnitten (Abschnitt 4.2.7), erneut aufgereinigt und in den dazu gehörigen Vektor ligiert (Abschnitt 4.2.9). Die Überprüfung der Plasmidsequenz auf mögliche Fehler erfolgte durch eine Sequenzierung (GATC Biotech, Konstanz). Die verwendeten Primer und Ausgangsvektoren für diese Arbeit sind in Abschnitt 4.2.1 und 4.1.5 aufgeführt.

##### Herstellung von N-terminalen GFP-Fusionsproteinen

Für die N-terminale Fusion von GFP wurden die Vektoren pIS76 oder pIS77 (Schulz *et al.*, 2009) verwendet. Die dafür generierten PCR Produkte waren, wenn nicht anders angegeben, immer mit Sall- und BamHI Restriktionsstellen flankiert. Für eine Insertion des Konstruktes wurde das entsprechende Zielplasmid sowie auch das PCR Produkt mit Sall und BamHI verdaut. Das Zielplasmid wurde vorher zusätzlich noch dephosphoryliert um eine Religation zu verhindern (Abschnitt 4.2.8).

##### Herstellung eines GFP-CP91-N-Terminus-Konstruktes

GFP-CP91-N-Terminus wurde generiert wie beschrieben für die N-terminale GFP-Fusion und umfasste die Basen 1-1050 der kodierenden CP91 Sequenz. Dies entsprach den Aminosäuren 1-350.

##### Herstellung des GFP-CP91-cc -Konstruktes

GFP-CP91-cc wurde generiert wie beschrieben für die N-terminale GFP-Fusion und umfasste die Basen 1051 – 1980 der kodierenden CP91 Sequenz. Dies entsprach den Aminosäuren 351-660.

##### Herstellung des GFP-CP91-C-Terminus-Konstruktes

GFP-CP91-C-Terminus wurde generiert wie beschrieben für die N-terminale GFP-Fusion und umfasste die Basen 1980-2397 der kodierenden CP91 Sequenz. Dies entsprach den Aminosäuren 660-799.

##### Herstellung eines MBP-CP91 Fusionsproteins

Das MBP-CP91 Fusionsprotein diente als Antigen zu Herstellung eines polyklonalen Antikörpers. Dafür wurde die kodierende DNA aus einem vorher generierten GFP-CP91 Plasmid mit den entsprechenden Restriktionsenzymen Sall und BamHI geschnitten. Das erhaltene DNA-Fragment wurde aufgereinigt und in den ähnlich behandelten pMALc2 Vektor (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) ligiert. Das MBP-CP91 Plasmid wurde in einem Bakterienstamm (*E. coli* DH5 $\alpha$  und Rosetta) exprimiert und etwa 1 mg des Proteins zur Immunisierung an die Firma Biogenes GmbH (Berlin) verschickt. Das daraus erhaltene Antiserum wurde wie in 4.4.13 beschrieben aufgereinigt.

Herstellung eines C-terminalen GFP-Fusionsproteins

PCR Produkte, flankiert von den KpnI und BamHI Restriktionsstellen, wurden generiert und in den ähnlich behandelten p1ABsr8 Vektor (Gräf *et al.*, 2000a) ligiert.

Herstellung eines CP91-RNAi-Konstruktes und Dictyostelium Stamms

Das CP91 RNAi Plasmid wurde nach der beschriebenen Methode von Samereier *et al.* (2011) generiert. Dazu wurden ein Fragment von 438 bp (beginnend im kodierenden Bereich von CP91 bei bp 1 bis bp 438) mit Sall/BamHI Linker Primern in sense Richtung und ein 438 bp langes Antisense Konstrukt mit AflII und KpnI Linker Primern amplifiziert. Das Sense Konstrukt wurde über Sall/BamHI stromabwärts in den Polylinker des mCherry Vektors pIS193 und das Antisense Konstrukt über AflII/KpnI in die mCherry Sequenz von pIS193 kloniert. Zwischen Sense und Antisense Konstrukt verblieb so nun eine Spacer Sequenz von 196 bp. Das Konstrukt wurde wie in 4.2.15 beschrieben in Dictyostelium AX2 Zellen und einen GFP-Tubulin Stamm (Rehberg und Gräf, 2002) transformiert und die potentiellen RNAi-Klone mittels Immunfluoreszenz und Western-Blot Analysen überprüft.

Herstellung einen CP91 Knockout Konstruktes

Die Erzeugung eines CP91 Knockout Konstruktes wurde durch den teilweisen Ersatz des chromosomalen CP91 Wildtyp Genlocus mit einer Blastizidin-Resistenz-Kassette mittels homologer Rekombination erreicht. Das CP91 Knockout Konstrukt wurde unter Verwendung des pLPBLP Vektor (Faix *et al.*, 2004) generiert. Beide komplementären Sequenzen, welche die BSR Kassette von beiden Seiten flankieren, wurden durch die Verwendung geeigneter Linker-Primer und einer PCR auf genomischer DNA als Matrize produziert. Das 597 bp umfassende Fragment aus dem 5' Bereich der UTR-Region des CP91, wurde in den HindIII und Sall geschnittenen pLPBLP vor die Blastizidinkassette ligiert. Anschließend wurde das 639 bp umfassende DNA Fragment aus dem 3' Bereich der kodierenden Region des CP91, nach der Restriktion mit PSTI/BamHI hinter die Blastizidinkassette eingefügt. Das generierte Knockout-Konstrukt wurde mit PvuII verdaut und vor der Transformation in Dictyostelium AX2 Zellen gereinigt. Um die korrekte Insertion zu überprüfen wurden PCR Analysen mit geeigneten Primern durchgeführt. Es konnte, wie in den Ergebnissen beschrieben, kein CP91 k/o Stamm isoliert werden.

Herstellung eines GFP-SUN-801-N-Terminus-Konstruktes

GFP-SUN-801-N-Terminus-Konstruktes wurde generiert wie beschrieben für die N-terminale GFP-Fusion und umfasste die Basen 1-801 der kodierenden Sun1 Sequenz. Dies entsprach den Aminosäuren 1-267. Die Ligation erfolgte in den pIS77 Vektor.

Tabelle 2: Ausgewählte Plasmide und Dictyostelium Stämmen

Konstrukt	Code	Zielpasmid	Restriktion s- chnittstelle n	verwendete Primer	Als Dict. Stamm	Doppel- Mutante mit
GFP-CP91	pSP2	pIS76	SaII BamHI	CP91Salfor CP91Bamrev	ja	-
GFP-CP91	pSP1	pIS77	SaII BamHI	CP91Salfor CP91Bamrev	ja	mCherry- histone2B
MBP-CP91	pSP3	pMALc2	SaII BamHI	CP91Bamfor CP91Salrev	nein	-
Mars-CP91	pSP4	pIS240	SaII BamHI	CP91Salfor CP91Bamrev	nein	-
GFP-CP91- cc		pIS76	SaII BamHI	CP91Sal350for CP91Bam660rev	nein	-
GFP-CP91- cc	pSP19	pIS77	SaII BamHI	CP91Sal350for CP91Bam660rev	ja	-
GFP-CP91- N- Terminus		pIS76	SaII BamHI	CP91Sal350for CP91Bamrev	nein	-
GFP-CP91- N- Terminus	pSP17	pIS77	SaII BamHI	CP91Sal350for CP91Bamrev	ja	mCherry- histone2B
GFP-CP91- C-Terminus		pIS76	SaII BamHI	CP91Sal660for CP91Bamrev	nein	-
GFP-CP91- C-Terminus	pSP14	pIS77	SaII BamHI	CP91Sal660for CP91Bamrev	ja	mCherry- histone2B
CP91RNAi- intermediate		pIS193	SaII BamHI	CP91RNAiSalfor CP91RNAiBamrev	nein	-
CP91RNAi			AflII KpnI	CP91RNAiAflfor CP91RNAiKPNrev	ja	GFP- Tubulin
CP91KO- intermediate		pLPBLP	SaII HindIII	CP91Ko1forSaII CP91Ko1revHindII I	nein	-
CP91KO			PstI BamHI	CP91Ko2forPstI CP91Ko2revBam	nein	-
GFP-CP91- ΔN- Terminus		pIS77	SaII BamHI	CP91Salfor CP91Bam350rev	nein	-
GFP-CP91- ΔC- Terminus		pIS77	SaII BamHI	CP91Salfor CP91Bam660rev	nein	-
CP91-GFP		pLABsr8	KpnI BamHI	C- TermCP91forKpnI C- TermCP91revBam	nein	-
GFP- SUN801		pIS76	SaII BamHI	SUN801-SaIIfor SUN801- BamHIrev	nein	-
GFP- SUN801		pIS77	SaII BamHI	SUN801-SaIIfor SUN801- BamHIrev	ja	-

### 4.3 Biochemische Methoden

#### 4.3.1 Gewinnung von Proteinproben aus Dictyostelium Zellen

Axenisch wachsende Dictyostelium Zellen wurden bei einer Zelldichte von  $3-5 \times 10^6$  Zellen /ml geerntet und dreimal in eiskaltem Phosphatpuffer gewaschen. Für einen Kern- bzw. Centrosomenextrakt erfolgte die Herstellung der Proben analog der Isolierung von Dictyostelium Kernen und Centrosomen wie in Abschnitt 4.3.9 beschrieben. Um kernfreien Überstand zu gewinnen wurde dafür der Überstand nach der Sedimentation von Kernen (4.3.9) nicht verworfen sondern für die Analyse weiter verwendet. Nach eventueller Proteinpräzipitation (4.3.4) bei größeren Volumina (Überstand) und Zugabe von  $0,5 \times$  Harnstoff-Probenpuffer wurden die Proben für 3 min auf  $70^\circ\text{C}$  erhitzt. Für einen Gesamtzellextrakte wurden die Zellen lediglich abzentrifugiert, und in  $0,5 \times$  Harnstoff-Probenpuffer aufgenommen, so dass ca.  $5 \times 10^5$  Zellen auf eine Spur aufgetragen werden konnten. Anschließend konnten die Proben für die SDS-Page (4.3.4) zur Auftrennung von Proteinen verwendet werden.

#### 4.3.2 Bestimmung der Protein Konzentration

Zur annähernden Bestimmung der Proteinkonzentration wurde die  $\text{OD}_{280}$  einer Proteinlösung gemessen, wobei 0,7 mg Protein einer  $\text{OD}_{280}$  von 1,0 zugrunde gelegt wurde. Dieser Wert ist für Immunglobuline am genauesten. Es wurden eluierte Antikörper (4.3.13) und aufgereinigte MBP-Fusionsproteine (4.3.11) mit dieser Methode gemessen.

Die Proteinmenge einer Kern- bzw. Centrosomenpräparation wurde mit Hilfe des Amidoschwarz-Tests bestimmt. Dafür wurden die Proben in Harnstoff-Probenpuffer aufgenommen und mit 300  $\mu\text{l}$  Färbelösung vermischt (Vortex). Nach 5 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde das Präzipitat für 5 min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Das Pellet wurde zweimal mit Waschlösung gewaschen, jeweils gefolgt von 5 minütiger Zentrifugation, und anschließend in 700  $\mu\text{l}$  0,1 M NaOH aufgenommen (Vortex). Die Färbung der Lösung wurde mittels Pharmacia Novaspec II Photometer (GE Healthcare, Uppsala, Schweden) bei 615 nm gemessen und mit einer BSA Eichkurve bestehend aus 4, 8 und 12  $\mu\text{g}$  BSA verglichen. Für alle Probe und Eichwerte erfolgte eine 3-fache Bestimmung um den Fehler zu verringern.

Waschlösung: Essigsäure/Methanol im Verhältnis 1:10

Färbelösung: 2,6 mg/ml Amidoschwarz in 10 ml Waschlösung

#### 4.3.3 Proteinpräzipitation mit Methanol/Chloroform und Trichloressigsäure

Methanol/Chloroform Präzipitation (Wessel und Flügge, 1984)

Diese Methode eignet sich für verdünnte Proteinlösungen, die Detergenzien, Phospholipide oder hohe Salzkonzentrationen enthalten und wurde hauptsächlich für die Fällung von Proteinfractionen bis 150  $\mu\text{l}$  verwendet. 150  $\mu\text{l}$  der Proteinlösung wurde mit 600  $\mu\text{l}$  Methanol und 150  $\mu\text{l}$  Chloroform vermischt, dann wurden 450  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$  zugesetzt und kräftig gemischt (Vortex). Die obere flüssige Phase

wurde nach Zentrifugation in einer Tischzentrifuge (Eppendorf) entfernt. Das zurückbleibende Chloroform-Kissen mit dem präzipitierten Protein wurde mit dem 3-fachem Volumen Methanol vermischt (Vortex) und zentrifugiert (maximale Geschwindigkeit, 2 min). Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen, das Proteinpellet getrocknet und in harnstoffhaltigem Probenpuffer (LöA) aufgenommen.

Präzipitation mit Trichloressigsäure (TCA)

Die Säurefällung mit Trichloressigsäure (TCA) ist eine schnelle und sehr effiziente Methode, um Proteine aus Lösungen auszufällen. Es ist eine denaturierende Fällung und für größere Volumina geeignet. Daher wurde sie vor allem zur Konzentrierung von Proben für die Gelelektrophorese verwendet. Eine wässrige Proteinprobe wurde mit einer 100%igen TCA-Stammlösung (Endkonzentration 10%) versetzt und kräftig vermischt. Nach einer Zentrifugation für 10 min in einer Tischzentrifuge (Eppendorf, maximale Geschwindigkeit) wurde der Überstand vorsichtig abgenommen und das Pellet mehrmals mit Isopropanol gewaschen. Anschließend wurde das Pellet in harnstoffhaltigem Probenpuffer (LöA) aufgenommen und vor der Gelelektrophorese für 3 min bei 70°C erwärmt.

**4.3.4 Proteinauftrennung mit Hilfe von SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Proteine wurden auf diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamid Gelen aufgetrennt (Bollag *et al.*, 1996). Die Gele wurden aus frischen Stammlösungen gefertigt. Die Elektrophorese wurde in Biorad Minigel System Gelkammern bei 15 mA pro Gel für 15 min und anschließend bei 30 mA pro Gel für 45 min durchgeführt. Die Proteinproben wurden entweder mit gleichem Volumen Harnstoff-Probenpuffer oder 1/5 Volumen des 6 × Laemmli-Probenpuffer versetzt und 2-5 min bei 70 bzw. 94°C denaturiert. Das aufgetragene Probenvolumen war abhängig von der Probe und dem Volumen der Tasche im SDS-Gel. Als Standard wurde ein Protein-gemisch definierter Molekülmasse verwendet:

LMW (Sigma-Aldrich): 92,5; 67; 45; 30; 20; 14 kDa

HMW (Sigma-Aldrich): 205; 116; 97; 66; 45; 29 kDa

Trenngelpuffer: 2 M Tris/HCl, pH 8.7; 0.4 % SDS

Sammelgelpuffer: 0.25 M Tris/HCl, pH 6.8; 0.4 % SDS

Tabelle 3: Rezept zur Herstellung zweier Gele für die SDS-PAGE

Stammlösung	12,5 % Sammelgel	12,5 % Trenngel	6 % Sammelgel	6 % Trenngel
30 % Acrylamide	930 µl	3700 µl	-	-
30 % Acrylamide/ 0,8 % PDA	-	-	660 µl	2000 µl
1 % Bisacrylamid	930 µl	930 µl	-	-
Trenngel Puffer	-	2500 µl	-	2500 µl
Sammelgel Puffer	1000 µl	-	1000 µl	-
H2O	1777 µl	1800 µl	2400 µl	5500 µl
10 % APS	35 µl	45 µl	30 µl	50 µl
Temed	7 µl	9 µl	5 µl	5 µl

#### 4.3.5 Coomassie R250 Färbung von SDS-Gelen

Bei SDS-Gelen wurde ein unmarkierter Standard von Sigma (St. Louis, MO, USA) verwendet. Für den Nachweis von Proteinen wurden die SDS-Gele für 1-2 h in der Coomassie-Färbelösung inkubiert und anschließend mit Wasser gespült. Nicht gebundener Farbstoff wurde durch Schütteln in einer Entfärbelösung ausgewaschen.

Coomassie R250 Färbelösung: 25 % Coomassie R250 (Sigma-Aldrich); 50 % Methanol;  
10 % Essigsäure

Entfärbelösung: 25 % Isopropylalkohol; 10% Essigsäure

#### 4.3.6 Silberfärbung von SDS-Gelen

Für die Silberfärbung wurden die SDS Gele in einer Fixierungslösung unter schwenken 30 min inkubiert und anschließend für weitere 30 min in eine Sensibilisierungslösung gegeben. Nach dreimaligem Waschen in ddH<sub>2</sub>O für jeweils 5 min wurden die SDS Gele für 20 min in eine Silberlösung überführt. Nach erneutem dreimaligen Waschen (ddH<sub>2</sub>O, jeweils 5 min) erfolgte die Inkubation der Gele mit der Entwicklerlösung. Das Beenden der Entwicklungsreaktion, nach dem Erreichen der maximalen Anfärbung der Proteinbanden, erfolgte mit 0.04 M EDTA. Gefärbte Gele wurden anschließend dokumentiert.

Fixierungslösung: 40 % Ethanol; 10 % Essigsäure

Sensibilisierungslösung: 30 % Ethanol; 0.2 % Natriumthiosulfat; 68 g/l Natriumacetat;  
0.125 % Glutaraldehyd (frisch zugesetzt)

Silberlösung: 0.25 % Silbernitrat; 0.015 % Formaldehyd (frisch zugesetzt)

Entwicklerlösung: 25 g/l Natriumcarbonat; 0.0075 % Formaldehyd (frisch zugesetzt)

#### 4.3.7 Westernblot und Immundetektion von Proteinen

Nach der Auftrennung der Proteinproben mittels SDS-Page wurden diese auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Dazu wurde eine halbtrockene Blotting-Apparatur (Peqlab, Erlangen) und ein Puffersystem nach (Kyhse-Anderson *et al.*, 1984), modifiziert durch die Zugabe von 20 % Methanol, verwendet. Der Proteintransfer wurde bei 1 mA/cm<sup>2</sup> durchgeführt. Anschließend wurde die Membran mit Ponceau S Lösung angefärbt und der Proteingrößenstandard markiert. Ponceau S färbt reversibel alle Proteine, so dass anhand der Färbung auch die übertragenen Proteinmengen abgeschätzt werden konnten. Die Membran wurde anschließend durch die Inkubation mit 5 % Magermilchpulver (bei späterer Entwicklung mit der ECL Reaktion) oder Fischgelatine (bei alkalischer Phosphatase Reaktion) in TBST für 1 h über Nacht blockiert. Die Inkubation mit dem primären Antikörper erfolgte in 1,5 % Magermilchpulver in TBST für 1,5 h. Nach dreimaligem Waschen (jeweils 5 min) in TBST wurde mit dem sekundären Antikörper, konjugiert mit Meerrettichperoxidase oder alkalischer Phosphatase (1:10000 in TBST), für 1 h inkubiert. Die Membran wurde danach zweimal für 5 min in TBST und einmalig für 10 min in TBS gewaschen. Im Falle der Meerrettichperoxidase erfolgte die Reaktion nach den Herstellerangaben mit den Chemikalien des ECL-Kits (AppliChem, Darmstadt). In

einer Dunkelkammer wurde die Membran, eingewickelt in eine Frischhaltefolie, in eine Röntgenfilmhalterapparatur (Kisker, Steinfurt) gelegt und für 1s bis 30 min mit einem Röntgenfilm (Fuji Super RX, Fujifilm, Tokyo) in Kontakt gebracht. Der so belichtete Röntgenfilm wurde danach in Entwicklerlösung (T32, Calbe Chemie, Calbe) für 2 min inkubiert, mit Wasser gespült und in Fixierlösung (Superfix, Tetenal, Norderstedt) für 2 min fixiert. Bei Verwendung der alkalischen Phosphatase erfolgte die Entwicklung direkt auf der Membran. Dazu wurden 10 ml alkalische Phosphatase Reaktionspuffer mit 45 µl NBT und 35 µl BCIP vermischt, auf die Membran gegeben und in Dunkelheit inkubiert. Nachdem die gewünschte Färbeintensität erreicht war, wurde die Reaktion durch gründliches Spülen mit Wasser gestoppt.

Blotpuffer 1: 300 mM Tris; 20 % Methanol

Blotpuffer 2: 30 mM Tris; 20 % Methanol

Blotpuffer 3: 30 mM Tris; 20 % Methanol; 40 mM ε-Aminocapronsäure

Ponceau S Lösung: 0.1 % Ponceau S; 5 % Essigsäure

Alkalische Phosphatase-Reaktionspuffer: 100 mM Tris/Cl; 100 mM NaCl; 50mM MgCl<sub>2</sub>; pH 9,5

NBT-Stammlösung: 75 mg/ml in 70 % DMF

BCIP-Stammlösung: 50 mg/ml in 100 % DMF)

### 4.3.8 Densitometrische Bestimmung der Expressionsstärke von Proteinen

Die quantitative Auswertung von gelelektrophoretisch aufgetrennten Proteinen eines mit der ECL-Methode gefärbten Westernblots erfolgte mit dem Bildverarbeitungsprogramm ImageJ. Es wurde das hintergrundkorrigierte Produkt aus Fläche und Tonwert in einer 8 Bit Graustufenskala gemessen.

### 4.3.9 Isolierung von Dictyostelium Kernen und Centrosomen

Zur Vermeidung von Proteindegradation, wurden alle nachfolgenden Schritte auf Eis durchgeführt. Zusätzlich wurden ausschließlich eiskalte Puffer und gekühlte Zentrifugen/Rotoren verwendet. Die Centrosomen oder auch Zellkerne dienten als Probe für SDS-PAGE oder Immunfluoreszenzexperimenten. Die Isolation wurde nach einem modifizierten Protokoll durchgeführt (Graf *et al.*, 1998). Es wurden ungefähr  $1 \times 10^9$  Zellen mit einer maximalen Dichte von  $4 \times 10^6$  Zellen/ml geerntet und zweimal mit je 30 ml Phosphatpuffer gewaschen. Der dritte Waschschritt erfolgte mit 20 ml Phosphatpuffer dem Cytochalasin A ( $2 \mu\text{M}$  Endkonzentration) hinzugefügt wurde. Das Zellpellet wurde in 10 ml Lysepuffer resuspendiert, für 1 min mit maximaler Intensität gemischt (Vortex) und durch einen  $5 \mu\text{m}$  Nucleopore Filter (Whatman, Maidstone, UK) gepresst. Nach dem mechanischen Aufschluss wurde das Lysat für 10 min bei 4000 rpm (Hettich Rotanta, 5624 Rotor) zentrifugiert. Dabei wurden Zellkerne und mit Kernen assoziierte Centrosomen pelletiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 10 ml Pyrophosphatpuffer mit Hilfe eines Vortex resuspendiert und erneut bei 4000 rpm für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde mit 2 mg Heparin supplementiert und 5 min lang auf Eis inkubiert. Diese Lösung, die bereits 30 % Saccharose enthielt, wurde vorsichtig auf einen Saccharosegradienten geladen. Dieser setzte sich zusammen aus 1 ml 80% und 1 ml 50%

Saccharoselösung und wurde in Beckman SW-40 Gefäßen vorbereitet. Der Gradient wurde für 1 h bei 40000 g (21000 rpm, Beckman Optima L-100K Ultrazentrifuge, SW40 Rotor) zentrifugiert und danach sofort auf Eis gestellt. Mit einer Peristaltikpumpe und Glaskapillaren (Flussrate 200 µl pro min) wurden 500 µl der 80 % Saccharosefraktion von dem Boden des SW-40 Gefäßes entfernt und verworfen. Dann wurde erneut 1 ml Saccharoselösung vom Boden des Gefäßes abgesaugt und in einem neuen Gefäß gesammelt. Diese Fraktion enthielt die aufgereinigten Centrosomen (Grenzschicht zwischen 50 % und 80 % Saccharoselösung). Für eine Verwendung der Centrosomen in Immunfluoreszenzexperimenten wurden 10-30 µl der Centrosomenfraktion in 1 ml eiskaltem Phosphatpuffer verdünnt und durch Zentrifugation bei 4500 rpm (Hettich Rotanta, 5624 Rotor) auf Deckgläschen sedimentiert. Die Fixierung und Immunmarkierung von isolierten Centrosomen erfolgte nach dem Protokoll für ganze Zellen wie in Abschnitt 4.5.1 beschrieben. Wenn die GFP-Fluoreszenz von isolierten Centrosomen oder Kernen analysiert werden sollte war es wichtig, dass während des gesamten Isolationsprozesses kein DTT oder andere reduzierende Agenzien verwendet wurden. Für die SDS-PAGE wurde ein Teil der centrosomalen Fraktion mit 6x Laemmli-Probenpuffer versetzt und bei 95 °C für 5 min inkubiert.

Lysepuffer: 100 mM Na-PIPES, pH 6.9; 2 mM MgCl<sub>2</sub>; 10 % (w/v) Saccharose; frisch dazu geben: 1x Proteaseinhibitor Cocktail; 0.25 % Triton X-100; 1 mM DTT; 2 µM Cytochalasin A

Pyrophosphatpuffer: 100 mM Na-PIPES, pH 6.9; 2 mM MgCl<sub>2</sub>; 30 % (w/v) Saccharose; frisch dazu geben: 1x Proteaseinhibitor Cocktail; 40 mM Tetra-Natriumpyrophosphat, 1 % Triton X-100; 1 mM DTT; 2 µM Cytochalasin A

Saccharoselösungen die für den Saccharosegradienten verwendet wurden: 10 mM Na-PIPES, pH 6.9; 2 mM MgCl<sub>2</sub>; Saccharose (50% bzw. 80%); frisch dazu geben: 1x Proteaseinhibitor Cocktail; 0.1% Triton X-100; 2 mM DTT

1x Proteaseinhibitor Cocktail: 1 mM Pefabloc SC; 25 µg/ml Leupeptin; 10 µg/ml Tosyl-arginin-methylester; 10 µg/ml Soybean Trypsin Inhibitor; 1 µg/ml Aprotinin; 1 µg/ml Pepstatin; 2 mM Benzamidin; 1 mM Na-ATP

### 4.3.10 Expression von Fusionsproteinen in Bakterien

Die MBP-Fusionsproteine wurden in den *E. coli* Stämmen *Rosetta* und *DH5α* exprimiert. Dafür wurde 50 ml Vorkultur in LB<sub>Amp</sub>-Medium über Nacht unter Schütteln bei 37°C inkubiert und am nächsten Morgen auf zwei Schikanekolben mit je 400 ml vorgewärmten LB<sub>Amp</sub>-Medium (mit 10 mM Glukose) aufgeteilt. Weiter 2-3 Stunden inkubierte die Zellsuspension bei 37°C bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,6-1,0. Nach Induktion der Proteinexpression durch den Zusatz von IPTG (0,3 M Endkonzentration) wurden die Zellen für weitere 4-6 h bei 21°C geschüttelt. Die Zellen wurden durch Zentrifugation bei 4000 rpm (Hettich Rotanta 460R, 5645 Rotor) geerntet. Die erhaltenen Pellets wurden in 15 ml TE Puffer resuspendiert und bei -20°C gelagert.

#### **4.3.11 Aufreinigung bakteriell exprimierter Proteine (MBP-Fusionsproteine)**

Um eine Proteindegradation zu verhindern, wurden alle folgenden Schritte auf Eis und mit eisgekühlten Puffern bzw. Geräten durchgeführt. Nach dem Auftauen des Bakterienpellets aus Abschnitt 4.3.10 wurde dieses mit einem UP50H Sonicator (Dr. Hielscher GmbH, Teltow; Amplitude 100%, Cycle 0,6-0,7) für 3 min sonifiziert. Die unlösliche Fraktion wurde durch Zentrifugation für 30 min bei 20000 rpm (Beckman Avanti JE Zentrifuge, JA-25.50 Rotor, 4°C) pelletiert. Der Überstand wurde mit NaCl (100 mM Endkonzentration) supplementiert und vorsichtig auf eine Säule mit 1ml Amyloseharz (NEB, Ipswich, MA, USA) aufgetragen. Die Flussrate für die Bindung des MBP-Fusionsproteins an das Amyloseharz wurde auf einen Tropfen pro 10 s eingestellt. Danach wurde die Säule mit dem gebundenen Protein zweimal mit 10ml Säulenpuffer und einmal mit 10ml PBS gewaschen. Mit dem Zusatz von 10 mM Maltose in PBS wurde das Fusionsprotein in 500µl Fraktionen eluiert (1 Tropfen pro 10 s). Bei einer Verwendung des MBP-Fusionsproteins für eine Antikörperaufreinigung wurde ein NHS Kopplungspuffer statt PBS für die Aufreinigung verwendet. Die Konzentration der Proteinfractionen wurde anschließend gemessen (4.3.2) und die Reinheit der Proteinaufreinigung mittels SDS-Page (4.3.4) untersucht. Nach dem Gebrauch wurde die Säule mit 20%igem Ethanol in MBP-Säulenpuffer gewaschen und bei 4°C in MBP/ Ethanol gelagert.

MBP Säulenpuffer: 200 mM NaCl; 10 mM Tris/HCl, pH 7.5; 1 mM EDTA

NHS Kopplungspuffer: 0.2 M NaHCO<sub>3</sub>; 0.5 M NaCl; pH 8.3

#### **4.3.12 Herstellung von polyklonalen Antiseren aus Kaninchen**

Nach der Expression (4.3.10) und der Aufreinigung (4.3.11) des Fusionsproteins MBP-CP91 (CP91-Volllänge) wurden die verwendbaren Proteinfractionen auf 1mg/ml mit Centricon-Säulen YM-50 (Millipore, Billerica, MA, USA) aufkonzentriert. Anschließend wurden die konzentrierten Proben als Antigen für eine Immunisierung von zwei Kaninchen durch die Firma Biogenes GmbH (Berlin) nach einem Standardprotokoll verwendet. Pro Tier erfolgten 4-5 Applikationen des Antigens. Die generierten Seren trafen nach 1 bzw. 2 Monaten ein und wurden durch Immunfluoreszenz und Western Blot auf Spezifität getestet. Die Seren beider Kaninchen lieferten einen spezifischen Nachweis des CP91-Proteins. Das Serum des Tiers 39 wurde für die Affinitätsaufreinigung (4.3.13) ausgewählt.

#### **4.3.13 Aufreinigung von Antikörpern**

##### Kovalente Bindung des MBP-Fusionsproteins an Sepharose

0,5 mg MBP-Fusionsprotein (MBP-CP91) wurde für die Aufreinigung des Antikörpers aus Serumproben (Tier 39) verwendet. In einem Falcon wurden 1 ml NHS-aktivierte Sepharose (GE Healthcare, Uppsala) mit 1 mM eiskalter HCL gewaschen (Vortex) und abzentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurde die aufkonzentrierte Lösung des MBP-Fusionsproteins hinzugegeben und auf einem Rotator über Nacht bei 21°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Sepharose in ein leeres Säulenröhrchen mit Filter überführt und abwechselnd mit Puffer A und Puffer B gewaschen. Die Inkubationszeiten betragen für Puffer A 15 min, gefolgt von zweimaliger

Inkubation für 60 min, während Puffer B lediglich zum Spülen der Sepharosesäule verwendet wurde. Anschließend wurde die Sepharosesäule mehrmals mit TBS gewaschen. Zu diesem Zeitpunkt konnte die Säule bei 4 °C in TBS 0,1 % NaN<sub>3</sub> gelagert werden.

### Antikörperaufreinigung

Vor dem Gebrauch wurde die Sepharosesäule dreimal mit TBS gewaschen. Für die Aufreinigung der Antikörper wurde das Serum 1:10 in TBS verdünnt und anschließend auf die Sepharosesäule gegeben. Die Flussrate wurde auf ein Tropfen pro 10 Sekunden begrenzt. Die Säule wurde danach gründlich mit PBS gewaschen. Die spezifischen Antikörper wurden mit 100 mM Glycin pH 2,7 zu Fraktionen von 600 µl eluiert und sofort mit 1 M Tris/HCL pH 9,5 neutralisiert. Die Konzentration der Antikörperfraktionen wurde anschließend gemessen (4.3.2), die Spezifität auf Immunoblots getestet und die Reinheit der Antikörper mittels SDS-Page (4.3.4) bestätigt.

Puffer A: 1M Tris/Cl; 0.5 M NaCl; pH 8.5

Puffer B: 0.1 M Natriumacetat; 0.5 M NaCl; pH 4.0

## 4.4 Zellbiologische Methoden

### 4.4.1 Kultivierung und Konservierung von *E.coli*

*E. coli* Zellen wurden bei 37°C in Schüttelkultur (240rpm) unter Verwendung von LB-Medium kultiviert oder auf LB-Agarplatten entsprechend dem Standardprotokoll (Sambrook, 2001). Für die Selektion transformierter *E.coli* Klone wurde das Medium mit 100 µg/ml Ampicillin supplementiert. Für eine Langzeitlagerung selektierter Stämme wurde eine gleiche Menge an *E. coli* Schüttelkultur mit Einfriermedium versetzt und bei -70°C eingefroren.

LB Medium: 10 g/l Trypton; 5 g/l Hefeextrakt; 10 g/l NaCl; pH 7.0

LB Agar Platten: LB-Medium versetzt mit 1.5 % Agar

Einfriermedium: 16 g/l Trypton; 10 g/l Hefeextrakt; 5 g/l NaCl; 70 % Glycerol

Die Expression von Plasmiden, bei denen höhere Bakterienzellichten benötigt werden oder bei denen die Bakterien zu Rekombination neigen, wurde Terrific Broth-Medium, kurz TB-Medium (Sambrook, 2001), verwendet.

TB-Medium:

900 ml einer Lösung aus 13,2 g/l Trypton; 26,4 g/l Hefeextrakt und 4,4 ml Glycerin wurden mit 100 ml eines Puffers, bestehend aus 0,17 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> und 0,72 M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, gemischt. Beide Lösungen müssen vor dem Mischen separat autoklaviert werden.

### 4.4.2 Kultivierung und Konservierung von *K.aerogenes*

*Klebsiella aerogenes* wurde bei 37 °C auf SM-Platten bzw. in Schüttelkultur kultiviert oder bei 21°C zur Co-Kultivierung mit *Dictyostelium*.

SM-Agar Platten:

10 g/l Pepton (Oxoid); 1 g/l Hefeextrakt (Oxoid); 10 g/l Glucose; 20 g/l Bacto Agar; 1.6 g/l  $K_2HPO_4$ ; 2.2 g/l  $KH_2PO_4$ ; 1 g/l  $MgSO_4$ ; pH 6.5

### 4.4.3 Kultivierung und Konservierung von *Dictyostelium* Zellen

Axenisch wachsende *Dictyostelium* Zellen wurden als Schüttelkultur bei 150 rpm in HL5c Medium auf einem Certomat R Schüttler (Sartorius, Göttingen) oder als adhärenzte Kultur in Zellkulturflaschen bei 21°C kultiviert. Für die Selektion von Mutanten wurde Blastizidin S (4 µg/ml) und/oder G418 (10 µg/ml) zugefügt. Die maximale Zelldichte von *Dictyostelium* Zellen in Schüttelkultur betrug nicht mehr als  $4 \times 10^6$  Zellen/ml um phänotypische Veränderungen zu vermeiden. Alternativ erfolgte die Anzucht von *Dictyostelium* Zellen auf einem *Klebsiella* Bakterienrasen unter Verwendung von SM-Agar-Platten. Diese Methode wurde entweder zum Vereinzeln der *Dictyostelium*-Klone, zur Regulation der Expression von GFP-Fusionsproteinen (G418 Resistenz) oder für mutante *Dictyostelium* Stämme verwendet, die Schwierigkeiten beim Wachstum in Flüssigkultur hatten. *Dictyostelium* Sporen, die als Reaktion auf Nahrungsmangel gebildet werden, können eingefroren und für einige Jahre gelagert werden. Damit das möglich ist, wurden axenisch wachsende *Dictyostelium* Zellen geerntet und mit Phosphatpuffer gewaschen, um überschüssige Medienreste zu entfernen. Nach dem Resuspendieren der Zellen in Phosphatpuffer wurden ~500 µl der Zellsuspension mit einer Dichte von  $2-3 \times 10^8$  Zellen/ml auf Phosphatagarplatten ausplattiert. Nach der Reifung der Fruchtkörper wurden die Sporen mit 4ml sterilem Phosphatpuffer pro Platte geerntet und bei -70°C gelagert. Für die Anzucht axenisch wachsender *Dictyostelium* Kulturen von eingefrorenen Sporen wurden 100 µl der Sporen bei Raumtemperatur aufgetaut und in 5 ml HL5c Medium resuspendiert.

#### HL5c Medium:

5 g/l Hefeextrakt (Difco); 2.5 g/l Bacto Trypton (Difco); 2.5 g/l Casein Pepton (Merck); 5 g/l Proteose Pepton (Oxoid); 10 g/l Glucose; 1.2 g/l  $KH_2PO_4$ ; 0.35 g/l  $Na_2HPO_4$ ; pH 6.5

Phosphatagarplatten: 14.6 mM  $KH_2PO_4$ ; 2 mM  $Na_2PO_4$ ; 15 g/l Bacto Agar; pH 6.0

### 4.4.4 Wachstumsversuch

In einem Wachstumsexperiment wurde überprüft ob sich eine Mutation auf die Wachstumsgeschwindigkeit der Mutante im Vergleich zum Kontrollstamm auswirkt. In einem dreifachen Ansatz betrug die Ausgangszellkonzentration jeweils  $5 \times 10^4$  Zellen/ml in einem Gesamtvolumen von 25 ml pro Ansatz. Anschließend erfolgte nach ausgewählten Zeitabständen die Bestimmung der Zelldichte mit einer Neubauer *improved* Zählkammer. Die Kulturen sollten in 24 h mindestens zweimal mit einem Abstand von mindestens 8 h gezählt werden. Das Experiment wurde nach Erreichen der stationären Phase ( $2 \times 10^7$  Zellen/ml) beendet. Die Auswertung und grafische Darstellung erfolgte unter Verwendung von Microsoft Excel 2007.

## 4.5 Mikroskopische Methoden

### 4.5.1 Fixierung und indirekte Immunfluoreszenz von Dictyostelium Zellen

Die Zellen wurden aus adhären wachsender Kultur oder aus Schüttelkultur geerntet und mit Phosphatpuffer auf eine Dichte von  $5-10 \times 10^5$  Zellen/ml verdünnt. Die Zellsuspension wurde auf 12 mm Deckgläser transferiert und für mindestens 15 Minuten bei 22 °C oder über Nacht für 24 h inkubiert. Alternativ wurden Zellen unter sterilen Bedingungen auf 12 mm Deckgläsern in 24 Well Platten herangezogen. Das geschah besonders bei Zellen (hier CP91-RNAi Klone) die aufgrund genetischer Manipulation schlecht am Substrat haften blieben. Direkt vor der Fixierung wurde die Flüssigkeit abgesaugt.

#### Glutaraldehydfixierung

Die Zellen wurden bei Raumtemperatur für 5 min mit jeweils 1 ml Fixierlösung, bestehend aus 50 % PHEM-Puffer und frisch zugesetztem 0,5 % Glutaraldehyd bzw. 0,5 % Triton X-100, inkubiert. Nach dreimaligem Waschen für 5 min mit Phosphatpuffer wurden die Zellen mit einer frisch angesetzten Borhydridlösung (1 mg/ml Borhydrid in Phosphatpuffer) für mindestens 10 min inkubiert. Danach folgte je ein Waschgang mit Phosphatpuffer und PBS, so dass die Zellen für die Immunfärbung verwendet werden konnten.

#### Methanolfixierung

100 % Methanol (-20°C) wurde für 1-2 min bei -20 °C zu den Zellen gegeben. Die Zellen wurden anschließend zweimal mit PBS gewaschen und konnten nun für die Immunfärbung verwendet werden.

Die fixierten Präparate wurden in eine feuchte Kammer überführt, um eine Austrocknung zu verhindern. Für die Immunfärbung wurden die Präparate mit einem oder einer Mischung aus zwei verschiedenen primären Antikörpern (für Doppelfärbungen), verdünnt in Antikörper-Verdünnungs-Puffer (AKV) bei Raumtemperatur 1-3 h inkubiert. Alternativ konnten auch Seren oder Hybridomazellüberstände verwendet werden. Nicht gebundene Antikörper wurden durch drei fünfminütige Waschschrte mit PBS entfernt. Danach wurden die Präparate mit den sekundären Antikörper (Alexa 488-, Alexa 568- oder Cy3-Konjugate, nach Hersteller-Angaben verdünnt) eine Stunde bei Dunkelheit inkubiert. Für die Analyse von schwachen GFP-Signalen wurde ein zusätzlicher GFP-Booster Atto488 (Chromotek, Martinsried) zu dem sekundären Antikörper gegeben. Die Präparate wurden anschließend zweimal mit PBS gewaschen und zur Markierung der DNA für 15 min in einer DAPI-Färbelösung (1 mg/ml in PBS) inkubiert. Nach einem letzten fünfminütigen Waschgang mit PBS erfolgte die Einbettung der Präparate mit Mowiol auf einen vorbereiteten Objektträger. Die Präparate wurden unter Lichtabschluss und bei 4 °C aufbewahrt.

Antikörper-Verdünnungs-Puffer (AKV): 0,02 % NaN<sub>3</sub> in 0,1 % BSA Lösung

PHEM Puffer (Schliwa und van Blerkom, 1981):

60 mM PIPES; 25 mM HEPES; 10 mM EGTA; 2 mM MgCl<sub>2</sub>; pH 6,9

#### 4.5.2 Weitfeld- und konfokale Spinning-Disk-Mikroskopie

Die hergestellten Immunfluoreszenz-Präparate wurden mit einem Zeiss Axiovert 200M Cell-Observer HS System (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Jena) analysiert und dokumentiert. Ein Sutter DG-4 Wellenlängenwechsler mit Xenonlampe (Sutter Instruments, Novato, CA, USA) bzw. eine HXP120C Quecksilberdampflampe dienten als Lichtquelle. Das System ist mit einer Piezo-Bühne ASI (Applied Scientific Instruments, Eugene, OR, USA) ausgestattet. Für die Aufnahmen fixierter Zellen wurde eine Zeiss AxioCam MRm Rev. 3 CCD-Kamera, für Imaging Aufnahmen eine AxioCam HSm CCD-Kamera verwendet. Bei der Aufnahme von fixierten Zellen wurde das 100x/1,4 PlanApo Objektiv oder das 40x/1,3 Plan-Neofluar Objektiv verwendet. Live-Cell-Imaging Aufnahmen erfolgten unter Verwendung des 63x/1,3 LCI Plan-Neofluar Objektivs. Alle fixierten Zellen wurden in Bildstapel mit einem Abstand von 0,100  $\mu\text{m}$  bis 0,250  $\mu\text{m}$  von Bild zu Bild (Z-Ebene) aufgenommen. Die Nachbearbeitung der Rohdaten erfolgte mittels iterativer Dekonvolution mit einer berechneten Point Spread Function (PSF). Zur Berechnung der PSF wurde ein Präparat mit 200 nm großen fluoreszierenden Beads (TetraSpeck™ beads, Invitrogen) verwendet. Von diesem Präparat wurden mindestens 120 Bildstapel mit einem Abstand von 0,050  $\mu\text{m}$  aufgenommen. Die PSF wurde anschließend aus den Rohdaten und der PSF-Erzeugen-Funktion von Axio-Vision berechnet. Eine Maximalintensitätsprojektion zur Darstellung der Bilder wurde mit MBF ImageJ durchgeführt. Für die Aufnahme von lebenden Zellen mit dem Weitfeldsystem wurde ein Bildabstand von 1  $\mu\text{m}$  für die einzelnen Ebenen gewählt und die Rohdaten mit der Dekonvolutionsmethode „inverse-Filter“ berechnet. Alternativ wurden die Zellen mit einem konfokalem Spinning-Disk-System (CellObserver SD, Carl Zeiss Microimaging GmbH Göttingen, Germany) aufgenommen, welches mit 2 Evolve EM-CCD Kameras (Photometrics, Tucson, AZ, USA) und einem Rapp UGA-40-2L Galvo Scanner (Rapp Optoelectronics, Hamburg, Germany) sowie einem 473 nm punktfokussierten Diodenlaser (Rapp Optoelectronics, Hamburg, Germany) ausgestattet ist. Für Live-Cell-Imaging Aufnahmen wurden ungefähr  $1 \times 10^6$  Zellen in ein Glasbodenschälchen überführt (Fluoridish, WPI, Berlin, Germany). Nach einer mindestens 15-minütigen Inkubationszeit, in der sich die Zellen am Boden absetzten, wurde das Medium vorsichtig abgesaugt und durch LoFlo Medium (Formedium, Hunstanton, UK) ersetzt. Allen Lebendpräparaten wurde 2 mg/ml Ascorbinsäure (Endkonzentration) als Radikalfänger zur Verminderung phototoxischer Effekte hinzugegeben.

#### 4.5.3 FRAP-Experiment (*Fluorescence Recovery after Photobleaching*)

Bei FRAP-Experimenten und Analysen der Mitosen lebender Zellen wurde die Agar-Overlay Technik (Fukui *et al.*, 1987) angewendet. Ohne die intrazellulären Bewegungsprozesse zu beeinflussen wurden die Zellen durch eine Agarschicht flach gedrückt und in ihrer Bewegung eingeschränkt. Für die 4D-FRAP-Bildaufnahmen (Abschnitt 2.1.6, Abbildung 10B) wurden 4 Bildstapel pro Minute (bei einer Bildrate von 10 fr/s) bestehend aus 7 Ebenen aufgenommen und einem Positionsabstand von 1  $\mu\text{m}$  zwischen den Z-Ebenen gewählt. Dabei wurde ein 100x/1,4 PlanApo-Objektiv verwendet. Der Bleichvorgang einer definierten Region wurde manuell durch die „click and fire“-Funktion des über

die RAPP-Software gesteuerten 473 nm punktfokussierten Lasers ausgeführt. Alle Einstellungen wurden für die FRAP-Experimente konstant gehalten um verschiedene Aufnahmen vergleichen zu können. Für die Analyse des Bleichvorgangs wurden die FRAP-Bildaufnahmen mit Hilfe von ImageJ unter Anwendung der maximalen Intensitätsprojektion auf eine Ebene gebracht und ausgewertet. Die Messungen der Fluoreszenzintensität begannen 2 Zeiteinheiten vor dem eigentlichen Bleichvorgang. Für jeden Zeitpunkt wurde die Intensität des Signals der untersuchten Centrosomen, der Referenzcentrosomen (zur Bestimmung des „Autobleachings“ während der Aufnahme) und auch des Hintergrunds in einer definierten, konstant gehaltenen „Region-of-interest“ ROI (5x5 Pixel) gemessen. Die Bewegung der Centrosomen wurde durch eine Repositionierung der ROI kompensiert. Die Auswertung der Daten aus gemessener Fluoreszenzintensität und Fläche erfolgte nach dem Protokoll von Samereier *et al.* (Methods Cell Biol, 2010. 97: p. 341-57) in Microsoft Excel 2007. Für die Berechnungen wurde ein linearer Bleichvorgang angenommen. Alle Software-Anwendungen wurden mit AxioVision 4.8 und MacBiophotonics Image J v.1.42l durchgeführt.

Die FRAP-Filme in Abbildung 10A im Abschnitt 2.1.6 wurden von Prof. Dr. Ralph Gräf an einem ZeissLSM710 Laser Scanning Konfokalmikroskop, ausgestattet mit einem EC Zeiss PlanApo 1.4/63x Objektiv durchgeführt. Für diese Bildaufnahme wurden 6 Bildstapel pro Minute (Bildrate von 5 fr/s) bestehend aus 5 Ebenen aufgenommen und einem Positionsabstand von 0,8 µm zwischen den Z-Ebenen gewählt. Der Bleichvorgang erfolgte mit Hilfe eines 488 nm Argon-Lasers in 40 Iterationen, bei Höchstgeschwindigkeit und maximaler Laserintensität. Die Software Carl Zeiss ZEN 2009 wurde für die Aufnahmen benutzt.

#### **4.5.4 Bestimmung des DNA-Gehalts von Dictyostelium Zellen**

Die Bestimmung des DNA-Gehalts erfolgte mittels Messung der DAPI-Färbungsintensitäten von Zellkernen. Unter Verwendung von ImageJ wurde die DAPI-Intensität in Bildern bei einer *Maximumintensitätsprojektion* gemessen. Die Auswertung erfolgte mit Microsoft Excel 2007. Das Produkt aus Intensität mal Fläche ergab den Wert für den DNA-Gehalt.

#### **4.5.5 Bestimmung der Zellfläche und Kernfläche von Dictyostelium Zellen**

Für einen Größenvergleich von Zellen bzw. Kernen wäre eine Auswertung der respektiven Volumina optimal. Aufgrund der verwendeten Software und der Bildaufnahmeparameter war eine Bestimmung der Volumina nicht ohne weiteres möglich. Daher erfolgte die Messung der Zell- bzw. Kernfläche im zweidimensionalen Bild von Phasenkontrastaufnahmen mit dem Konturmessungstool der Axiovision Software 4.8, um eine Abschätzung der Veränderungen vornehmen zu können. Die Auswertung der Messdaten erfolgte anschließend mit Microsoft Excel 2007.

## 5 Literaturverzeichnis

- Adl, S.M., Simpson, A.G., Lane, C.E., Lukes, J., Bass, D., Bowser, S.S., Brown, M.W., Burki, F., Dunthorn, M., Hampl, V., Heiss, A., Hoppenrath, M., Lara, E., Le Gall, L., Lynn, D.H., McManus, H., Mitchell, E.A., Mozley-Stanridge, S.E., Parfrey, L.W., Pawlowski, J., Rueckert, S., Shadwick, R.S., Schoch, C.L., Smirnov, A., Spiegel, F.W., 2012. The revised classification of eukaryotes. *J. Eukaryot. Microbiol.* 59, 429–493.
- Agromayor, M., Martin-Serrano, J., 2013. Knowing when to cut and run: mechanisms that control cytokinetic abscission. *Trends Cell Biol.* 23, 433–441.
- Akiyoshi, B., Gull, K., 2013. Evolutionary cell biology of chromosome segregation: insights from *trypanosomes*. *Open Biol.* 3, 130023.
- Alieva IB, Uzbekov RE. The centrosome is a polyfunctional multiprotein cell complex. *Biochemistry (Mosc).* 2008 Jun;73(6):626–43.
- Andersen JS, Wilkinson CJ, Mayor T, Mortensen P, Nigg EA, Mann M. 2003 Proteomic characterization of the human centrosome by protein correlation profiling. *Nature* 426, 570–574.
- Avidor-Reiss T, Maer AM, Koundakjian E, Polyanovsky A, Keil T, Subramaniam S, Zuker CS. 2004 Decoding cilia function: defining specialized genes required for compartmentalized cilia biogenesis. *Cell* 117, 527–539.
- Azimzadeh, J., 2014. Exploring the evolutionary history of centrosomes. *Philos. Trans. R. Soc. London, Ser. B: Biol. Sci.* 369
- Azimzadeh J, Bornens M. 2007 Structure and duplication of the centrosome. *J. Cell Sci.* 120, 2139–2142.
- Bastos RN, Barr FA. Plk1 negatively regulates Cep55 recruitment to the midbody to ensure orderly abscission. *J Cell Biol.* 2010 Nov 15;191(4):751–60.
- Batsios, P., Meyer, I., Graf, R., (2016). Proximity-Dependent Biotin Identification (BioID) in *Dictyostelium* Amoebae. *Methods Enzymol* 569, 23–42.
- Bettencourt-Dias, M., Rodrigues-Martins, A., Carpenter, L., Riparbelli, M., Lehmann, L., Gatt, M.K., Carmo, N., Balloux, F., Callaini, G., Glover, D.M., (2005). SAK/PLK4 is required for centriole duplication and flagella development. *Curr Biol* 15, 2199–2207.
- Blau-Wasser R, Euteneuer U, Xiong H, (2009) CP250, a novel acidic coiled-coil protein of the *Dictyostelium* centrosome, affects growth, chemotaxis, and the nuclear envelope. *Molecular Biology of the Cell* 20: 4348–4361.
- Bollag D M, Rozycki M D, Edelstein S J. Gel electrophoresis under nondenaturing conditions. In: Bollag D M, Rozycki M D, Edelstein S J, editors. *Protein methods*. 2nd ed. New York, N.Y: John Wiley & Sons, Inc.; 1996. pp. 155–172.
- Bornens M. 2012 The centrosome in cells and organisms. *Science* 335, 422–426.
- Caetano-Anolles, G., Nasir, A., Zhou, K., Caetano-Anolles, D., Mittenthal, J.E., Sun, F.J., Kim, K.M., 2014. Archaea: the first domain of diversified life. *Archaea* 2014, 590214.
- Carvalho-Santos, Z., Azimzadeh, J., Pereira-Leal, J.B., Bettencourt-Dias, M., 2011. Evolution: tracing the origins of centrioles, cilia, and flagella. *J. Cell Biol.* 194, 165–175.
- Chen, Z., Indjeian, V. B., McManus, M., Wang, L., and Dynlacht, B. D. (2002). CP110, a cell cycle-dependent CDK substrate, regulates centrosome duplication in human cells. *Dev. Cell* 3, 339–350.
- Chin, D., and Means, A. R. (2000). Calmodulin: a prototypical calcium sensor. *Trends Cell Biol.* 10, 322–328.
- Crisp, M., Liu, Q., Roux, K., Rattner, J.B., Shanahan, C., Burke, B., Stahl, P.D., Hodzic, D., 2006. Coupling of the nucleus and cytoplasm: role of the LINC complex. *J. Cell Biol.* 172, 41–53.
- Cunha-Ferreira, I., Rodrigues-Martins, A., Bento, I., Riparbelli, M., Zhang, W., Laue, E., Callaini, G., Glover, D.M., Bettencourt-Dias, M., (2009). The SCF/Slimb ubiquitin ligase limits centrosome amplification through degradation of SAK/PLK4. *Curr Biol* 19, 43–49.
- Dauderer C., Schliwa M., Graf R. *Dictyostelium discoideum*: a promising centrosome model system. *Biol. Cell.* 1999;91:313–320.
- Dauderer C and Gräf R (2002) Molecular analysis of the cytosolic *Dictyostelium* gamma-tubulin complex. *European Journal of Cell Biology* 81: 175–184.
- Dauderer C, Schliwa M and Gräf R (2001) *Dictyostelium* centrin-related protein (DdCrip), the most divergent member of the centrin family, possesses only two EF hands and dissociates from the centrosome during mitosis. *European Journal of Cell Biology* 80: 621–630.
- De Souza, C.P., Osmani, S.A., 2007. Mitosis, not just open or closed. *Eukaryot. Cell* 6, 1521–1527.
- Dicthenberg, J.B., et al., Pericentrin and gamma-tubulin form a protein complex and are organized into a novel lattice at the centrosome. *J Cell Biol.* 1998. 141(1): p. 163–74.
- Ding R, West RR, Mophew M, Oakley BR and McIntosh JR (1997) The spindle pole body of *Schizosaccharomyces pombe* enters and leaves the nuclear envelope as the cell cycle proceeds. *Molecular Biology of the Cell* 8: 1461–1479.
- Dinkel, H., Van Roey, K., Michael, S., Davey, N.E., Weatheritt, R.J., Born, D., Speck, T., Kruger, D., Grebnev, G., Kuban, M., Strumillo, M., Uyar, B., Budd, A., Altenberg, B., Seiler, M., Chemes, L.B., Glavina, J., Sanchez, I.E., Diella, F., Gibson, T.J., 2014. The eukaryotic linear motif resource ELM: 10 years and counting. *Nucleic Acids Res.* 42, D259–266.
- Doxsey, S. (2001). Re-evaluating centrosome function. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2, 688–698.
- Ehrhardt, D.W., Straighten up and fly right: microtubule dynamics and organization of non-centrosomal arrays in higher plants. *Curr Opin Cell Biol.* 2008. 20(1): p. 107–16.
- Euteneuer U, Gräf R, Kube-Grandenath E and Schliwa M (1998) *Dictyostelium* gamma-tubulin: molecular characterization and ultrastructural localization. *Journal of Cell Science* 111: 405–412.
- Fabbro, M. et al. (2005). Cdk1/Erk2- and Plk1-dependent phosphorylation of a centrosome protein, Cep55, is required for its recruitment to midbody and cytokinesis. *Dev. Cell* 9, 477–488
- Faix, J., et al., A rapid and efficient method to generate multiple gene disruptions in *Dictyostelium discoideum* using a

## Literaturverzeichnis

- single selectable marker and the Cre-loxP system. *Nucleic Acids Res.* 2004. 32(19): p. e143.
- Flory, M.R., et al.**, Identification of a human centrosomal calmodulin-binding protein that shares homology with pericentrin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000. 97(11): p.5919-23.
- Fong, K.W., Choi, Y.K., Rattner, J.B., Qi, R.Z.**, 2008. CDK5RAP2 is a pericentriolar protein that functions in centrosomal attachment of the  $\gamma$ -tubulin ring complex. *Mol. Biol. Cell* 19, 115–125.
- Fry, A.M., Mayor, T., Meraldi, P., Stierhof, Y.D., Tanaka, K., Nigg, E.A.**, (1998). C-Nap1, a novel centrosomal coiled-coil protein and candidate substrate of the cell cycle-regulated protein kinase Nek2. *J Cell Biol* 141,1563-1574.
- Fu, J., Hagan, I.M., Glover, D.M.**, (2015). The centrosome and its duplication cycle. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 7, a015800.
- Fukui, Y., S. Yumura, and T.K. Yumura.** Agar-overlay immunofluorescence: high resolution studies of cytoskeletal components and their changes during chemotaxis. *Methods Cell Biol*, 1987. 28: p. 347-56.
- Gräf R, Euteneuer U, Ho TH and Rehberg M** (2003) Regulated expression of the centrosomal protein DdCP224 affects microtubule dynamics and reveals mechanisms for the control of supernumerary centrosome number. *Molecular Biology of the Cell* 14: 4067–4074.
- Gräf R, Euteneuer U, Ueda M and Schliwa M** (1998) Isolation of nucleation-competent centrosomes from *Dictyostelium discoideum*. *European Journal of Cell Biology* 76: 167–175.
- Gräf, R., C. Daunderer, and M. Schliwa,** *Dictyostelium* DdCP224 is a microtubule associated protein and a permanent centrosomal resident involved in centrosome duplication. *J Cell Sci*, 2000. 113 ( Pt 10): p. 1747-58.
- Gräf, R., Batsios, P., Meyer, I.**, (2015). Evolution of centrosomes and the nuclear lamina: Amoebozoan assets. *Eur J Cell Biol* 94, 249-256.
- Gräf, R** (2002) DdNek2, the first non-vertebrate homologue of human Nek2, is involved in the formation of microtubule-organizing centers. *Journal of Cell Science* 115: 1919–1929.
- Gräf, R.**, 2015. Microtubule Organization in *Dictyostelium*, *Encyclopedia of LifeSciences (ELS)*. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester,
- Gromley, A., Jurczyk, A., Sillibourne, J., Halilovic, E., Mogensen, M., Groisman, I., Blomberg, M., and Doxsey, S.** (2003). A novel human protein of the maternal centriole is required for the final stages of cytokinesis and entry into S phase. *J. Cell Biol.* 161, 535–545.
- Gromley, A., Yeaman, C., Rosa, J., Redick, S., Chen, C. T., Mirabelle, S., Guha, M., Sillibourne, J., and Doxsey, S. J.** (2005). Centriolin anchoring of exocyst and SNARE complexes at the midbody is required for secretory-vesicle-mediated abscission. *Cell* 123, 75–87.
- Haney, P., Konisky, J., Koretke, K.K., Luthey-Schulten, Z. and Wolynes, P.G.** (1997) *Proteins*, 28, 117–130.
- Haren L, Stearns T, Lüders J** (2009) Plk1-Dependent Recruitment of c-Tubulin Complexes to Mitotic Centrosomes Involves Multiple PCM Components. *PLoS ONE* 4(6): e5976.
- Hershko A, Ciechanover A** The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem.* 1998;67:425-79.
- Hinchcliffe, E. H., Miller, F. J., Cham, M., Khodjakov, A., and Sluder, G.** (2001). Requirement of a centrosomal activity for cell cycle progression through G1 into S phase. *Science* 291, 1547–1550.
- Hirono M.** Cartwheel assembly. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2014 Sep 5;369(1650).
- Hjelmeland, Leonard M. and Chrambach, Andreas** Electrophoresis and electrofocusing in detergent containing media: A discussion of basic concepts *Electrophoresis* 1981, 2, 1-11
- Jaspersen SL and Winey M** (2004) The budding yeast spindle pole body: structure, duplication, and function. *Annual review of cell and developmental biology* 20: 1–28.
- Kaller, M., Euteneuer, U., Nellen, W.**, 2006. Differential effects of heterochromatin protein 1 isoforms on mitotic chromosome distribution and growth in *Dictyostelium discoideum*. *Eukaryot. Cell* 5, 530–543.
- Kastner PM, Schleicher M and Müller-Taubenberg A** (2011) The NDR family kinase NdrA of *Dictyostelium* localizes to the centrosome and is required for efficient phagocytosis. *Traffic* 12: 301–312.
- Keryer, G., Witczak, O., Delouee, A., Kemmer, W. A., Rouillard, D., Tasken, K., and Bornens, M.** (2003). Dissociating the centrosomal matrix protein AKAP450 from centrioles impairs centriole duplication and cell cycle progression. *Mol. Biol. Cell* 14, 2436–2446.
- Khodjakov, A., Rieder, C.L.**, 2001. Centrosomes enhance the fidelity of cytokinesis in vertebrates and are required for cell cycle progression. *J. Cell Biol.* 153,237–242.
- Krüger, A., Batsios, P., Baumann, O., Luckert, E., Schwarz, H., Stick, R., Meyer, I., Gräf, R.**, 2012. Characterization of NE81, the first lamin-like nucleoskeleton protein in a unicellular organism. *Mol. Biol. Cell* 23, 360–370.
- Kim TS, Park JE, Shukla A, Choi S, Murugan RN, Lee JH, Ahn M, Rhee K, Bang JK, Kim BY, Loncarek J, Erikson RL, Lee KS.** Hierarchical recruitment of Plk4 and regulation of centriole biogenesis by two centrosomal scaffolds, Cep192 and Cep152. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013 Dec 10;110(50):E4849-57.
- Kimble, M., et al.**, Microtubule organization and the effects of GFP-tubulin expression in *Dictyostelium discoideum*. *Cell Motil Cytoskeleton*, 2000. 47(1): p. 48-62.
- Kleylein-Sohn, J., Westendorf, J., Le Clech, M., Habedanck, R., Stierhof, Y.D., Nigg, E.A.**, (2007). Plk4-induced centriole biogenesis in human cells. *Dev Cell* 13, 190-202.
- Klos Dehring, D.A., Vldar, E.K., Werner, M.E., Mitchell, J.W., Hwang, P., Mitchell, B.J.**, 2013. Deuterosome-mediated centriole biogenesis. *Dev. Cell* 27, 103-112.
- Kõivomägi M, Ord M, Iofik A, Valk E, Venta R, Faustova I, Kivi R, Balog ER, Rubin SM, Loog M.** Multisite phosphorylation networks as signal processors for Cdk1. *Nat Struct Mol Biol.* 2013 Dec;20(12):1415-24.
- Kuhnert O, Baumann O, Meyer I and Gräf R** (2012a) CP55, a novel key component of centrosomal organization in *Dictyostelium*. *Cellular and Molecular Life Sciences* 69: 3651–3664.
- Kuhnert O, Baumann O, Meyer I and Gräf R** (2012b) Functional characterization of CP148, a novel key component for centrosome integrity in *Dictyostelium*. *Cellular and Molecular Life Sciences* 69: 1875–1888.
- Lawo S, Hasegan M, Gupta GD, Pelletier L.** 2012 Subdiffraction imaging of centrosomes reveals higher-order organizational features of pericentriolar material. *Nat. Cell Biol.* 14, 1148–1158.

## Literaturverzeichnis

- Lee HH, Elia N, Ghirlando R, Lippincott-Schwartz J, Hurley JH.** Midbody targeting of the ESCRT machinery by a noncanonical coiled coil in CEP55. *Science*. 2008 Oct 24; 322(5901):576-80.
- Leo M, Santino D, Tikhonenko I, et al.** (2012) Rules of engagement: centrosome-nuclear connections in a closed mitotic system. *Biology Open* 1: 1111–1117.
- Letunic I, Doerks T, Bork P** SMART: recent updates, new developments and status in 2015 *Nucleic Acids Res* 2014;
- Li, C. J., Heim, R., Lu, P., Pu, Y., Tsien, R. Y., and Chang, D. C.** (1999). Dynamic redistribution of calmodulin in HeLa cells during cell division as revealed by a GFP-calmodulin fusion protein technique. *J. Cell Sci.* 112(Pt 10), 1567–1577.
- Rune Linding, Robert B. Russell, Victor Neduva and Toby J. Gibson** GlobPlot: exploring protein sequences for globularity and disorder *Nucl. Acids Res.* (2003) 31 (13):3701-3708.
- Lippincott, J., and Li, R.** (1998). Sequential assembly of myosin II, an IQGAP like protein, and filamentous actin to a ring structure involved in budding yeast cytokinesis. *J. Cell Biol.* 140, 355–366.
- Ma, S., et al.**, Dynein intermediate chain mediated dynein-dynactin interaction is required for interphase microtubule organization and centrosome replication and separation in *Dictyostelium*. *J Cell Biol*, 1999. 147(6): p. 1261-74.
- Mana-Capelli S., Gräf R., Larochelle D.** *Dictyostelium discoideum* CenB Is a Bona Fide Centrin Essential for Nuclear Architecture and Centrosome Stability *Eukaryot Cell*. 2009 Aug; 8(8): 1106–1117. Published online 2009 May 22. doi: 10.1128/EC.00025-09
- McIntosh, J.R.**, Spindle structure and the mechanisms of chromosome movement. *Basic Life Sci*, 1985. 36: p. 197-229.
- Mennella V, Keszthelyi B, McDonald KL, Chhun B, Kan F, Rogers GC, Huang B, Agard DA.** 2012 Subdiffraction-resolution fluorescence microscopy reveals a domain of the centrosome critical for pericentriolar material organization. *Nat. Cell Biol.* 14, 1159–1168. (doi:10.1038/ncb2597)
- Moens PB** (1976) Spindle and kinetochore morphology of *Dictyostelium discoideum*. *Journal of Cell Biology* 68: 113–122.
- Moser, M. J., Flory, M. R., and Davis, T. N.** (1997). Calmodulin localizes to the spindle pole body of *Schizosaccharomyces pombe* and performs an essential function in chromosome segregation. *J. Cell Sci.* 110(Pt 15), 1805–1812.
- Mruk, K., Farley, B.M., Ritacco, A.W., Kobertz, W.R.**, 2014; Calmodulation meta-analysis: Predicting calmodulin binding via canonical motif clustering Published June 16, 2014 // JGP vol. 144 no. 1 105-114 The Rockefeller University Press
- Neujahr, R., Albrecht, R., Kohler, J., Matzner, M., Schwartz, J.M., Westphal, M., and Gerisch, G.** (1998). Microtubule-mediated centrosome motility and the positioning of cleavage furrows in multinucleate myosin II-null cells. *J. Cell Sci.* 111, 1227–1240.
- Nigg, E.A., Stearns, T.**, (2011). The centrosome cycle: Centriole biogenesis, duplication and inherent asymmetries. *Nat Cell Biol* 13, 1154-1160.
- Normand G and King RW** (2010) Understanding cytokinesis failure. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 676: 27–55.
- O'Day, D.H., Budniak, A.**, (2015). Nucleocytoplasmic protein translocation during mitosis in the social amoebozoan *Dictyostelium discoideum*. *Biol Rev Camb Philos Soc* 90, 126-141.
- Osman, M. A., and Cerione, R. A.** (1998). Iqg1p, a yeast homologue of the mammalian IQGAPs, mediates cdc42p effects on the actin cytoskeleton. *J. Cell Biol.* 142, 443–455.
- Pagan, J., Pagano, M.**, (2011). FBXW5 controls centrosome number. *Nat Cell Biol* 13, 888-890.
- Paoletti, A., Moudjou, M., Paintrand, M., Salisbury, J. L., and Bornens, M.** (1996). Most of centrin in animal cells is not centrosome-associated and centrosomal centrin is confined to the distal lumen of centrioles. *J. Cell Sci.*109(Pt 13), 3089–3102.
- Raper, K.B.**, *Dictyostelium discoideum*, a new species of slime mold from decaying forest leaves. *Journal of Agricultural Research*, 1935. 50: p. 0135-0147.
- Rappaport, R.** Establishment of the mechanism of the cytokinesis in animal cells. *Int. Rev. Cytol.* 152, 245-281 (1986)
- Rehberg M and Gräf R** (2002) *Dictyostelium* EB1 is a genuine centrosomal component required for proper spindle formation. *Molecular Biology of the Cell* 13: 2301–2310.
- Reinders Y, Schulz I, Gräf R and Sickmann A** (2006) Identification of novel centrosomal proteins in *Dictyostelium discoideum* by comparative proteomic approaches. *Journal of Proteome Research* 5: 589–598.
- Richardson JS, Richardson DC.** Natural  $\beta$ -sheet proteins use negative design to avoid edge-to-edge aggregation *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Mar 5;99(5):2754-9.
- Rodrigues-Martins, A., Riparbelli, M., Callaini, G., Glover, D.M., Bettencourt-Dias, M.**, (2007). Revisiting the role of the mother centriole in centriole biogenesis. *Science* 316, 1046-1050.
- Roos, U.-P.** Mitosis in the cellular slime mold polysphondylium violaceum. *The journal of cell biology - volume 64*, 1975\_9 pages 480-491
- Salisbury, J. L.** (1995). Centrin, centrosomes, and mitotic spindle poles. *Curr. Opin. Cell Biol.* 7, 39–45.
- Salisbury, J. L., Suino, K. M., Busby, R., and Springett, M.** (2002). Centrin-2 is required for centriole duplication in mammalian cells. *Curr. Biol.* 12, 1287–1292.
- Samereier, M., et al.**, Live cell-imaging techniques for analyses of microtubules in *Dictyostelium*. *Methods Cell Biol*, 2010. 97: p. 341-57.
- Samereier M, Baumann O, Meyer I and Gräf R** (2011) Analysis of *Dictyostelium* TACC reveals differential interactions with CP224 and unusual dynamics of *Dictyostelium* microtubules. *Cellular and Molecular Life Sciences* 68: 275–287.
- Scala C, Tian X, Mehdiabadi NJ, Smith MH, Saxer G, Stephens K, et al.** (2012) Amino Acid Repeats Cause Extraordinary Coding Sequence Variation in the Social Amoeba *Dictyostelium discoideum*. *PLoS ONE* 7(9): e46150.
- Schatten H, Sun QY.** 2010 The role of centrosomes in fertilization, cell division and establishment of asymmetry during embryo development. *Sem. Cell Dev. Biol.* 21, 174–184.
- Schultz, J., Milpetz, F., Bork, P. & Ponting, C.P.** SMART, a simple modular architecture research tool: Identification of signaling domains. *PNAS* 1998; 95: 5857-5864
- Schulz, I., et al.**, An improved method for *Dictyostelium* centrosome isolation. *Methods Mol Biol*, 2006. 346: p. 479-89.

## Literaturverzeichnis

- Schulz I, Erle A, Gräf R, et al.** (2009) Identification and cell cycle-dependent localization of nine novel, genuine centrosomal components in *Dictyostelium discoideum*. *Cell Motility and the Cytoskeleton* 66: 915–928.
- Schulz, I., et al.,** *Dictyostelium* Sun1 is a dynamic membrane protein of both nuclear membranes and required for centrosomal association with clustered centromeres. *Eur J Cell Biol*, 2009. 88(11): p. 621–38.
- Shu, H. B., Li, Z., Palacios, M. J., Li, Q., and Joshi, H. C.** (1995). A transient association of gamma-tubulin at the midbody is required for the completion of cytokinesis during the mammalian cell division. *J. Cell Sci.* 108(Pt 9), 2955–2962.
- Strnad, P., Leidel, S., Vinogradova, T., Euteneuer, U., Khodjakov, A., Gonczy, P.,** (2007). Regulated HsSAS-6 levels ensure formation of a single procentriole per centriole during the centrosome duplication cycle. *Dev Cell* 13, 203–213.
- Swedlow JR.** Quantitative fluorescence microscopy and image deconvolution. *Methods Cell Biol.*2007;81:447–465.
- Takuwa N., Zhou W., Takuwa Y.** (1995) Calcium, calmodulin, and cell cycle progression. *Cell. Signal.*7, 93–104
- Tikhonenko I., Dilip K. Nag, Nora Martin, and Michael P. Koonce.** Kinesin-5 is not essential for mitotic spindle elongation in *Dictyostelium* Cell Motility and the Cytoskeleton 65: 853–862 (2008)
- Tikhonenko, I., Nag, D. K., Robinson, D. N. and Koonce, M. P.** (2009). Microtubulenucleus interactions in *Dictyostelium discoideum* mediated by central motor kinesins. *Eukaryot. Cell* 8, 723–731.
- Tikhonenko, I., Magidson, V., Gräf, R., Khodjakov, A. and Koonce, M. P.** (2012). A kinesin-mediated mechanism that couples centrosomes to nuclei. *Cell. Mol. Life Sci.*
- Tsang WY, Spektor A, Vijayakumar S, Bista BR, Li J, Sanchez I, Duensing S, Dynlacht BD** Cep76, a centrosomal protein that specifically restrains centriole reduplication. *Dev Cell.* 2009 May; 16(5):649–60
- Ueda, M., Schliwa, M., Euteneuer, U.,** 1999. Unusual centrosome cycle in *Dictyostelium*: correlation of dynamic behavior and structural changes. *Mol. Biol. Cell* 10, 151–160.
- Satoru Uzawa, Fei Li, Ye Jin, Kent L. McDonald, Michael B. Braunfeld, David A. Agard, and W. Zacheus Cande** Spindle Pole Body Duplication in Fission Yeast Occurs at the G1/S Boundary but Maturation Is Blocked until Exit from S by an Event Downstream of Cdc10\* *Mol Biol Cell.* 2004 Dec; 15(12): 5219–5230.
- Walker, G., Dorrell, R.G., Schlacht, A., Dacks, J.B.,** 2011. Eukaryotic systematics: a user's guide for cell biologists and parasitologists. *Parasitology* 138,1638–1663.
- Wang, G., Jiang, Q., Zhang, C.,** (2014). The role of mitotic kinases in coupling the centrosome cycle with the assembly of the mitotic spindle. *J Cell Sci* 127, 4111–4122.
- Watanabe K., Chishiro K., Kitamura K., and Suzuki Y.** Proline Residues Responsible for Thermostability Occur with High Frequency in the Loop Regions of an Extremely Thermostable Oligo- 1,6-glucosidase from *Bacillus thermoglucosidasius* KP1006 the journal of biological chemistry vol. 266, No. 36, Issue of December 25, pp . 24287–24294.1991
- Williams, K.L. and P.C. Newell,** A genetic study of aggregation in the cellular slime mould *Dictyostelium discoideum* using complementation analysis. *Genetics*, 1976. 82(2): p. 287–307.
- Williams, T.A., Foster, P.G., Cox, C.J., Embley, T.M.,** 2013. An archaeal origin of eukaryotes supports only two primary domains of life. *Nature* 504,231–236.
- Williamson, M.** The structure and function of proline-rich regions in proteins. *Biochem. J.* (1994) 297, 249–260
- Woese, C.R., Kandler, O., Wheelis, M.L.,** 1990. Towards a natural system of organisms:proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proc. Natl. Acad. Sci.U.S.A.* 87, 4576–4579.
- Yap, K.L., J. Kim, K. Truong, M. Sherman, T. Yuan, M. Ikura.** 2000; Calmodulin target database. *J. Struct. Funct. Genomics.* 1:8–14. doi:10.1023/A:1011320027914
- Yap, K.L., et al.,** Diversity of conformational states and changes within the EF-hand protein superfamily. *Proteins*, 1999. 37(3): p. 499–507.
- Zhu F, Lawo S, Bird A, Pinchev D, Ralph A, Richter C, Muller-Reichert T, Kittler R, Hyman AA, Pelletier L.** 2008. The mammalian SPD-2 ortholog Cep192 regulates centrosome biogenesis. *Curr Biol* 18:136–141.
- Zhuang M, Calabrese MF, Liu J, Waddell MB, Nourse A, Hammel M, Miller DJ, Walden H, Duda DM, Seyedin SN, Hoggard T, Harper JW, White KP, Schulman BA.** Structures of SPOP-substrate complexes: insights into molecular architectures of BTB-Cul3 ubiquitin ligases. *Mol Cell.* 2009 Oct 9;36(1):39–50.
- Zou, C., Li, J., Bai, Y., Gunning, W. T., Wazer, D. E., Band, V., and Gao, Q.** (2005). Centrobilin: a novel daughter centriole-associated protein that is required for centriole duplication. *J. Cell Biol.* 171, 437–445.

Die Seite 111 (Lebenslauf) enthält persönliche Daten.  
Sie ist deshalb nicht Bestandteil der Online-Veröffentlichung.

## Danksagungen

Es war eine turbulente Zeit.

Nachdem ich hier geschlagene einhundertundelf Seiten lang abgelaufene Druckerschwärze verbraucht habe, will ich mich jetzt kürzer fassen.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Ralph Gräf. Er hat mich bei allem unterstützt, wo andere mich aufgeben hätten. Er hat an mich geglaubt, auch wenn ich selber nicht mehr an mich geglaubt habe. Vielen, vielen Dank für Alles.

Für die Bereitschaft meine Dissertation zu begutachten möchte ich mich bei PD Dr. med. Angela Kaindl und Prof. Dr. Salim Seyfried bedanken!

Ein großer Dank geht auch an alle Mitglieder der besten Arbeitsgruppe (Irene, Anita, Oliver, Petros, Carl, Matthias, Sandra, Tatjana, Marianne und Ehemalige. Die interessanten Azubi's, die im Dienste der AG Zellbiologie standen, sind alle mit eingeschlossen). Möge der Kaffee immer fließen (bitte nicht auf die Tastatur), der Kuchen immer schmecken und die Gedanken immer sprudeln.

Es gab viele Personen, die mir geholfen und mich unterstützt, mich auch durch persönliche Höhen und Tiefen begleitet haben. Die folgenden Personen haben einen ganz besonderen Platz in meinem Herzen.

An meinen Schatz, Marlies. Danke, dass Du immer für mich da bist. Danke für Deinen Rückhalt. Du hattest am meisten mit mir zu kämpfen. Die Pflicht ist geschafft, jetzt kommt die Kür.

Liebe Eltern, "Was lange währt, wird endlich gut". Danke für Eure Liebe und Euer Verständnis. Es war nicht immer einfach für Euch. Ihr habt immer hinter mir gestanden, jetzt will ich das Gleiche für Euch tun. Genießt den Ruhestand. Ich freue mich auf Euch.

Ja und noch ein kleines Danke an Nala, das kuscheligste blauäugige Hündi weit und breit. Du bekommst immer einen Platz auf dem Sofa! Und Kira, sei ein braver Polizeihund und beiß die bösen Leute!