



**Weitergeführte funktionelle Charakterisierung des
centrosomalen Proteins Cep192 und
Untersuchung der Topologie des Centrosoms in
Dictyostelium Amöben**

vorgelegt von:
Valentin Pitzen

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades „doctor rerum naturalium“ (Dr. rer. nat.)
in der Wissenschaftsdisziplin „Zellbiologie“

eingereicht an der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
Institut für Biochemie und Biologie
der Universität Potsdam

Datum der Disputation
8. April 2022

Soweit nicht anders gekennzeichnet, ist dieses Werk unter einem Creative-Commons-Lizenzvertrag Namensnennung 4.0 lizenziert.

Dies gilt nicht für Zitate und Werke, die aufgrund einer anderen Erlaubnis genutzt werden. Um die Bedingungen der Lizenz einzusehen, folgen Sie bitte dem Hyperlink: <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.de>

BETREUER, GUTACHTER UND PRÜFUNGSKOMMISSION

Hauptbetreuer: Prof. Dr. Ralph Gräf, Universität Potsdam
Zweitbetreuer: Prof. Dr. Salim Seyfried, Universität Potsdam
Mentorin: Dr. Irene Meyer, Universität Potsdam

1. Gutachter: Prof. Dr. Ralph Gräf, Universität Potsdam
2. Gutachter: Prof. Dr. Carsten Beta, Universität Potsdam
3. Gutachter: Prof. Dr. Christian Hammann, Jacobs Universität Bremen

Mitglieder der Prüfungskommission:

apl. Prof. Dr. Otto Baumann (Vorsitz), Universität Potsdam
Prof. Dr. Ralph Gräf, Universität Potsdam
Prof. Dr. Christian Hammann, Jacobs Universität Bremen
Prof. Dr. Salvatore Chiantia, Universität Potsdam
Prof. Dr. Katja Hanack, Universität Potsdam
apl. Prof. Dr. Jens Raila, Universität Potsdam
Prof. Dr. Damaris Zurell, Universität Potsdam

Online veröffentlicht auf dem

Publikationsserver der Universität Potsdam:

<https://doi.org/10.25932/publishup-54889>

<https://nbn-resolving.org/urn:nbn:de:kobv:517-opus4-548891>

PUBLIKATIONEN UND VORTRÄGE

Valentin Pitzen, Sophia Askarzada, Ralph Gräf, Irene Meyer

CDK5RAP2 Is an Essential Scaffolding Protein of the Corona of the *Dictyostelium* Centrosome. *Cells*. 2018, 7(4):32

<https://doi.org/10.3390/cells7040032>

Valentin Pitzen, Sophia Sander, Otto Baumann, Ralph Gräf, Irene Meyer

Cep192, a Novel Missing Link between the centrosomal Core and Corona in *Dictyostelium* Amoebae. *Cells*. 2021, 10(9):2384

<https://doi.org/10.3390/cells10092384>

Ralph Gräf, Marianne Grafe, Irene Meyer, Kristina Mitic, Valentin Pitzen

The *Dictyostelium* centrosome. *Cells*. 2021 10(10):2657

<https://doi.org/10.3390/cells10102657>

Teile dieser Arbeit wurden auf Tagungen vorgestellt:

Valentin Pitzen, Antje Westendorf, Ralph Gräf, Irene Meyer

Protein Topology at the *Dictyostelium* centrosome (Poster)

„International *Dictyostelium* Conference“ in Egmond an Zee, Niederlande (2018)

Valentin Pitzen, Sophia Sander, Heiner Lohmeier, Ralph Gräf, Irene Meyer

Characterization of the centrosomal core protein Cep192 (Vortrag)

„First D-A-CH *Dictyostelium* Workshop“(online), 2021

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die folgenden Abschlussarbeiten betreut:

Suche nach potentiellen centrosomalen Interaktionspartnern von Corona-Proteinen des *D. discoideum* mit Hilfe der BioID2-Methode, Antje Westendorf, Bachelorarbeit (2019)

Lokalisation von Nek2, Plk1, Cdk1 und AurK während der Mitose bei *Dictyostelium discoideum*, Natalie Bleich, Bachelorarbeit (2020)

Optimization of centrosome fluorescent microscopy techniques in *Dictyostelium discoideum*, Alvand Gharib, Masterarbeit (2021)

DIGITALE VERSION UND VIDEOS

Die beigefügte CD enthält diese Arbeit digital als PDF mit hochauflösenden Bildern und die folgenden Videos:

Video 1: Mitose Cep192-GFP

Video 2: Mitose Cep192-RNAi in GFP- α -Tubulin I

Video 3: Mitose Cep192-RNAi in GFP- α -Tubulin II

Video 4: Mitose Cep192-RNAi in GFP- α -Tubulin III

SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG

Hiermit versichere ich, Valentin Pitzen, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt habe, und dass ich alle Stellen, die dem Wortlaut oder dem Sinn nach anderen Quellen entnommen sind, durch Angabe der Quellen als Entlehnung kenntlich gemacht habe. Diese Arbeit wurde noch nicht an einer anderen Hochschule eingereicht.

1 INHALTSVERZEICHNIS

Betreuer, Gutachter und Prüfungskommission	I
Publikationen und Vorträge	II
Digitale Version und Videos	III
Selbstständigkeitserklärung	IV
1 INHALTSVERZEICHNIS	V
Abkürzungsverzeichnis	VIII
Zusammenfassung	X
Summary XI	
2 EINLEITUNG	1
2.1 <i>Dictyostelium discoideum</i> als Modellorganismus	1
2.2 Das Centrosom als Mikrotubuli-organisierendes Zentrum	2
2.3 Hochauflösende Fluoreszenzmikroskopie	6
2.4 Die Proximity Dependent Biotin Identification-Methode	10
2.5 Ziel dieser Arbeit	11
3 ERGEBNISSE	13
3.1 Das centrosomale Protein Cep192	13
3.1.1 <i>In silico</i> -Analyse von Cep192	13
3.1.2 Cep192-GFP lokalisiert während der gesamten Mitose am mitotischen Centrosom	15
3.1.3 Knockdown von Cep192 resultiert in überzähligen MTOC	16
3.1.4 Cep192-GFP ist von den Core-Proteinen am höchsten exprimiert	22
3.2 Validierung von zwei Tag-Systemen am Centrosom	25
3.2.1 Die Etablierung des SpotH6-Tags	25
3.2.2 Die Etablierung des BioH6-Tags	27
3.2.3 In der Expansion Microscopy wird die dreidimensionale Form der Core-Struktur sichtbar	31
3.2.4 Cep192-SpotH6 und -BioH6 zeigen vergleichbare Ergebnisse	33
	V

3.2.5	Cep192-BioH6 in der Ultrastructural Expansion Microscopy	36
3.2.6	Potenzielle Artefaktbildung in der Expansion Microscopy	37
3.3	Topologie der Core-Struktur und der inneren Corona	40
3.3.1	CP91-BioH6 und CP39-BioH6 lokalisieren zwischen Cep192-SpotH6	40
3.3.2	Die Lokalisation der Corona-Proteine CDK5RAP2 und CP148	44
3.3.3	Die Lokalisation der Proteine CDK5RAP2, CP148 und CP224 innerhalb der Corona	46
3.4	Identifikation möglicher Interaktionspartner am Centrosom	48
3.4.1	Die Etablierung des BioID2-Systems	48
3.4.2	Das Biotinylierungsverhalten der Core-Proteine CP39- und CP91-BioID2	51
3.4.3	Biotinylierungsverhalten von Cep192-, CDK5RAP2- und CP224-BioID2	52
4	DISKUSSION	54
4.1	Funktionelle Charakterisierung des centrosomalen Core-Proteins Cep192	54
4.2	Die Expansion Microscopy zeigt die variable Orientierung der Core-Struktur am Zellkern57	
4.3	Cep192-BioH6 und Cep192-SpotH6 lokalisieren in den äußeren Schichten der centrosomalen Core-Struktur	61
4.4	Die Core-Struktur: Aufklärung der Core-Schichten und mögliche Interaktionen	62
4.5	Core und Corona: Mögliche Interaktionen und räumliche Anordnung	63
4.6	Biotinylierungsassays ergänzen die Daten aus der Expansion Microscopy	65
4.7	Fazit und Ausblick	69
5	MATERIAL UND METHODEN	71
5.1	Material	71
5.1.1	Allgemeine Chemikalien und Puffer	71
5.1.2	Antibiotika	72
5.1.3	Kits und Enzyme	72
5.1.4	Primer und Oligonukleotide	72
5.1.5	Bakterien-Stämme, <i>D. discoideum</i> -Stämme und Plasmide	73
5.1.6	Antikörper und Konjugate	75
5.1.7	Verwendete Software	76
5.2	Molekularbiologische Methoden	77
5.2.1	Konstruktion der verwendeten Plasmide	77

5.2.2	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	79
5.2.3	Q5-Mutagenese	80
5.2.4	Agarose-Gelelektrophorese	80
5.2.5	DNA-Verdau mit Restriktionsendonukleasen	81
5.2.6	Ligation von DNA-Konstrukten	81
5.2.7	Aufreinigung von DNA-Fragmenten	82
5.2.8	Sequenzierungen und DNA-Synthesen	82
5.2.9	Transformation chemisch kompetenter Zellen	82
5.2.10	Konservierung von Bakterien	82
5.2.11	Plasmidpräparation aus einer Übernachtskultur	83
5.2.12	Transformation von <i>D. discoideum</i> -Zellen	83
5.2.13	Entfernung der Blasticidin-Resistenz mittels Cre-Rekombinase	85
5.3	Biochemische Methoden	86
5.3.1	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	86
5.3.2	Herstellung von <i>Dictyostelium</i> -Gesamtextrakten	87
5.3.3	Western Blot	87
5.3.4	Isolation von <i>D. discoideum</i> -Centrosomen	88
5.4	Zellbiologische Methoden	90
5.4.1	Kultivierung und Konservierung von <i>D. discoideum</i> -Stämmen	90
5.4.2	Fixierung von <i>D. discoideum</i> -Zellen	90
5.4.3	Immunfluoreszenz-Färbung von fixierten <i>D. discoideum</i> -Zellen	91
5.5	Mikroskopie	92
5.5.1	Expansion Microscopy	92
5.5.2	Fluoreszenzmikroskopie und Bildprozessierung	94
5.5.3	Lebendzellaufnahmen von <i>Dictyostelium</i>	94
5.5.4	Elektronenmikroskopie	95
	LITERATURVERZEICHNIS	96
	Danksagung	104

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AP	alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumperoxidsulfat
AMP	Adenosinmonophosphat
ASH	ASPM-SPD2-Hydrin
BCIP	5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat-toluidinsalz
Bla	Blasticidin S
bp	Basenpaare
Cn	centrosomale Fraktion
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CDK	Cyclin dependent kinase
CDS	kodierende Region
DAPI	4'-6-diamidin-2-phenylindol
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ExM	Expansion Mikroskopie
gDNA	genomische DNA
γ -TuRC	γ -Tubulin-Ringkomplex
γ -TuSC	γ -Tubulin-Small-Komplex
PBS	Phosphate buffered saline
PSF	Point Spread Function
GE	Gesamtextrakt
GFP	grün fluoreszierendes Protein
IF	Immunfluoreszenz
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
KÜ	Kulturüberstand
min	Minuten
MTOC	Microtubule organizing center
NBT	Nitroblautretazoliumchlorid
PA	Poly-Acrylamid
PAGE	Poly-Acrylamid-Gelelektrophorese
PenStrep	Penicillin/Streptomycin

PCR	Polymerase chain reaction
Plk	Polo like kinase
RNAi	RNA-Interferenz
rpm	revolutions per minute (Umdrehungen pro Minute)
SDS	Sodium-Dodecyl-Sulfat
sec	Sekunden
STED	Stimulated Emission Depletion
dSTORM	direct Stochastic Optical Reconstruction Microscopy
Strep	Streptavidin
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TBS	Tris buffered saline
U-ExM	Ultrastructural Expansion Mikroskopie
UTR	untranslatierte Region
WB	Western Blot
x g	Vielfaches der Erdbeschleunigung

ZUSAMMENFASSUNG

Das Centrosom von *Dictyostelium* ist acentriolär aufgebaut, misst ca. 500 nm und besteht aus einer dreischichten Core-Struktur mit umgebender Corona, an der Mikrotubuli nukleieren. In dieser Arbeit wurden das centrosomale Protein Cep192 und mögliche Interaktionspartner am Centrosom eingehend untersucht. Die einleitende Lokalisationsuntersuchung von Cep192 ergab, dass es während der gesamten Mitose an den Spindelpolen lokalisiert und im Vergleich zu den anderen Strukturproteinen der Core-Struktur am stärksten exprimiert ist. Die dauerhafte Lokalisation an den Spindelpolen während der Mitose wird für Proteine angenommen, die in den beiden identisch aufgebauten äußeren Core-Schichten lokalisieren, die das mitotische Centrosom formen. Ein Knockdown von Cep192 führte zur Ausbildung von überzähligen Mikrotubuli-organisierenden Zentren (MTOC) sowie zu einer leicht erhöhten Ploidie. Deshalb wird eine Destabilisierung des Centrosoms durch die verminderte Cep192-Expression angenommen. An Cep192 wurden zwei kleine Tags, der SpotH6- und BioH6-Tag, etabliert, die mit kleinen fluoreszierenden Nachweiskonjugaten markiert werden konnten. Mit den so getagten Proteinen konnte die hochauflösende Expansion Microscopy für das Centrosom optimiert werden und die Core-Struktur erstmals proteinspezifisch in der Fluoreszenzmikroskopie dargestellt werden. Cep192 lokalisiert dabei in den äußeren Core-Schichten. Die kombinierte Markierung von Cep192 und den centrosomalen Proteinen CP39 und CP91 in der Expansion Microscopy erlaubte die Darstellung des dreischichtigen Aufbaus der centrosomalen Core-Struktur, wobei CP39 und CP91 zwischen Cep192 in der inneren Core-Schicht lokalisieren. Auch die Corona wurde in der Expansion Microscopy untersucht: Das Corona-Protein CDK5RAP2 lokalisiert in räumlicher Nähe zu Cep192 in der inneren Corona. Ein Vergleich der Corona-Proteine CDK5RAP2, CP148 und CP224 in der Expansion Microscopy ergab unterscheidbare Sublokalisationen der Proteine innerhalb der Corona und relativ zur Core-Struktur. In Biotinylierungsassays mit den centrosomalen Core-Proteinen CP39 und CP91 sowie des Corona-Proteins CDK5RAP2 konnte Cep192 als möglicher Interaktionspartner identifiziert werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen die wichtige Funktion des Proteins Cep192 im *Dictyostelium*-Centrosom und ermöglichen durch die Kombination aus Biotinylierungsassays und Expansion Microscopy der untersuchten Proteine ein verbessertes Verständnis der Topologie des Centrosoms.

SUMMARY

The *Dictyostelium* centrosome contains no centrioles and has a diameter of approx. 500 nm. It consists of a three layered core structure and a surrounding corona, which nucleates microtubules. This work focusses on the centrosomal protein Cep192 and potential interactors at the centrosome. Localization studies showed, that Cep192 is a permanent resident at the spindle poles during mitosis and that, compared to other centrosomal core proteins, Cep192 is expressed at the highest level. The permanent residence at the spindle poles throughout mitosis is assumed for proteins which localize to the outer core layers, which form the mitotic centrosome. A knockdown of Cep192 resulted in supernumerary microtubule organizing centers (MTOC) and a slightly higher ploidy. Due to the phenotype, a destabilization of the centrosome caused by the reduced Cep192 expression is assumed. Cep192 was fused to the newly established short tags BioH6 and SpotH6, which are recognized by small fluorescently labelled probes. The tagged proteins were used for superresolution expansion microscopy. Superresolution expansion microscopy was optimized for the centrosome and allowed the protein specific resolving of the core structure for the first time. Cep192 localizes to the outer core layers. Combination of tagged proteins nicely mirrored all three core layers. CP39 and CP91 localize inbetween Cep192 in the inner core layer. Corona proteins were included in the expansion microscopy: the corona protein CDK5RAP2 comes into close proximity of Cep192 and localizes to the inner corona. A comparison with CP148 and CP224, two other corona proteins, revealed a distinct localization of the proteins within the corona and relatively to the core structure. Applied biotinyase assays with the core proteins CP39 and CP91, as well with the corona protein CDK5RAP2 revealed Cep192 as a possible interaction partner of all three proteins.

The results of this work show the important function of Cep192 at the *Dictyostelium* centrosome and through the biotinyase assay and expansion microscopy data shed a light on the refined *Dictyostelium* centrosome topology.

2 EINLEITUNG

2.1 *DICTYOSTELIUM DISCOIDEUM* ALS MODELLORGANISMUS

Dictyostelium discoideum ist ein im Waldboden lebender, sich von Bakterien und Hefen ernährenden eukaryotischer Organismus, der erstmals 1935 beschrieben wurde (Raper, 1935). Innerhalb der Eukaryoten wird *Dictyostelium* der Gruppe der Amoebozoa zugeordnet (Gräf et al., 2015). *D. discoideum* hat einen bemerkenswerten Lebenszyklus: Unter günstigen Nahrungs- und Umweltbedingungen lebt die Amöbe als einzelliger Organismus und vermehrt sich durch Zellteilung. Die Zellen ernähren sich durch Phagozytose von Mikroorganismen. Verschlechtert sich das Nahrungsangebot, bilden sich Überdauerungsstadien. Dazu wird cAMP sekretiert, die Zellen bewegen sich aufeinander zu, formen einen multizellulären Organismus und es entsteht ein Fruchtkörper aus zwei differenzierten Zelltypen, Stielzellen und Sporen. Letztere überdauern ungünstige Umweltbedingungen (Schaap, 2011).

D. discoideum kann bei Raumtemperatur kultiviert werden, die Verfügbarkeit von axenisch wachsenden Stämmen bietet zudem den Vorteil, dass die Zellen in Reinkultur in nährstoffhaltigem Flüssigmedium ohne Bakterienzugabe wachsen können (Watts et al., 1970). Der haploide Chromosomensatz ist vollständig sequenziert, besteht aus sechs Chromosomen, die für circa 12500 Gene codieren, welche zahlreiche Homologien zu höheren Eukaryoten aufweisen (Eichinger et al., 2005). Der haploide Chromosomensatz ermöglicht zahlreiche, schnell zu realisierende Methoden zur genetischen Manipulation: so sind Gen-Knockouts und auch -Knock-ins relativ einfach über homologe Rekombination umsetzbar (Paschke et al., 2018). Mittlerweile erweitert auch die Crispr/Cas9-Technologie das Repertoire zur Genmanipulation in *Dictyostelium* (Sekine et al., 2018).

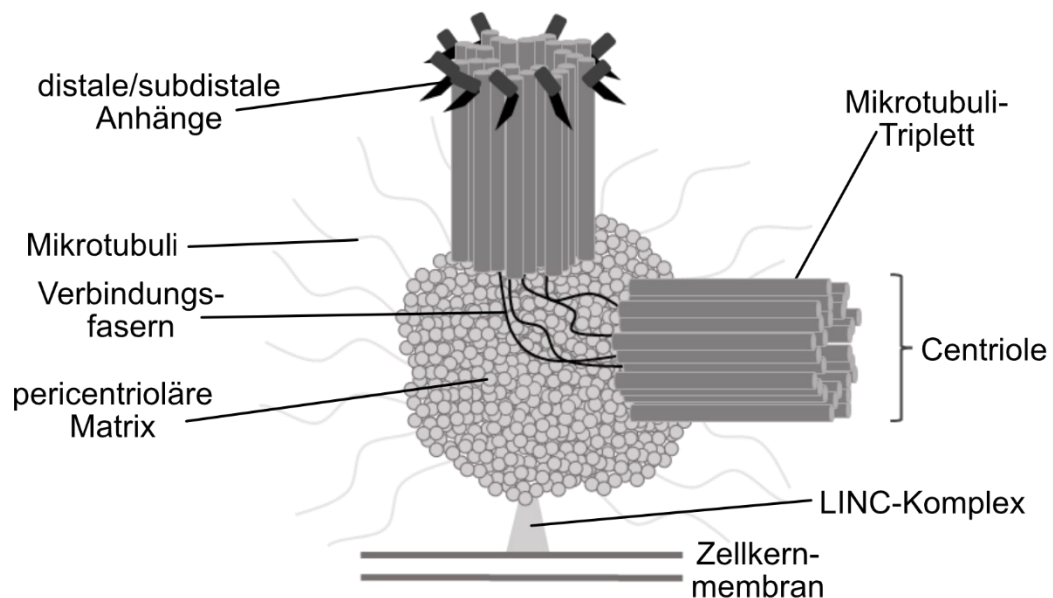
Durch die etablierten, molekularbiologischen Methoden und die Identifizierung zahlreicher homologer Gene in höheren Eukaryoten hat *Dictyostelium* sich zu einem interessanten Organismus zur Untersuchung von Krankheiten entwickelt, z.B. bei mitochondrienassoziierten Krankheiten (Annesley et al., 2014; Francione et al., 2011). Auch grundlegende, zellbiologische Untersuchungen sind möglich: Die erfolgreiche Isolierung des Centrosoms von *D. discoideum* (Gräf et al., 1998), legte hierbei den Grundstein für die genauere Untersuchung dieses Organells. Dadurch war die

Identifizierung zahlreicher centrosomassoziierter Proteine möglich, von denen einige Orthologe in höheren Eukaryoten besitzen (Reinders et al., 2006).

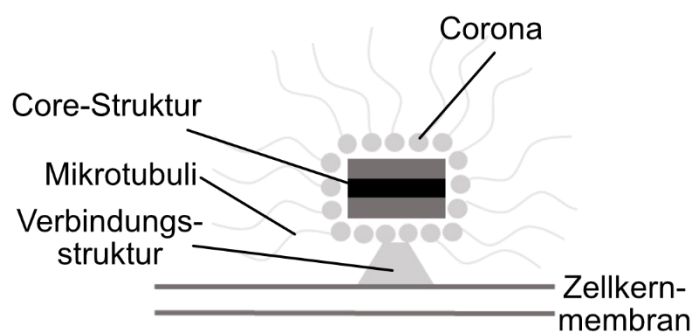
2.2 DAS CENTROSOM ALS MIKROTUBULI-ORGANISIERENDES ZENTRUM

Das Centrosom ist ein proteinbasiertes, nichtmembranöses Zellorganell, welches in den meisten eukaryotischen Zellen die Funktion des Mikrotubuli-organisierenden Zentrums (MTOC) ausfüllt und somit bei Mikrotubuli-assoziierten Vorgängen wie Dynein- und Kinesin-basiertem Transport innerhalb der Zelle oder der Chromosomen-Segregation in der Mitose eine wichtige Rolle spielt. In Eukaryoten entwickelten sich

A



B



C

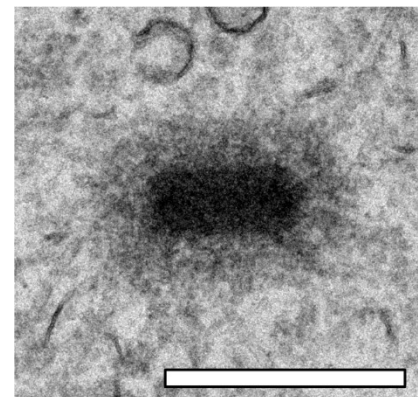


Abbildung 1: Schematische Darstellung des *D. discoideum*-Centrosoms und eines centriolären Centrosoms. (A) Das centrioläre Centrosom besteht aus 2 Centriolen, die von jeweils 9 kreisförmig angeordneten Mikrotubuli-Tripletts (Säugerzellen) gebildet werden und über ein filamentöses Netzwerk miteinander verbunden sind. Die Muttercentriole ist von der Tochtercentriole durch die subdistalen und distalen Anhänge zu unterscheiden und wird von der Mikrotubuli-nukleierenden pericentriolären Matrix umgeben. (B) Das zellkernassoziierte *Dictyostelium*-Centrosom besteht aus einer dreischichtigen, zentral gelegenen Core-Struktur die von der Mikrotubuli-nukleierenden Corona umschlossen wird. (C) Elektronenmikroskopische Aufnahme eines *Dictyostelium*-Centrosoms. Größenstandard = 500 nm.

mehrere, recht unterschiedliche Centrosomen-Typen: Das Säugerzell-Centrosom besteht in der G1-Phase aus zwei miteinander verbundenen Centriolen. Centriolen in Säugerzellen haben einen charakteristischen Aufbau aus neun kreisförmig angeordneten Mikrotubuli-Tripletts. Die beiden Centriolen sind über Verbindungsfasern miteinander assoziiert. Die Centriolen sind von pericentriolärer Matrix umgeben, die Proteine enthält, die für die Mikrotubuli-Nukleation verantwortlich sind (Abbildung 1A). Bei centriolären Centrosomen ist der grundlegende Aufbau immer ähnlich, allerdings bestehen die Centriolen teilweise aus Mikrotubuli-Dupletts (*Drosophila melanogaster*) oder Singletts (*Caenorhabditis elegans*) (Gupta et al., 2018).

Das Centrosom von *D. discoideum* ist dagegen acentriolär aufgebaut. Zudem ist es Zellkernmembran-assoziiert. Es besteht aus einer zentralen Core-Struktur und der umgebenden Corona (Abbildung 1B). Die Core-Struktur besteht aus drei zylindrischen Schichten, die ca. 160 nm dick und 240 nm breit im Durchmesser sind (Moens, 1976). Die Corona ist eine in der Elektronenmikroskopie amorphe, Knötchen enthaltende Struktur, die das funktionelle Äquivalent zur pericentriolären Matrix des Säugerzell-Centrosoms darstellt. Das gesamte Centrosom misst einschließlich Corona ungefähr 500 nm (Abbildung 1C).

Hefen verfügen über sogenannte Spindelpolkörper als Centrosomen, die aus einer zentralen, mit der Zellkernmembran assoziierten (*Saccharomyces pombe*) beziehungsweise in diese integrierte (*Saccharomyces cerevisiae*) acentriolären Struktur bestehen (Cavanaugh et al., 2017). Höhere Pflanzen besitzen kein eigenes Organell zur Mikrotubuli-Nukleation, aber einige konservierte Proteine, die an der Mikrotubuli-Nukleation, z.B. ausgehend vom Zellkern, beteiligt sind (Yi et al., 2018).

Centrosomen verdoppeln sich einmal pro Zellzyklus, die Centriolen sind dabei bei centriolären Centrosomen die Duplikationseinheit. Die Duplikation erfolgt semikonservativ. In der S-Phase beginnt sich unter Beteiligung der Plk4-Kinase und der sogenannten Cartwheel-Struktur an den beiden vorhandenen Centriolen jeweils eine neue Centriole, eine sogenannte Procentriole, zu bilden. Die Reifung des Centrosoms und die Trennung der Centriolen ist streng reguliert, unter anderem durch die Aktivität der mitotischen Kinasen Cdk1, Plk1, Nek2 und AuroraA (Wang et al., 2014). Jede Tochterzelle hat dann wieder ein Centriolenpaar bestehend aus einer Mutter-Centriole und einer Tochter-Centriole, die in der vorherigen S-Phase neu gebildet wurde.

Beim acentriolären *Dictyostelium*-Centrosom konnte in elektronenmikroskopischen Untersuchungen von mitotischen Centrosomen gezeigt werden, dass nur die äußeren Schichten das mitotische Centrosom zu bilden scheinen. Anders als beim Säugerzell-Centrosom erfolgt die Duplikation nicht in der S-Phase, sondern beginnt am Übergang zwischen G2- und M-Phase, ist aber ebenso semi-konservativ. Die Corona disassembliert, das Mikrotubuli-Skelett depolymerisiert, die innere Schicht verschwindet und je eine äußere Schicht wird in die Zellkernmembran inseriert, da *D. discoideum* eine semi-geschlossene Mitose durchführt (O'Day et al., 2015). Die äußeren Schichten lokalisieren dann an den Polen der sich aufbauenden Spindel. In der Telophase beginnt sich die jeweilige Core-Schicht auf sich selbst zurückzufalten, die Proteine der inneren Core-Schicht kehren zurück und eine vollständige Corona bildet sich, so dass nach der Cytokinese zwei Tochterzellen existieren, die je ein vollständiges Centrosom besitzen (Abbildung 2, (Ueda et al., 1999)). Aus dem beobachteten Verdopplungsprozess folgt, dass die Komposition der beiden äußeren Schichten identisch sein muss und es bei jedem Verdopplungszyklus zu einem Wechsel der Orientierung der der Corona zugewandten Seite und der der zentralen Schicht zugewandten Seite kommt.

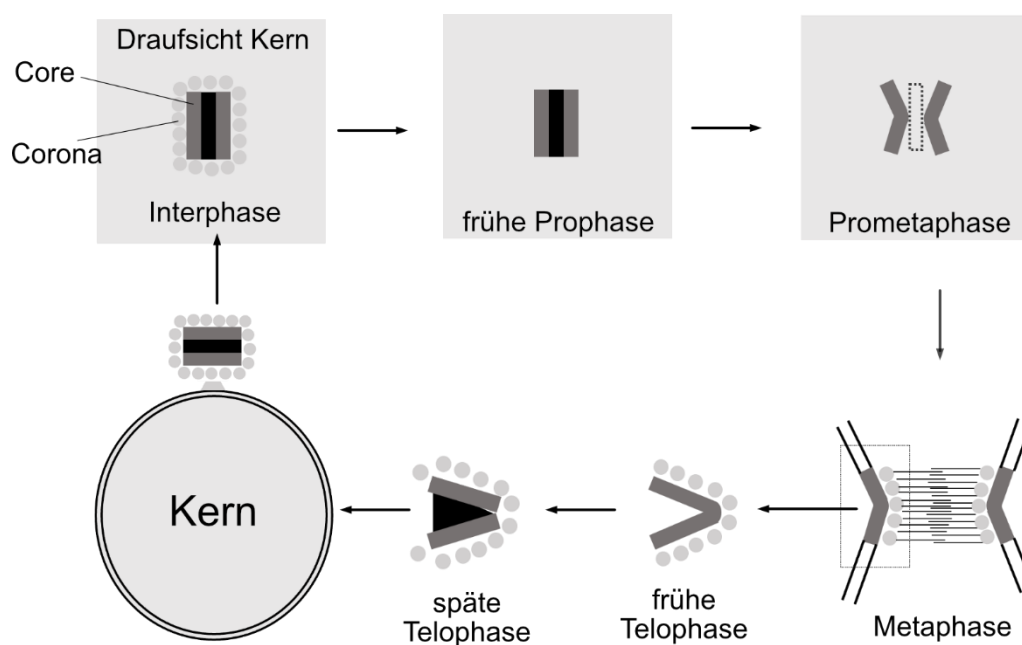


Abbildung 2: Die Centrosomenduplikation in *D. discoideum*. Zu Beginn der Mitose disassembliert die Corona (frühe Prophase) und die innere Core-Schicht baut sich ab. Die beiden verbliebenen Schichten werden in die Zellkernmembran inseriert und einige Proteine zur Mikrotubuli-Nukleation relokalisieren. Es beginnt sich eine Mikrotubuli-Spindel zu bilden. In der Telophase beginnt die Reformierung eines vollständigen Centrosoms: das mitotische Centrosom faltet auf sich selbst zurück und die Proteine der inneren Core-Struktur sind wieder nachweisbar. Mit Abschluss der Mitose sind zwei Zellen mit je einem vollständigen Centrosom entstanden. Eigene Abbildung basierend auf (Putzler et al., 2016).

Hefen bilden im Gegensatz zum *Dictyostelium*-Centrosom und dem tierischen Centrosom zur Mitose einen zweiten Spindelpolkkörper komplett neu. Dem Spindelpolkkörper fehlt zudem eine morphologisch klar abgesetzte Struktur ähnlich der pericentriolären Matrix des Säugerzell-Centrosoms beziehungsweise der Corona in *D. discoideum* (Jaspersen et al., 2004).

Für das *D. discoideum*-Centrosom wurden 42 Centrosomen-assoziierte Proteine identifiziert (Gräf et al., 2021). Obwohl weitere Umstrukturierungen in der Core-Struktur denkbar sind, basiert die Zuordnung der Core-Proteine zu den Schichten auf den Untersuchungen in der Elektronenmikroskopie und auf dem Modell in Abbildung 2. Die *Dictyostelium*-exklusiven Proteine CP39, CP75 und CP91 gelten als Proteine der inneren Core-Schicht, da sie während der Mitose zusammen mit der inneren Schicht vom Centrosom verschwinden (Meyer et al., 2017; Putzler et al., 2016). An den Spindelpolen lokalisiert neben CP55 (Kuhnert et al., 2012a) auch Cep192, das zuerst der Corona zugeordnet wurde (Schulz et al., 2009b). Cep192 ist ein konserviertes Protein, das auch in centriolären Centrosomen zu finden ist. Dort hat es eine Lokalisation an der Centriolen-Wand und wird während der Mitose verstärkt in die pericentrioläre Matrix rekrutiert (Chinen et al., 2021).

Cep192 scheint in centriolären Centrosomen von Wirbeltieren ein Schlüsselprotein bei der streng regulierten Centrosomenreifung und damit bei der späteren Ausbildung der mitotischen Spindel zu sein: so postulieren Joukov et al., dass es am Anfang einer Signalkaskade steht, in der die mit Cep192 interagierenden Kinasen AuroraA und Plk1 aktiviert werden. Diese regulieren gemeinsam mit der Nek2- und Cdk1-Kinase die Centrosomen-Reifung und die Trennung der verdoppelten Centriolen vor der Mitose (Joukov, 2014; Wang et al., 2014).

Allgemein sind Proteine mit einer Lokalisation in der Corona als funktionelles Äquivalent der pericentriolären Matrix deutlich konservierter: so findet sich z.B. für das Protein CDK5RAP2/Centrosomin ein homologes Protein in *D. discoideum*, welches auch Cep161 genannt wird. Das *Dictyostelium*-Protein CP148 könnte ein Homolog zum konservierten Pericentrin sein, da es trotz geringer Sequenzhomologie über für die Pericentrin-Familie typische IQ-Domänen und lange coiled-coil-Domänen verfügt (Kuhnert, 2012; Pitzen et al., 2021). Jedoch lokalisiert es im Gegensatz zu Säuger-Pericentrin während der Mitose nicht am Centrosom (Kuhnert et al., 2012b). *D. discoideum* verfügt nur über einen kleinen γ -Tubulin-Nukleationskomplex (γ -TuSC), bestehend aus den Proteinen Spc97 und Spc98, die den Proteinen GCP2 und GCP3

im γ -Tubulin-Ringkomplex (γ -TuRC) des centriolären Centrosoms entsprechen, sowie γ -Tubulin (Daunderer et al., 2002). Auch das Protein CP224, eine Mikrotubuli-Polymerase mit einer cytosolischen Lokalisation an den Plus-Enden der Mikrotubuli und in der Corona in der Interphase sowie am mitotischen Centrosom hat mit XMAP215/chTOG homologe Proteine in centriolären Centrosomen (Gräf et al., 2000).

Die Assoziation des Centrosoms mit der Zellkernmembran erfolgt in *D. discoideum* mithilfe des Membranproteins Sun1 und dem Laminprotein NE81 auf der Zellkernseite (Krüger et al., 2012; Schulz et al., 2009a). In der Corona sind mögliche Schlüsselproteine zur Membranassoziiierung CDK5RAP2 und CP148, deren Knockdown einen ähnlichen Phänotyp mit vom Zellkern abgelösten Centrosomen zur Folge hat, wie er bei der Störung der Sun1- bzw. der Lamin-Funktion beobachtet wurde (Kuhnert et al., 2012b; Pitzen et al., 2018). Darüber hinaus ist eine Mikrotubuli-basierte Verankerung über das Motorprotein Kif9 beschrieben (Tikhonenko et al., 2013).

2.3 HOCHAUFLÖSENDE FLUORESZENZMIKROSKOPIE

Mit der beginnenden Entwicklung der Immunfluoreszenzmarkierung in den 1940-Jahren wurde es möglich, unterschiedliche Strukturen innerhalb eines Präparates unabhängig voneinander anzufärben und über Fluoreszenzanregung sichtbar zu machen. Dabei ist es neben der Qualität der verwendeten Objektive das Licht selbst, das aufgrund seiner Eigenschaften die dabei maximal erreichbare Auflösung begrenzt. Rund um eine punktförmige Fluoreszenzquelle entsteht auf der Bildebene ein Beugungsmuster, das durch Interferenzen in der Fokusebene hervorgerufen wird und mit einer Punktspreizfunktion (PSF) beschrieben werden kann. Diese Beugungsmuster begrenzen die mögliche Auflösung entscheidend. Bereits Ernst Abbe war sich des Problems bewusst. Auf seiner Arbeit basiert die, nach ihm benannte Formel, zur Abbeschen Auflösungsgrenze, die wie folgt definiert ist (Abbe, 1873):

$$A = \frac{\lambda}{2 * NA}$$

λ : Wellenlänge des Lichts
NA: numerische Apertur des Objektivs

Für Fluoreszenzmikroskope hat sich das Rayleigh-Kriterium etabliert: Es beschreibt den nötigen Abstand zweier Lichtquellen, um sie getrennt voneinander

auflösen zu können. Dieser Mindestabstand ist definiert als der Abstand zwischen Zentrum und dem ersten Minimum des Beugungsmusters (Rayleigh, 1896).

Für heute übliche Fluorophore ergibt sich mit einem Ölimmersions-Objektiv mit hoher numerischer Apertur eine Auflösungsgrenze von ≈ 220 nm (Szikora et al., 2021). Eine 100 nm kleine Struktur würde fluoreszenzmarkiert in der Mikroskopie im erhaltenen Bild also größer erscheinen, als sie tatsächlich ist. Für individuelle Fluorophore ist es möglich mittels Messung an entsprechend fluoreszenzmarkierten exakt sphärischen Kügelchen die PSF bestimmen: diese kann dann eingesetzt werden, um eine computergestützte Verminderung der Beugungsartefakte im Bild, die sogenannte Dekonvolution, durchzuführen.

Mittlerweile wurde begonnen, den auflösungslimitierenden Eigenschaften des Lichts und der optischen Systeme mithilfe photophysikalischer und -chemischer Eigenschaften der verwendeten Fluorophore zu begegnen, um die Auflösung zu verbessern.

So macht sich die von Hell et al. entwickelte „Stimulated Emission Depletion“ (STED)-Mikroskopie, das Phänomen zunutze, dass es zur Rückkehr in den nicht-angeregten Zustand spezieller Fluorophore neben der Fluoreszenz die stimulierte Emission gibt, die das Fluorophor ohne Fluoreszenzemission in den Grundzustand überführt. STED-Mikroskope vereinen einen in der Fokusebene punktförmigen Laserstrahl zur Fluoreszenzanregung mit einem ringförmigen Laserstrahl zur stimulierenden Emission, der den Anregungslaser umschließt. Diese Kombination aus Fluoreszenzanregung der zentralen Fluorophore und Dunkelschalten der benachbarten Fluorophore erhöht die Auflösung, da parallel weniger Fluorophore leuchten und sich in der Folge weniger Beugungsmuster überlagern. Auch die Beugungsringe eines einzelnen Fluorophors werden ausgelöscht. Das ermöglicht eine verbesserte, getrennte Erfassung der Fluorophore und damit eine genauere Lokalisation einzelner Fluorophore im rekonstruierten Bild (Hell et al., 1994).

Eine zeitliche Trennung einzelner Fluoreszenzemissionen erlaubt eine andere hochauflösende Fluoreszenzmikroskopie-Technik, die „Single Molecule Localization Microscopy“ (SMLM). Eine Form der SMLM stellt die „Stochastic Optical Reconstruction“-Mikroskopie (STORM) dar: hier werden spezielle, photo-schaltbare Fluorophore verwendet, die fortlaufend in einem geeigneten Puffersystem zwischen dem Dunkel- und Hell-Zustand hin- und herschalten können. So entstehen viele voneinander unabhängig blinkende Fluorophore, die jeweils nur zu einem bestimmten

Zeitpunkt leuchten und zu einem anderen Zeitpunkt dunkel bleiben. Aufgenommene Einzelbilder zeigen also statistisch zufällig nur einen Teil der Fluorophore, die zu einem anderen Zeitpunkt (=in einem anderen Bild) dunkel sind. Zu einem Zeitpunkt sind die Lichtsignale der einzelnen Fluorophore voneinander isoliert und ihre exakte Lokalisation kann daher unabhängig von Beugungsartefakten und Interferenzen exakt bestimmt werden. Die Kombination aus vielen Einzelbildern ergibt dann ein rekonstruiertes Bild mit deutlich höherer Auflösung von bis zu 20 nm (Rust et al., 2006).

Einen anderen Ansatz zur Erhöhung der Auflösung stellt die Expansion Microscopy dar, die 2015 erstmals mit Geweben und Zellen durchgeführt wurde und hochauflösende Fluoreszenzmikroskopie auch an konventionellen Fluoreszenzmikroskopen ermöglicht.

Das grundlegende Prinzip ist hierbei die räumliche Trennung einzelner Fluoreszenzmarkierungen durch das Quellen des Präparats in einer Acrylamid-basierten Hydrogelmatrix vor der optischen Vergrößerung während der Mikroskopie. Dazu wurden die nachzuweisenden Strukturen ursprünglich mit speziellen Antikörpern markiert, die anschließend mit fluoreszenzmarkierten Sonden spezifisch nachgewiesen werden konnten. Bei der folgenden Einbettung der Probe in die Hydrogelmatrix wird die fluoreszenzmarkierte Sonde über eine konjugierte Methacryloyl-Gruppe mit der Gelmatrix quervernetzt. Die markierten Proteine werden

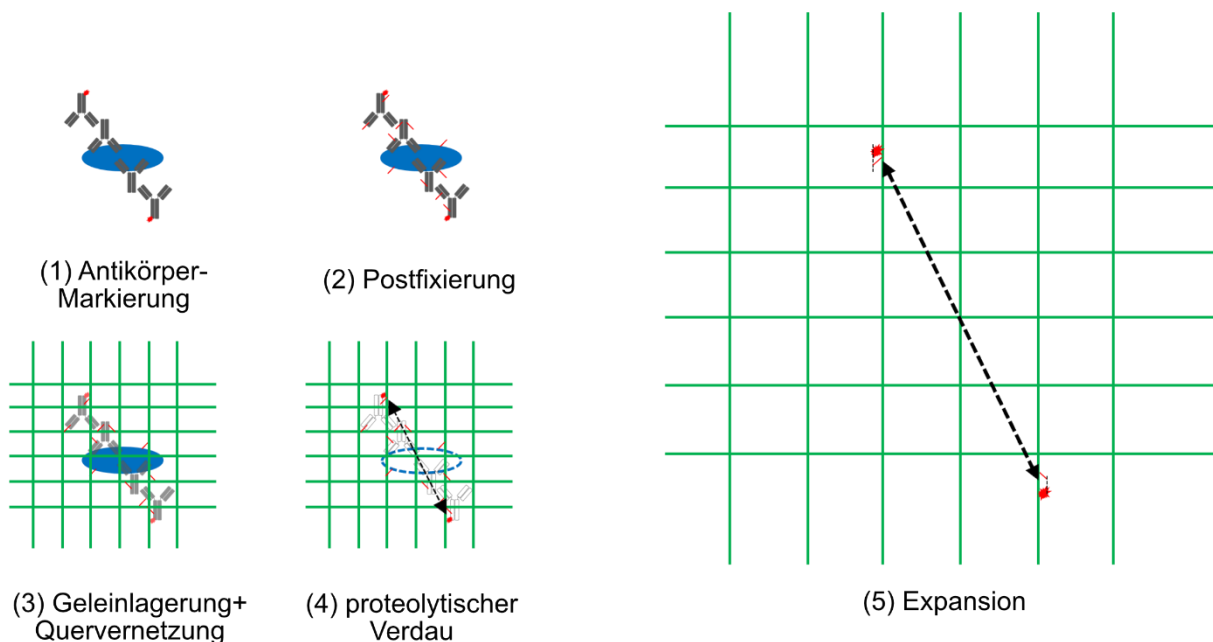


Abbildung 3: Grundlegendes Prinzip der Expansion Microscopy. Die gewünschte Struktur wird z.B. über Antikörper fluoreszenzmarkiert (1) und anschließend postfixiert (2). Bei der darauf folgenden Einlagerung in die Hydrogelmatrix quervernetzt die Postfixierung die Proteine mit dem Gel (3). Nach dem anschließenden proteolytischen Verdau bleiben dadurch auch fluoreszenzkonjugierte Proteinf Fragmente mit der Gelmatrix assoziiert (4). Bei der Expansion in H₂O (5) behalten die Fluorophore dann ihre relative Position zueinander (Pfeil).

proteolytisch verdaut und anschließend die Gelmatrix in Wasser expandiert. Die Vergrößerung erfolgt durch den Verdau weitestgehend gleichförmig in allen Dimensionen und die Fluoreszenz bleibt durch die Verankerung der fluoreszenzmarkierten Sonde an der Gelmatrix nachweisbar. Die einzelnen Fluorophore sind aber weiter voneinander entfernt und somit besser aufzulösen (Chen et al., 2015). Eine breitere Anwendbarkeit der Methode ergab sich durch die erfolgreiche Quervernetzung von fluorophorkonjugierten Fragmenten von Antikörpern mit der Gelmatrix. Dazu wird vor der Einlagerung in die Gelmatrix ein Postfixierungsschritt durchgeführt, der die Proteine mit der Gelmatrix vernetzt. Nach dem Verdau und der Expansion sind die fluorophorkonjugierten Fragmente in der Gelmatrix nachweisbar (Abbildung 3). So erreicht die Expansion Microscopy Auflösungen von 60-70 nm (Chozinski et al., 2016; Gao et al., 2017).

Mittlerweile ist eine Vielzahl optimierter Protokolle für die Expansion Microscopy verfügbar, mit denen sogar Auflösungen um 25 nm möglich werden und unterschiedlichste Strukturen untersucht werden können (Truckenbrodt et al., 2018). Für die Strukturaufklärung am Centrosom in Säugerzellen entwickelten Gambarotto et al. die sogenannte Ultrastructural Expansion Microscopy (U-ExM), weil sie feststellten, dass der ermittelte Centriolen-Durchmesser in der Expansion Microscopy deutlich über dem in der Elektronenmikroskopie ermittelten lag. Bei der U-ExM wird statt eines proteolytischen Verdau eine Denaturierung der Proteine durchgeführt, um so eine effektive Antikörper-Markierung der Proteine in der teilexpandierten Gelmatrix zu ermöglichen. Außerdem wurde dabei die Fixierung der Präparate optimiert (Gambarotto et al., 2019).

Auch das notwendige, isotrope Quellverhalten der Hydrogelmatrix wurde untersucht und optimiert. Es wurde festgestellt, dass bei Verwendung von Formaldehyd in der Fixierung die Bildung von starken Protein-Protein-Verbindungen über Methylenbrücken und eine damit verbundene Verschlechterung der gleichmäßigen Expansion begünstigt wird. Durch angepasste Fixierungen kann die Ausbildung dieser Protein-Protein-Bindung verringert und eine Ergebnisoptimierung erreicht werden (Ku et al., 2016).

Aufgrund der verbesserten Auflösung bei der hochauflösenden Fluoreszenzmikroskopie liegt eine Auseinandersetzung mit der Art der Fluoreszenzmarkierung nahe, da mit der Wahl der Markierung bereits eine Auflösungsverschlechterung einhergehen kann. Ein Komplex aus primärem und

sekundärem Antikörper mit jeweils 150 kDa zum Nachweis ist recht groß. Das an den sekundären Antikörper konjugierte Fluorophor hat bis zu 30 nm Abstand zum markierten Epitop (Harris et al., 1997). Eine direkte Fluoreszenzmarkierung des primären Antikörpers verringert den Abstand bereits, fluoreszenzmarkierte epitopbindene Antikörper-Fragmente, wie die variablen schweren Ketten aus Schwerketten-Antikörpern der Alpakas, sogenannte V_HH, bringen das Fluorophor noch näher an das Epitop (Abbildung 4). Antikörpermarkierte Mikrotubuli zeigen in der STORM-Mikroskopie einen deutlich größeren Durchmesser als V_HH-markierte. Die Autorinnen und Autoren schätzen die Fluorophorentfernung zum Epitop aufgrund der Unterschiede auf 12,5 nm für den direkt fluoreszenzmarkierten Antikörper und auf nur 2,5 nm für den V_HH (Mikhaylova et al., 2015). Gegen GFP- und kurze Peptid-Sequenzen gerichtete, direkt fluoreszenzmarkierte V_HH ermöglichen einen breit gefächerten Einsatz der nur ca. 15 kDa großen Moleküle an unterschiedlichen Proteinen. Zusätzlich sind sie bereits in der hochauflösenden Fluoreszenzmikroskopie erprobt (Götzke et al., 2019; Ries et al., 2012; Virant et al., 2018).

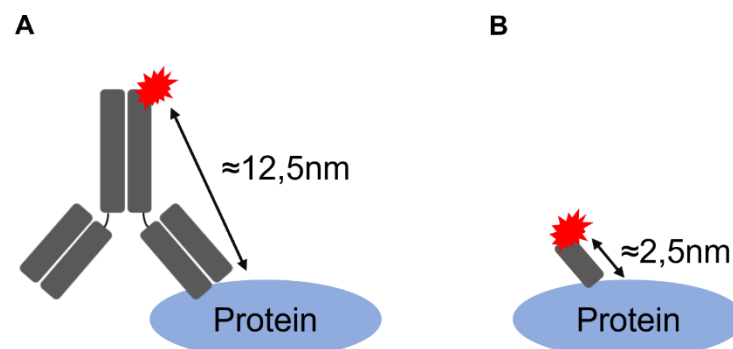


Abbildung 4: Vergleich von konventionellen Antikörpern und Einzelketten-Antikörpern (V_HH) zur Proteinmarkierung. (A) Durch die Größe von herkömmlichen Antikörpern kommt es bei der Verwendung von einem direkt fluoreszenzmarkierten Antikörper bereits zu einem Abstand zwischen Fluorophor und Epitop der auf 12,5 nm geschätzt wird. (B) Der deutlich kleinere V_HH positioniert das Fluorophor näher am Epitop und erhöht so die mögliche Auflösung. Abstandsangaben basieren auf (Mikhaylova et al., 2015).

2.4 DIE PROXIMITY DEPENDENT BIOTIN IDENTIFICATION-METHODE

Die Proximity Dependent Biotin-Identification (BioID)-Methode bietet eine Möglichkeit potenzielle Interaktoren *in vivo* zu identifizieren. Das Prinzip basiert auf der Biotinylierung von Proteinen durch die 35 kDa große Biotinligase BirA aus *Escherichia coli* und wurde ursprünglich in Säugerzelllinien entwickelt. Dazu wird ein Fusionsprotein mit einer zuvor mutierten BirA* erstellt, die eine verringerte Affinität zum von ihr erzeugten, hochreaktiven Biotin-Intermediat biotinyl-5'-AMP aufweist. Das

aktivierte biotinyl-5'-AMP wird in die Umgebung freigegeben. Es reagiert dann schnell mit primären Aminen in der Umgebung der BirA* und biotinyliert so effizient benachbarte Proteine in einem maximalen Abstand von ca. 10 nm (D. I. Kim et al., 2014; Roux et al., 2012). Bei der Weiterentwicklung der bereits in *Dictyostelium* etablierten BioID-Methode (Batsios et al., 2016) wird als Basis eine kleinere Biotinligase (25 kDa) aus *Aquifex aeolicus* verwendet, um potenzielle Nachteile durch die Größe der BirA* und Interferenzen mit der korrekten Lokalisation des Proteins zu vermindern. Diese ist ähnlich wie die BirA* mutiert und funktionell vergleichbar (Kim et al., 2016). Abbildung 5 zeigt die Funktionsweise der BioID2 schematisch und verdeutlicht, dass die Methode nur potenzielle Interaktoren aufgrund von räumlicher Nähe identifiziert und nicht die tatsächliche Interaktion.

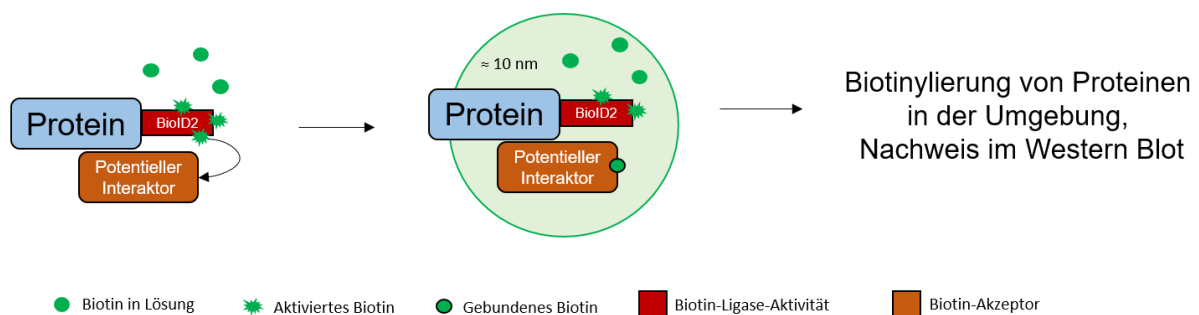


Abbildung 5: Funktionsweise der Proximity Dependent Biotin Identification-Methode. Die an das jeweilige Protein fusionierte BioID2 hat eine mutierte Biotinligase-Aktivität, durch die die Ligase die Affinität zu aktiviertem Biotin verliert. In der Folge kann das aktivierte Biotin an Lysin-Reste von Proteine in räumlicher Nähe (10nm) binden und die biotinylierten Proteine über Streptavidin-Beads isoliert oder wie in dieser Arbeit das Biotinylierungsmuster im Western Blot untersucht werden. Die identifizierten Proteine sind potenzielle Interaktoren des Fusionsproteins.

2.5 ZIEL DIESER ARBEIT

Die Möglichkeit Centrosomen zu isolieren und Antikörper gegen centrosomale Proteine herzustellen, führte in der Vergangenheit bereits zu detaillierten Einblicken in die Centrosomen-Funktion von *Dictyostelium*. In dieser Arbeit soll die begonnene Charakterisierung des centrosomalen Proteins Cep192 fortgesetzt werden. In einem breit gefassten Ansatz soll zudem die bereits etablierte Expansion Microscopy in *Dictyostelium* für das Centrosom optimiert werden und so zur Aufklärung der centrosomalen Topologie beitragen. Zur Weiterentwicklung der Methode sollen idealerweise kleine Tag-Peptide in Verbindung mit kleinen Nachweiskonjugaten verwendet werden. Auch die weiterentwickelte BioID2-Methode soll angewendet werden, um mögliche Interaktoren am Centrosom zu identifizieren. Für die Erstellung

der Fusionsproteine sollen Knock-in-Vektoren verwendet werden, die das Fusionsprotein unter dem endogenen Promotor exprimieren, um der Situation im Wildtypen möglichst nah zu kommen. Demnach verfolgt diese Arbeit das Ziel, eine detailliertere Vorstellung des *Dictyostelium*-Centrosoms zu erhalten.

3 ERGEBNISSE

3.1 DAS CENTROSOMALE PROTEIN CEP192

3.1.1 *In silico*-Analyse von Cep192

Das Protein Cep192 ist 1918 Aminosäuren lang und hat ein errechnetes Molekulargewicht von 215 kDa, läuft bei der Proteinauftrennung mittels SDS-PAGE mit dem verwendeten Protein-Marker jedoch über 250 kDa. Das kodierende Gen *cepH* liegt auf Chromosom 4 und verfügt über zwei Introns (http://dictybase.org/gene/DDB_G0285313, Zugriff am 6.10.21). Identifiziert wurde bereits eine mögliche coiled-coil-Domäne im Bereich der Aminosäuren 1600 bis 1640 (Lohmeier, 2010). C-terminal lässt sich mit Pfam (Mistry et al., 2021) eine ASPM-SPD-2-Hydin-Domäne (ASH) annotieren, die sich in centrosomalen, in Proteinen mit einer Rolle in der Zilien-/Flagellen-Funktion und in Golgi-Apparat-assoziierten Proteinen finden lässt. Die Domäne kann überdies eine Rolle in der Mikrotubuli-Bindung spielen (Ponting, 2006). Eine Suche nach homologen Proteinen mit blastp (Altschul et al., 1990), ergab eine Vielzahl an Cep192-Proteinen aus anderen Organismen. Der homologe Sequenzbereich deckt dabei nur einen ca. 250 Aminosäuren langen Bereich ab (Abbildung 6A). Ein multiples Sequenzalignment mittels T-Coffee (Notredame et al., 2000) der mit blastp identifizierten homologen Regionen aus *Homo sapiens*, *Xenopus laevis* und *Mus musculus* mit der Sequenz aus *D. discoideum* zeigte eine größere Übereinstimmung zwischen den Sequenzen der drei erstgenannten Organismen und eine schwächere Konservierung in *Dictyostelium* (Abbildung 6B).

Eine Struktur-Vorhersage von „AlphaFold“ (Jumper et al., 2021) ermöglicht die Darstellung einzelner Domänen: blau eingefärbte Proteinbereiche sind hier mit hoher Konfidenz vorhergesagt, darunter ist auch die zentral gelegene ASH-Domäne (Abbildung 6C, rot markiert). Da „AlphaFold“ auf bekannte Strukturen anderer Proteine zur Vorhersage zurückgreift, wird aber die Tertiärstruktur des Gesamtproteins aufgrund der geringen Homologie nicht zuverlässig vorhergesagt.

Die Interaktion von Cep192 mit der AuroraA-Kinase und der Polo-like Kinase 1 (Plk1) ist in anderen Organismen bereits gut beschrieben. Dabei identifizierte, hoch konservierte Sequenzbereiche, z.B. die Plk1-Bindedomänen T46 und S995 von Cep192, sowie die AuroraA-Bindedomäne, wie sie für *X. laevis* und weitere

Organismen beschrieben sind (Joukov, 2014; Meng et al., 2015), lassen sich in *D. discoideum* nicht identifizieren.

Mit dem „A eukaryotic linear motif“- (Dinkel et al., 2016) und dem „Sequence Manipulation Suite“-Programm (Stothard, 2000) konnten 32 mögliche Plk-Phosphorylierungsstellen ermittelt werden. Eine Eingrenzung auf das strenge

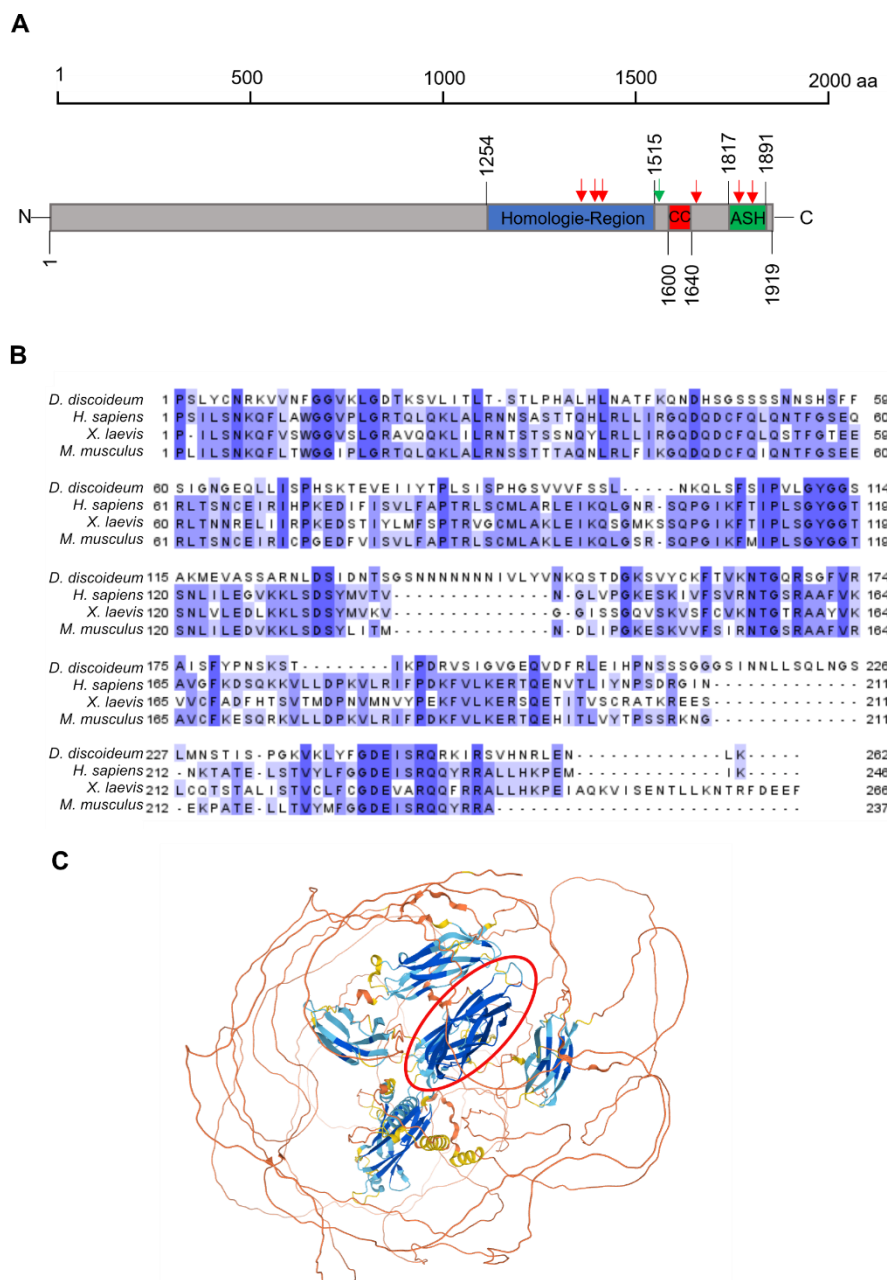


Abbildung 6: In-silico-Untersuchung von Cep192. (A) Grafische Darstellung des Proteins mit eingezeichneter Homologie-Region (blau), der identifizierten coiled-coil-Domäne (CC, rot) und der ASH-Domäne (grün). Rote Pfeile zeigen Bereiche mit möglichen Phosphorylierungsstellen für die Aurora-Kinase, der grüne Pfeil zeigt eine mögliche Plk-Phosphorylierungsstelle. (B) Multiples Sequenzalignment der homologen Sequenzbereiche von Cep192 aus *D. discoideum* mit *Homo sapiens*, *Xenopus laevis* und *Mus musculus*. (C) AlphaFold-Struktur-Vorhersage (Jumper et al., 2021) von Cep192 (Identifizier: AF-Q54NE5-F1). Gute Konfidenz der Vorhersage in blau, schlechtere in orange und gelb dargestellt. Die ASH-Domäne ist rot markiert (Bild unter CC-BY-4.0-Lizenz, <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Consensus-Motiv „[DE].[ST][AILMFVV].[DE]“ (Nakajima et al., 2003) ergab nur eine Phosphorylierungsstelle.

Für eine mögliche Phosphorylierung durch die Aurora-Kinase in *D. discoideum* wurden für das Consensus-Motiv „[RK].[TS][ILV]“ (Cheeseman et al., 2002) sechs mögliche C-terminal gelegene Phosphorylierungsstellen identifiziert, drei davon befinden sich in der Homologieregion, sind dort aber nicht konserviert.

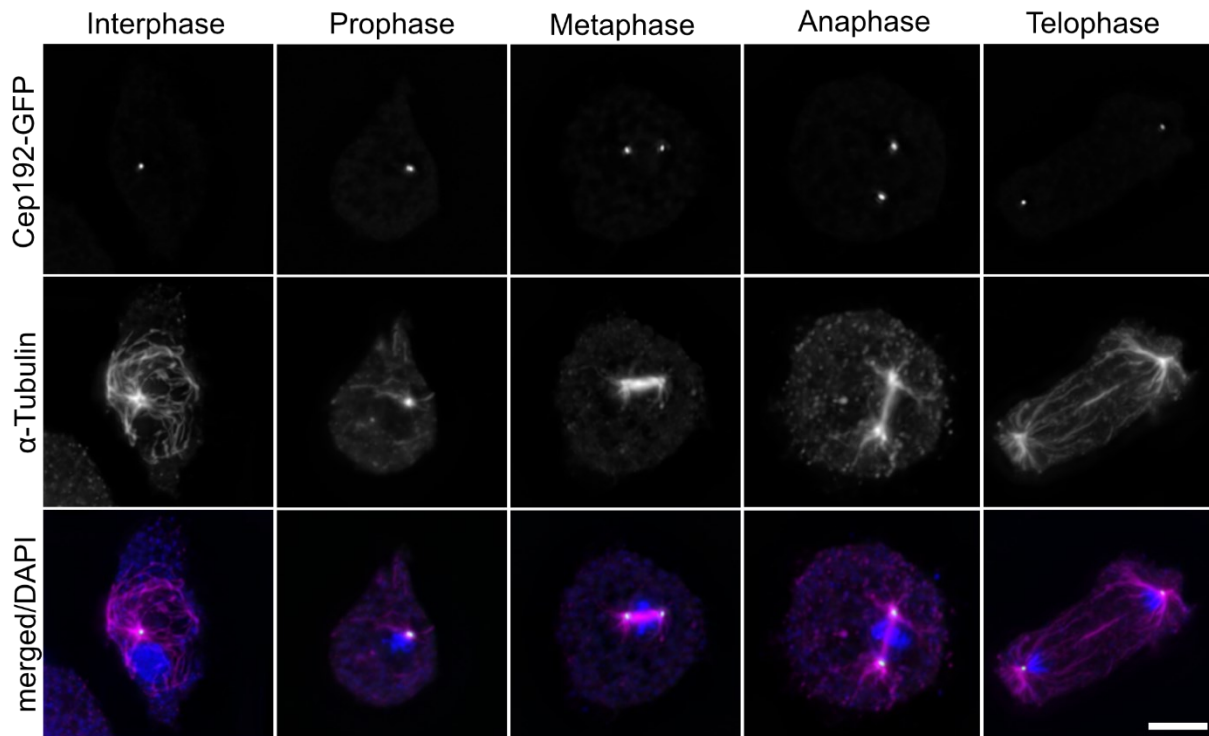
3.1.2 Cep192-GFP lokalisiert während der gesamten Mitose am mitotischen Centrosom

Centrosomale Proteine zeigen eine zellzyklusabhängige Lokalisation, die im Folgenden für Cep192 weiter untersucht wurde. Dazu wurde ein Stamm, der ein C-terminal mit GFP getagtes Cep192 unter dem endogenen Promotor enthält, verwendet. Die Expression von Cep192-GFP unter dem endogenen Promotor war phänotypisch unauffällig, während eine leichte GFP-Cep192-Überexpression zur Ausbildung vollständiger, überzähliger Centrosomen führt (Pitzen et al., 2021). Der Stamm wurde glutaraldehydfixiert und eine Kofärbung von α -Tubulin zur Identifizierung der Mitosestadien durchgeführt. Cep192-GFP lokalisiert während der gesamten Mitose an den Spindelpolen und scheint somit integraler Bestandteil des mitotischen Centrosoms zu sein (Abbildung 7A). Diese Beobachtung deckt sich mit früheren Lokalisationsuntersuchungen für Cep192, die mithilfe eines spezifischen Antikörpers und GFP-getagten Überexpressionskonstrukten durchgeführt wurden (Lohmeier, 2010; Sander, 2011).

Mit dem Cep192-GFP-Stamm konnten Lebendzellaufnahmen von Mitosen angefertigt werden: im gewählten Zeitfenster zwischen den Bildern (1 Stack/10 sec) zeigte sich nur ein Auftrennen des GFP-Signals zu Beginn der Mitose (Abbildung 7B, Video 1). Für Cep192 wurde ursprünglich eine Lokalisation in der Corona oder zwischen Corona- und Core-Struktur angenommen (Schulz et al., 2009b), die Lebendzell-Aufnahmen deuten aber eindeutig auf eine Lokalisation von Cep192 in der äußeren Core-Schicht hin: die Corona baut sich zu Beginn der Mitose ab, ein Teil der Proteine der Corona dissassemblieren vollständig während der gesamten Mitose. Die Corona-Proteine, die Teil des mitotischen Centrosoms sind, werden ans mitotische Centrosom rerekrutiert. Bekannt ist dieses Verhalten für CDK5RAP2 (Pitzen et al., 2018) und γ -Tubulin (unveröffentlicht). Diese zwei Proteine sind in der Mikrotubuli-

Nukleation wichtig und somit für den Aufbau der Mitosespindel relevant. Die komplette Corona baut sich erst in der späten Telophase wieder auf.

A



B

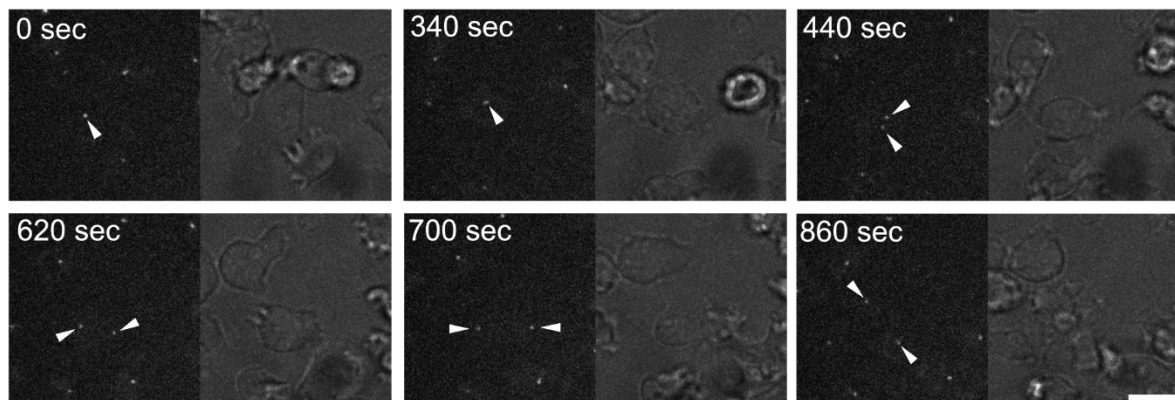


Abbildung 7: Cep192-GFP lokalisiert während der gesamten Mitose an den Spindelpolen. (A) Cep192-GFP zeigt mit der Kofärbung der Mikrotubuli (α -Tubulin) in fixierten Zellen eine Lokalisation an den Spindelpolen während der Mitose. Zellen sind glutaraldehyfixiert, α -Tubulin-Färbung mit YL1/2-/anti-rat-AlexaFluor-568-Antikörper, DNA mit DAPI, gezeigt sind Maximum Intensity-Projektionen von dekonvolvierten Bildern, Größenstandard = 5 μ m. (B) Lebendzellaufnahme des Cep192-GFP-Stamms, gezeigt sind ausgewählte Zeitpunkte aus Video 1, GFP-Kanal und Hellfeld. Aufnahme erfolgte mit der Agar-overlay-Technik mit 1 Stack/10 sec. Gezeigt sind Z-Projektionen, Größenstandard = 10 μ m.

3.1.3 Knockdown von Cep192 resultiert in überzähligen MTOC

Cep192 ist neben der Kinase Nek2 das einzige bekannte centrosomale Protein, dass der Core-Struktur zugeordnet werden kann und welches homologe Proteine in

zahlreichen anderen Organismen aufweist. Zur weiteren Untersuchung der Funktion von Cep192 in *D. discoideum* wurde ein Knockdown von Cep192 durchgeführt (im Folgenden Cep192-RNAi genannt): es wurde ein RNAi-Konstrukt verwendet, welches sich gegen den 5'-Bereich des *cephH*-Gens richtet und in AX2-Zellen transformiert. Zur Überprüfung des erfolgreichen Knockdowns wurden die erhaltenen Zellen mit GFP- α -Tubulin exprimierenden Zellen gemischt, fixiert, Cep192 mit einem spezifischen Antikörper markiert und über einen fluoreszenzmarkierten Antikörper sichtbar gemacht. Die Auswertung der Fluoreszenzintensität von Kontroll- und Cep192-RNAi-Zellen erfolgte mit nicht dekonvolvierten Bildern (Abbildung 8A). Die Auswertung von 56 Zellen des RNAi ergab eine durchschnittliche Reduktion der Fluoreszenz um $28,5\% \pm 9,9\%$ (Mittelwert \pm Standardabweichung) gegenüber den Cep192-

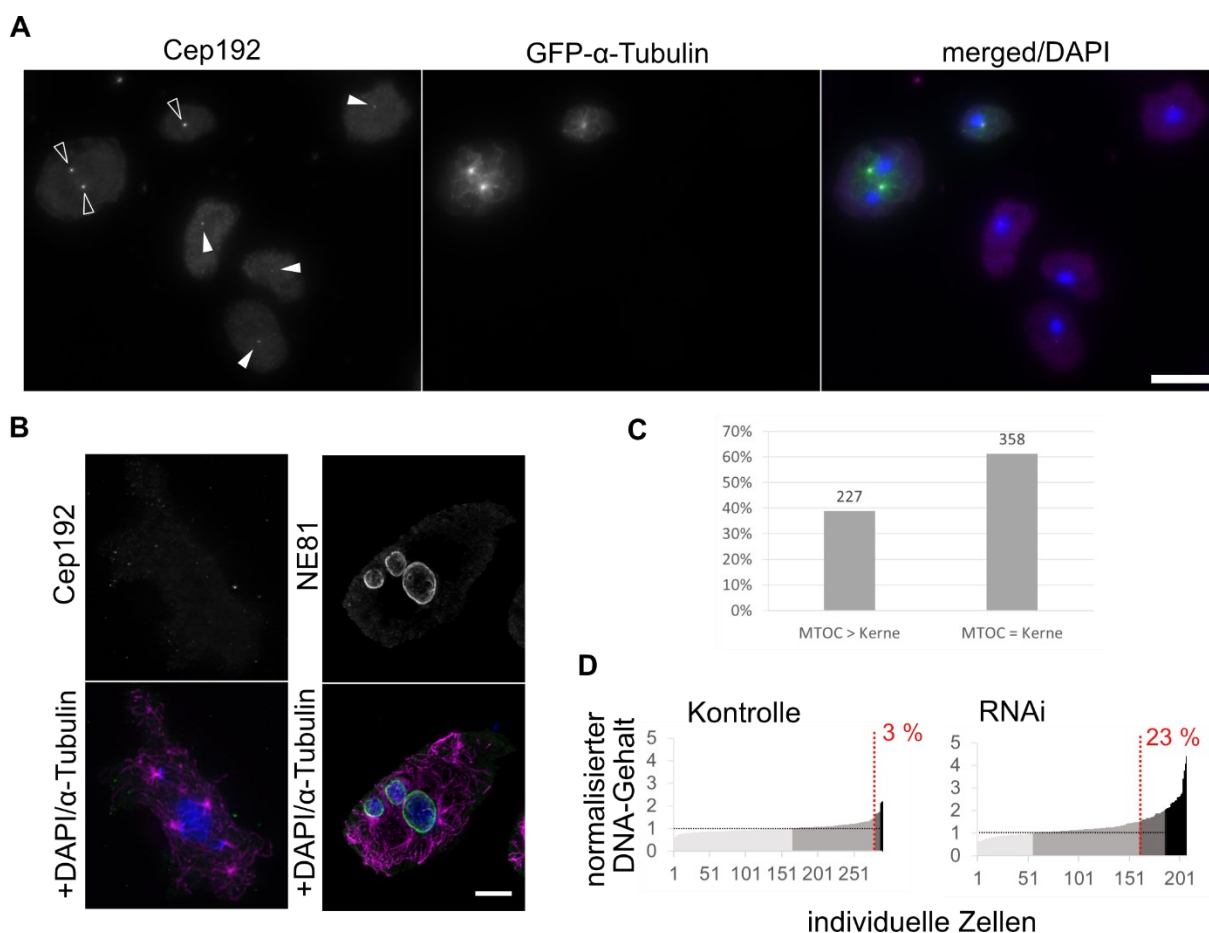


Abbildung 8: Der Cep192-RNAi. (A) Fixiertes Mischpräparat aus GFP- α -Tubulin-Kontrollzellen mit Cep192-RNAi-Zellen. Es wird deutlich, dass das Cep192-spezifische Signal in den RNAi-Zellen (ausgefüllte Pfeilspitze) gegenüber den Kontrollzellen (leere Pfeilspitze) deutlich reduziert ist. (B) Zellen mit stark ausgeprägten überzähligen MTOC (erkennbar an der α -Tubulin-Färbung, magenta) und kaum sichtbarem Cep192-Signal beziehungsweise mehreren Kernen unterschiedlicher Größe. (C) Grafische Auswertung der Anzahl an Zellen mit überzähligen MTOC. (D) Auswertung der erhöhten Ploidie in Cep192-RNAi-Zellen, die Prozentzahlen entsprechen den Zellen mit 1,5-fach erhöhtem Wert gegenüber dem Mittelwert der Kontrolle. Immunfluoreszenzmarkierung mit anti-YL1/2/anti-rat-AlexaFluor-568, Cep192-Färbung mit anti-Cep192/anti-rabbit-AlexaFluor-568-Antikörper, beziehungsweise anti-NE81/anti-rabbit-AlexaFluor-488, DNA mit DAPI. Gezeigt sind Maximum Intensity-Projektionen von nicht dekonvolvierten (A) bzw. dekonvolvierten Bildern (B), Größenstandard= 10 μ m (A), 5 μ m (B).

Fluoreszenzsignalen der GFP- α -Tubulin-Kontrollzellen. Obwohl das eine eher geringe Reduzierung darstellt, trat in 38,8% (n=227/585, Abbildung 8C) der Zellen ein starker Phänotyp mit der Ausbildung überzähliger MTOC (erkennbar am Mikrotubuli-Phänotyp) auf. In AX2-Kontrollzellen zeigen nur 0,6% der Zellen überzählige Centrosomen (Putzler et al., 2016). Außerdem traten unterschiedlich große Zellkerne auf (Abbildung 8B).

Das Auftreten teilweise deutlich vergrößerter Zellkerne wurde als Hinweis auf eine erhöhte Ploidie in den Cep192-RNAi-Zellen gesehen. Zur Untersuchung der Ploidie wurden Mischpräparate hergestellt: GFP- α -Tubulin-exprimierende Zellen wurden als Kontrollzellen mit Cep192-RNAi-Zellen gemischt und die mittleren Grauwerte der DAPI-Färbungen sowie deren Fläche in Z-Projektionen bestimmt. Die individuellen Werte des Produkts aus Fläche und Grauwert der Kontrollzellen (n=290) wurden gemittelt und zur Normierung eingesetzt. Damit konnte näherungsweise bestimmt werden, wie viele Zellen des Cep192-RNAi eine erhöhte Ploidie aufweisen. Während in den Kontrollzellen nur circa 3% (n=10/290) einen 1,5-fach erhöhten Wert für das Produkt aus Grauwert und Fläche aufwiesen, waren es in den Cep192-RNAi-Zellen 23% (n=47/207). Über 2-fach erhöht war dieser Wert in nur 1% der Kontrollzellen (n=3/290), aber in über 11% (n=23/207) der RNAi-Zellen (Abbildung 8D). Die Cep192-RNAi-Zellen wiesen also eine leicht erhöhte Ploidie auf.

Als nächstes wurden die sich bildenden überzähligen MTOC genauer untersucht. Eine Überexpression von GFP-Cep192 führt ebenfalls zu überzähligen MTOC, bei denen es sich um vollständige Centrosomen mit einer offenbar intakten Core- und Corona-Struktur handelt (Pitzen et al., 2021). Die Beschaffenheit der MTOC wurde auch im Cep192-RNAi untersucht: Fixierungen und Immunfluoreszenz-Färbungen der Core-Proteine CP39, CP55 und CP91 gemeinsam mit α -Tubulin zur Lokalisation der überzähligen MTOC zeigten, dass an den überzähligen MTOC keine oder eine stark reduzierte Menge an Core-Proteinen lokalisiert. Die Corona-Proteine CDK5RAP2, CP148 und CP224 sind hingegen Bestandteil der überzähligen MTOC (Abbildung 9). Die überzähligen MTOC im Cep192-RNAi sind daher keine vollständigen Centrosomen.

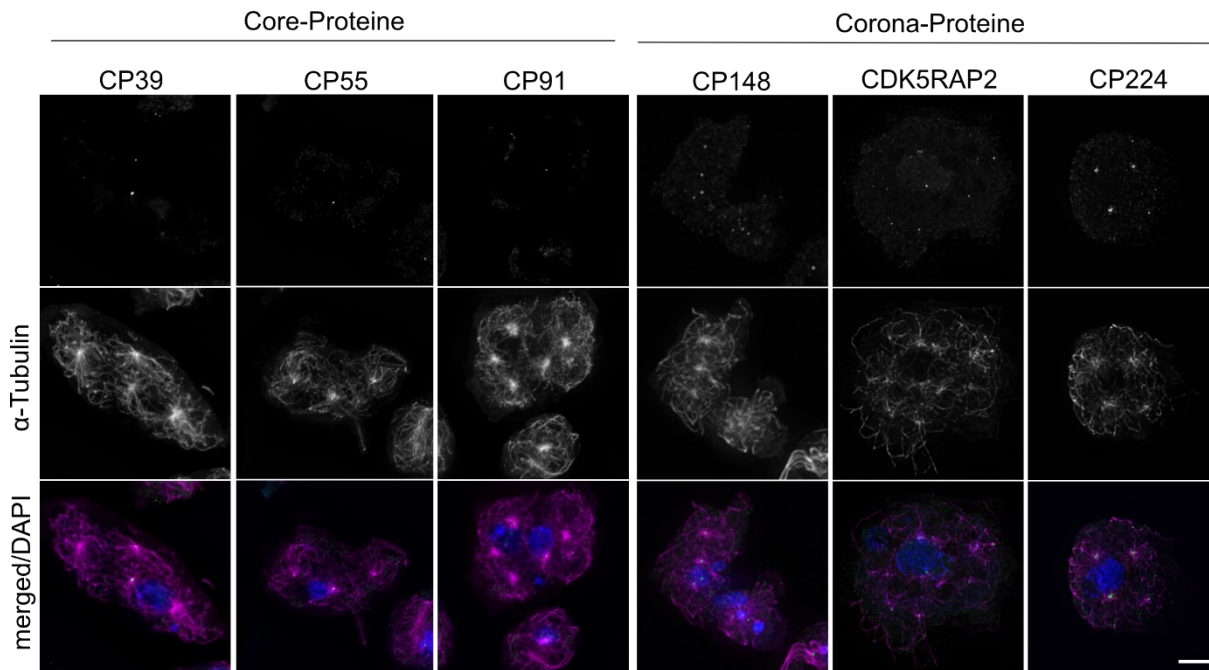


Abbildung 9: Immunfluoreszenznachweis von unterschiedlichen Corona- und Core-Proteinen in Cep192-RNAi-Zellen mit überzähligen MTOC. Methanolfixierte Zellen zeigen in der Immunfluoreszenz kaum Signale an den MTOC für die untersuchten Core-Proteine CP39, CP55 und CP91, während die Corona-Proteine CP148, CDK5RAP2 und CP224 an den MTOC lokalisieren. Färbung mit anti-CP39, anti-CP55, anti-CP91, anti-CP148, anti-CDK5RAP2/anti-rabbit-AlexaFluor-488, anti-CP224/anti-mouse-AlexaFluor-488 und anti-YL1/2/anti-rat-AlexaFluor-568. DNA mit DAPI. Gezeigt sind Maximum Intensity-Projektionen dekonvolvierter Bilder. Größenstandard= 5 μ m.

Der Einfluss des Cep192-RNAi auf die Morphologie der Centrosomen wurde mittels Transmissions-Elektronenmikroskopie genauer untersucht. Im Vergleich zu den intakten Centrosomen der Kontrollzellen (Abbildung 10A-A') zeigte sich bei den Centrosomen des Knockdowns eine deutliche Veränderung der Core-Struktur: Sie erscheint insgesamt weniger elektronendicht und weniger organisiert, die Abgrenzung zur Corona wirkt weniger trennscharf und die äußeren Schichten bei den intakteren, kernassoziierten Centrosomen (Abbildung 10B) reduziert. Darüber hinaus waren kernassoziierte Centrosomen, die kaum noch eine Core-Struktur aufwiesen ebenso zu finden (Abbildung 10B'). Die überzähligen, nicht kernassoziierten MTOC zeigen wenig oder kein stark elektronendichtes Material (Abbildung 10C-C'). Dieses Ergebnis passte gut zur Beobachtung in der Immunfluoreszenz, dass die überzähligen MTOC hauptsächlich aus Corona-Komponenten aufgebaut sind. Die Veränderung der Core-Struktur an den Centrosomen im RNAi waren damit stark.

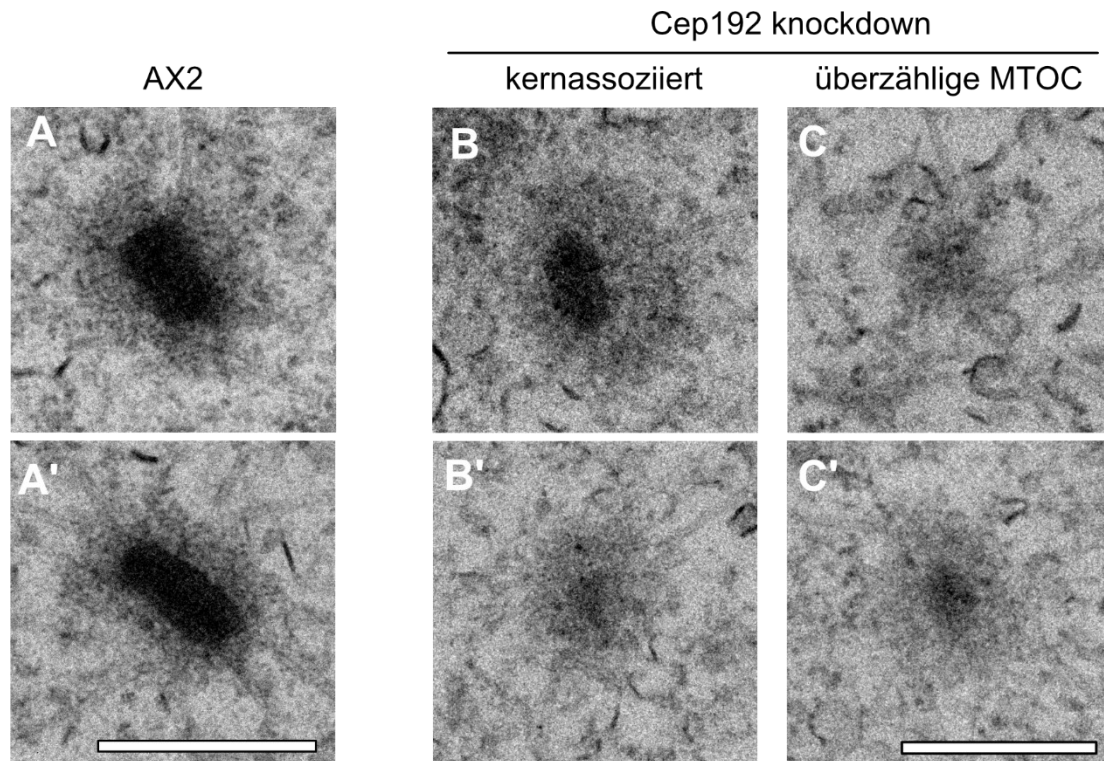


Abbildung 10: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von AX2-Centrosomen und Centrosomen/MTOC des Cep192-RNAi. (A-A') Elektronenmikroskopische Aufnahme von zwei repräsentativen AX2-Centrosomen mit elektronendichter Core-Struktur und umlagernder Corona-Struktur. (B-B') Kernassoziierte Centrosomen der Cep192-RNAi-Zellen zeigen eine deutlich veränderte Topologie der Core-Struktur bis hin zum beinahe kompletten Verlust dieser bei intakter Corona-Struktur. (C-C') Die überzähligen MTOC zeigen wenig oder kein elektronendichteres Material, das der Core-Struktur entsprechen könnte. Gezeigt sind Aufnahmen von Ultradünnschnitten einer Dicke zwischen 80 und 90 nm. Größenstandard =500 nm.

Um zu klären, wie die überzähligen MTOC in den Cep192-RNAi-Zellen entstehen, wurde der Cep192-RNAi in GFP- α -Tubulin exprimierenden Zellen wiederholt und Lebendzellaufnahmen der erhaltenen Zellen angefertigt.

Die überzähligen MTOC blieben in der Mitose als GFP- α -Tubulin-Fluoreszenzpunkt sichtbar (Abbildung 11A). Die Lebendzellaufnahme von einer Mitose zeigte, dass diese aber nicht mit der sich aufbauenden Spindel zu interferieren scheinen. Da die MTOC sich frei in der Zelle bewegen können, ist das entsprechende Fluoreszenzsignal in der Lebendzellaufnahme nicht durchgehend zu sehen (Abbildung 11B, 790 sec, Video 2). Die hier gezeigte Zelle hatte zudem Probleme bei der Cytokinese (vgl. Ende Video 2), da diese auch vereinzelt im GFP- α -Tubulin-Ausgangsstamm auftraten, kann nicht davon ausgegangen werden, dass es sich um einen auf den RNAi zurückzuführenden Phänotyp handelt.

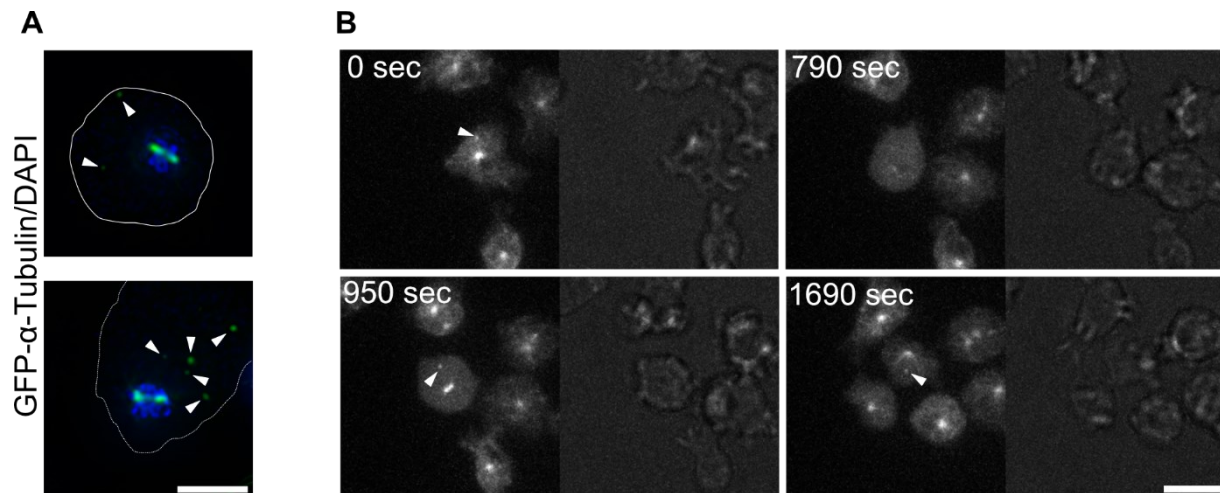


Abbildung 11: Überzählige MTOC des Cep192-RNAi in GFP- α -Tubulin-Zellen bleiben während der Mitose als GFP-Fluoreszenzpunkte erkennbar. (A) Zwei fixierte Zellen in der Metaphase zeigen weitere GFP-Fluoreszenzpunkte in der Zelle (Pfeilspitzen). Der Zellrand ist weiß gestrichelt markiert. DNA-Färbung mit DAPI, Größenstandard = 5 μ m. (B) Ausgewählte Zeitpunkte aus dem Video 2: Zu Beginn der Mitose (790 sec) verschwindet die GFP- α -Tubulin-Fluoreszenz kurz, im weiteren Verlauf ist immer wieder das überzählige MTOC (Pfeilspitze) zu sehen, dass nicht mit dem Spindelaufbau interferiert. Größenstandard = 10 μ m.

Ähnlich wie beim Knockout von CP55 wurden auch für den Cep192-RNAi einige Zellen in der Lebendzellaufnahme identifiziert, die lange in einem frühen Stadium der Mitose verblieben. In Video 3 (Abbildung 12A) waren die Interphase-Mikrotubuli der Zelle zum Aufnahmebeginn bereits depolymerisiert, trotzdem vergingen 28 weitere Minuten, bevor es zu einer schnellen phänotypischen Veränderung kam: von der Spindel spaltete sich ein MTOC ab (1640 sec), es bildete sich noch eine stark gekrümmte Spindel (1810 sec), aber in der Zelle bildete sich wieder ein Interphase-Mikrotubuli-Skelett aus. Die Zelle besaß nun aber zwei MTOC. In Video 4 (Abbildung 12B) traten die Probleme etwas später in der Mitose auf. Auch hier befand sich die Zelle zum Aufnahmestart bereits in der Mitose. Möglicherweise ist in der Aufnahme bei 0 Sekunden ein bereits vorhandenes MTOC (Pfeilspitze) zu erkennen. Es dauerte über 10 Minuten, bis die Mitose erkennbar voranschritt. Dann passierte eine schnelle phänotypische Veränderung der Spindel in der Meta- oder Anaphase (geschätzt aufgrund der Spindellänge), bei der sich die Spindel schlagartig elongierte und dabei wieder eine starke Krümmung der Spindel beobachtet werden konnte (910 sec). An einem der beiden Pole entstanden mehrere, vermutlich neu gebildete MTOC (1840 sec, Pfeilspitzen), wobei es beinahe zur Cytokinese kam, die wiederum nicht erfolgreich war.

Es soll nicht unerwähnt bleiben, dass die beiden gezeigten Fälle durchaus Extremfälle darstellen, es wurden auch einige normal ablaufende Mitosen gefunden. So war auch eine vergleichende Auswertung der Mitosestadien in Fixierungen von Cep192-RNAi-Zellen und GFP- α -Tubulin unauffällig. Anders als beim CP55-Knockout zeigte sich keine Häufung von frühen Mitosephasen (Kuhnert et al., 2012a).

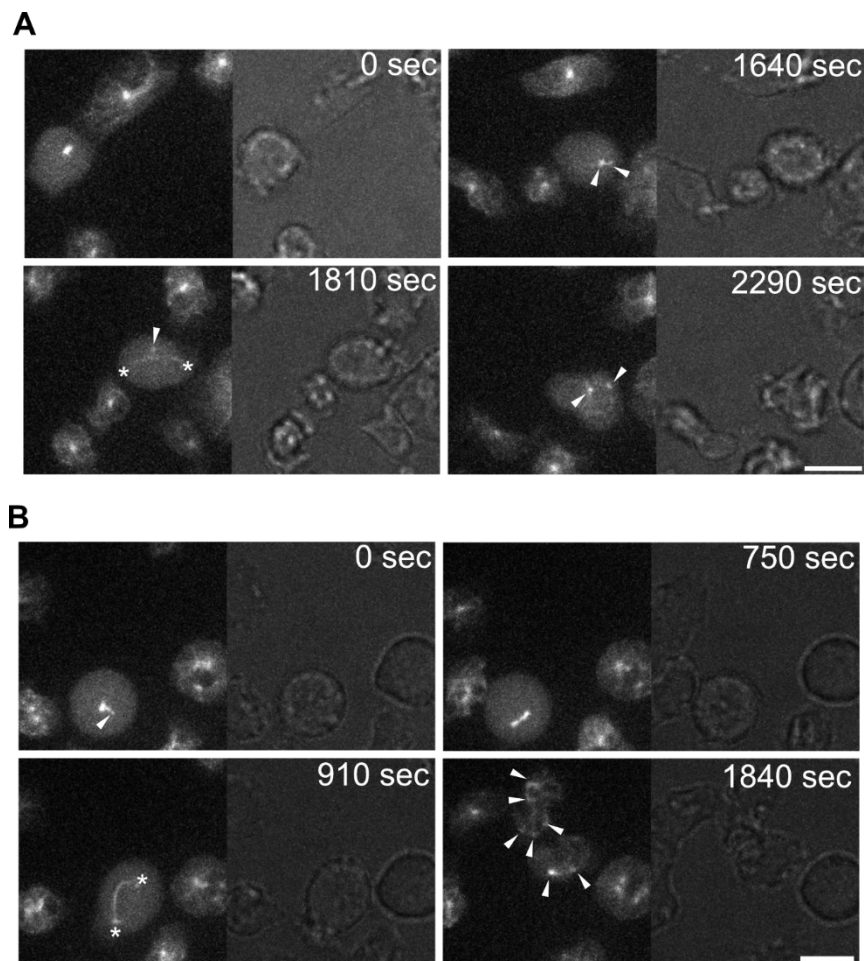


Abbildung 12: Entstehung von MTOC in nicht normal verlaufenden Mitosen in Cep192-RNAi-Zellen mit GFP- α -Tubulin. (A) Ausgewählte Zeitpunkte aus Video 3 zeigen eine Zelle, die zu Aufnahmebeginn bereits eine frühe Mitosespindel aufweist, die sich aber nicht elongiert. Ab 1640 sec wird ein zweites GFP-Signal erkennbar (Pfeilspitze), es bildet sich noch eine schlagartig elongierende Spindel (Enden mit * markiert), die Mitose bricht aber offenbar ab. (B) Ausgewählte Zeitpunkte aus Video 4 zeigen die mögliche Entstehung mehrerer MTOC (bei 1840 sec, Pfeilspitzen). Auch hier tritt eine schnelle Elongation mit krumm geformter Spindel auf. Größenstandard = 10 μ m.

3.1.4 Cep192-GFP ist von den Core-Proteinen am höchsten exprimiert

Die starken Veränderungen der Core-Struktur im Cep192-RNAi führten zu einer Untersuchung der Menge der bekannten Core-Strukturproteine. Da für alle Core-Proteine Knock-in-Stämme mit GFP-Tag existierten, konnte durch die Tatsache, dass die Expression der jeweiligen Fusionsproteine unter dem endogenen Promotor

stattfindet, eine Untersuchung der Proteinmenge in der Immunfluoreszenzmikroskopie durchgeführt werden. Die jeweiligen Zellen wurden identisch methanolfixiert und mit DAPI die DNA angefärbt. Bei der fluoreszenzmikroskopischen Aufnahme wurde die Belichtungszeit für den GFP-Kanal konstant gehalten, eine Z-Projektion durchgeführt und die maximal angezeigten Grauwerte vor der Auswertung einheitlich fest eingestellt, um die Vergleichbarkeit bestmöglich zu gewährleisten. Abbildung 13A zeigt beispielhafte GFP-Signale der Zellen aus den entsprechenden Aufnahmen: es wird deutlich, dass die GFP-Fluoreszenz und damit die Menge an Protein deutlich variieren. Für die weitere Auswertung wurde die mittlere Fluoreszenzintensität einer 8x8-Pixel großen Fläche um das Fluoreszenzsignal gemessen und ein in der jeweiligen Zelle gemessener 8x8-Pixel-Hintergrund von diesem Wert abgezogen. Die erhaltenen Daten sind in Abbildung 13B grafisch dargestellt. Cep192 scheint am höchsten konzentriert am Centrosom vorzuliegen, insbesondere im Vergleich zu CP55, dem

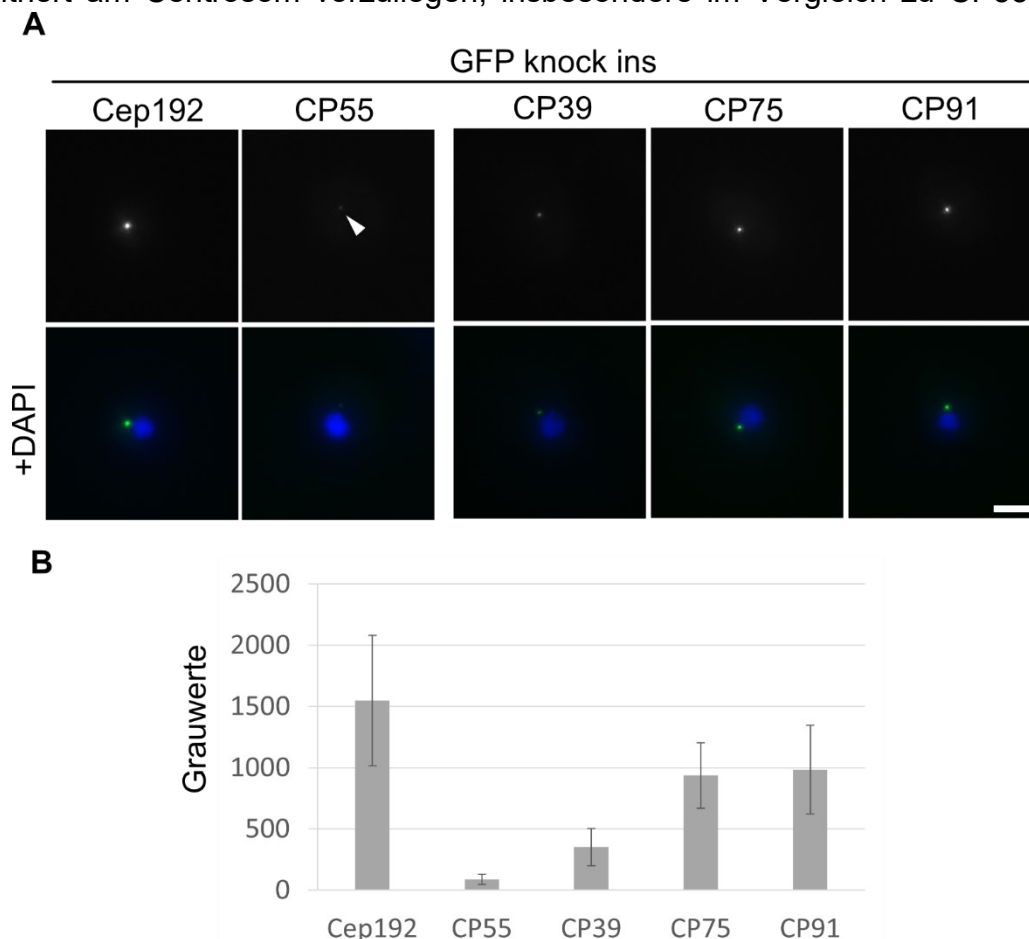


Abbildung 13: Vergleich der Fluoreszenzintensität der GFP-Core-Protein Knock-ins. (A) Beispielhafte Fluoreszenzintensitäten für Cep192-, CP55-, CP39-, CP75- und CP91-GFP. Gezeigt sind nicht dekonvolvierte Bilder methanolfixierter Zellen, mit identisch eingestelltem, angezeigten Grauwert-Bereich. DNA-Färbung mit DAPI. Größenstandard = 5µm (B) Grafische Auswertung der einzelnen gemessenen Fluoreszenzintensitäten (\pm Standardabweichung). Gemessene Fluoreszenzwerte: Cep192-GFP n=21, CP55-GFP n=51, CP39-GFP n=34, CP75 n=43, CP91-GFP n=24.

anderen Protein, dass der äußeren Schicht zugeordnet wird, ist der Unterschied sehr deutlich: CP55-GFP erreichte nur knapp 6% der Cep192-GFP-Fluoreszenzintensität.

Bei den Proteinen, die der inneren Core-Schicht zugeordnet werden, zeigten CP91- und CP75-GFP vergleichbare Fluoreszenzintensitäten. Die Fluoreszenzintensität von CP39-GFP fiel mit 35% der CP91-Fluoreszenz dagegen geringer aus, war aber immer noch deutlich höher als die von CP55-GFP.

Die ermittelten Werte sind auch für die hochauflösende Fluoreszenzmikroskopie relevant: hier ist es von Vorteil, eine dichte Fluoreszenzmarkierung des Proteins zu erreichen, da aufgrund langer Expositionszeiten und hoher Laserintensitäten der Fluoreszenzverlust hoch ist.

Dieser Fluoreszenzverlust tritt auch bei der Expansion Microscopy auf und entsteht hier bereits vor der Mikroskopie aufgrund der vergrößerten räumlichen Trennung der quervernetzten Fluorophore in der gequollenen Gelmatrix. Diese führt zu einer 64-fach „verdünnten“ Fluoreszenz (bei Expansionsfaktor 4: $4^3=64$). Die Berechnung lässt den möglichen Verlust von Fluorophoren, die nicht quervernetzt wurden, noch außer Acht. Neben dem „Degree of Labelling“ des Nachweiskonjugates und der Verwendung photostabiler Fluorophore kann die Verwendung polyklonaler Antikörper und damit die mehrfache Markierung eines Proteins die Fluoreszenzausbeute erhöhen. Auch eine Überexpression des Proteins erhöht die verfügbaren Antigene, hat aber durch die unnatürliche Proteinmenge bei der Strukturaufklärung klare Nachteile.

In dieser Arbeit sollten über die Knock-in-Strategie an die Proteine fusionierte Tags mit einer Expression des Fusionsproteins unter dem endogenen Promotor verwendet werden. Ein unter dem endogenen Promotor exprimiertes Fusionsprotein, dass über einen kleinen Tag nachgewiesen wird, wird nur von einem Nachweis-Molekül gebunden, deshalb rückte die ermittelte Expressionshöhe der einzelnen Core-Proteine in den Fokus: Für die Etablierung eines Tags zur Fluoreszenzmarkierung wurde Cep192 ausgewählt, da es am stärksten exprimiert zu sein scheint und die angenommene Lokalisation in den äußeren Schichten in der hochauflösenden Mikroskopie ein charakteristisches Fluoreszenzbild ergeben sollte.

3.2 VALIDIERUNG VON ZWEI TAG-SYSTEMEN AM CENTROSOM

3.2.1 Die Etablierung des SpotH6-Tags

Für die hochauflösende (Fluoreszenz-)Mikroskopie ist die Verwendung kleiner Tags in Kombination mit möglichst kleinen Nachweis-Strukturen vorteilhaft. V_{HH}-Peptide, die 15 kDa kleinen variablen Ketten aus Schwereketten-Antikörpern der Alpakas, sind eine Möglichkeit, eine höhere Auflösung zu erzielen, da sie direkt fluoreszenzmarkiert verwendet werden und die konjugierten Fluoreszenzfarbstoffe sich aufgrund der geringeren Größe viel näher am Epitop befinden. In dieser Arbeit sollte der kommerziell von Chromotek (Planegg-Martinsried, Deutschland) erhältliche Spot-Label[®] (im Folgenden Spot-V_{HH} genannt), ein bivalenter V_{HH} gegen den Spot-Tag verwendet werden.

Der Spot-Tag basiert auf dem BC2-Tag, der vom Spot-V_{HH} erkannt wird und von Virant et al. entwickelt wurde (dort bivBC2-Nb genannt, (Virant et al., 2018)). Der 12 Aminosäuren große Spot-Tag ist eine durch rationales Design von Chromotek entwickelte Variante des BC2-Tags, bei der vier Aminosäuren verändert wurden (BC2: PDRKAAVSHWQQ, Spot: PDR**V**RAVSHW**S**S) und die eine höhere Affinität zum Spot-V_{HH} und somit weniger unspezifischen Hintergrund aufweist (Herick, 2018). Ein Plasmid mit der Sequenz des um einen His-Tag ergänzten BC2H6-Tag existierte bereits im Labor, die notwendigen Basen in der DNA-Sequenz wurden mittels Q5-Mutagenese mutiert, um den für den Spot-V_{HH} optimierten SpotH6-Tag zu erhalten. Der SpotH6-Tag wurde gegen die GFP-Kassette im Cep192-GFP Knock-in-Plasmid getauscht und die nach der Selektion erhaltenen Zellen immunfluoreszenzmikroskopisch untersucht: dazu wurden Cep192-SpotH6 Zellen methanolfixiert und neben Cep192-SpotH6 die centrosomale Corona mithilfe eines herkömmlichen Antikörpers gegen CP224 gefärbt. Abbildung 14A zeigt die Lokalisation von Cep192-SpotH6 innerhalb des Signals von CP224, was sich graphisch durch eine entlang der eingezeichneten Linie durchgeführte Messung der Fluoreszenzintensitäten darstellen lässt (Abbildung 14B).

Auch die Validierung des Fusionsproteins im Western Blot war möglich: mithilfe eines His-Tag-Antikörpers konnte das getaggte Protein in Präparationen von Centrosomen ebenfalls identifiziert werden (Abbildung 14C). Ein Test der üblichen Fixierungsmethoden in *D. discoideum* ergab, dass der Spot-V_{HH} in der Immunfluoreszenz nur mit einer Methanolfixierung funktionierte.

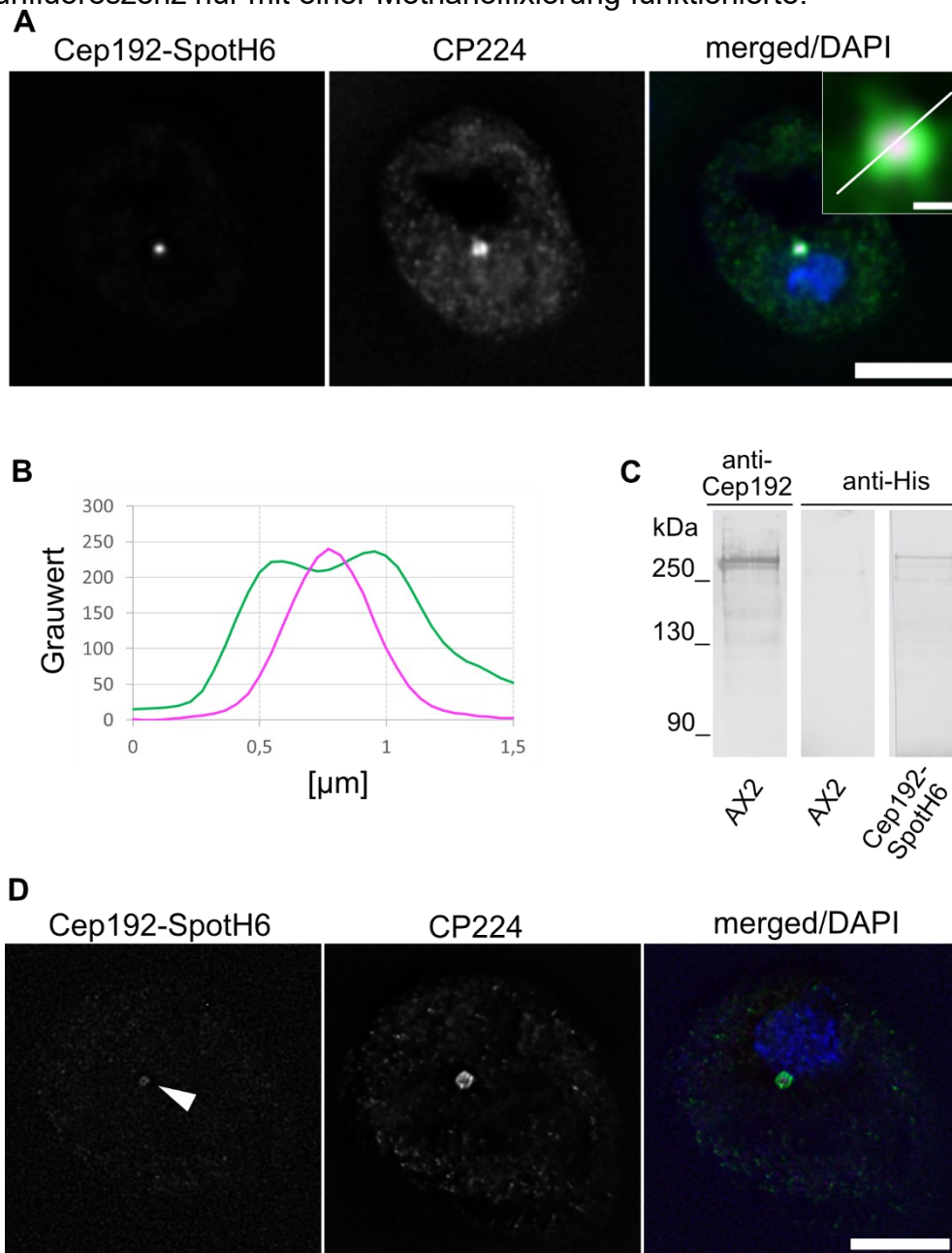


Abbildung 14: Validierung von Cep192-SpotH6. (A) Cep192-SpotH6 lokalisiert in der Immunfluoreszenz innerhalb des Corona-Markerproteins CP224. Maximum Intensity-Projektion einer methanolfixierten Zelle, Färbung mit Spot-V_{HH}-Atto-594 und anti-CP224/anti-mouse-AlexaFluor-488. Größenstandard = 5 μm (Inset= 500 nm) (B) Grafische Auswertung der Fluoreszenzintensitäten entlang der in (A) eingezeichneten Linie für CP224 (grün) und Cep192-SpotH6 (magenta). (C) Nachweis des endogenen Cep192 in AX2 beziehungsweise des Cep192-SpotH6-Fusionsproteins in centrosomalen Fraktionen im Western Blot mit anti-His/anti-mouse-AP beziehungsweise anti-Cep192/anti-rabbit-AP und anschließender Entwicklung mit NBT/BCIP. (D) Nach der Expansion ist das Signal des Spot-V_{HH} und damit Cep192-SpotH6 noch nachweisbar (Pfeilspitze), Färbung wie bei (A). Gezeigt sind Maximum Intensity-Projektionen dekonvolvierter Bilder. Größenstandard = 5 μm (Expansionsfaktor-bereinigt).

Aufgrund der im Labor bereits erfolgreich etablierten Expansion Microscopy mit herkömmlichen Antikörpern (Grafe et al., 2019), wurde der Spot-V_{HH} auf seine Verwendbarkeit in der Expansion Microscopy untersucht. Eigene Messungen in elektronenmikroskopischen Aufnahmen von AX2-Centrosomen im Rahmen dieser Arbeit ergaben zuvor eine Dicke von 142 ± 18 nm (Mittelwert \pm Standardabweichung, $n=25$) für die Core-Struktur. Die äußeren Core-Schichten befinden sich damit in einem Abstand, der nicht mit klassischer Fluoreszenzmikroskopie aufgelöst werden kann, da er unterhalb der maximal möglichen Auflösung liegt. Es wurde angenommen, dass mittels Expansion Microscopy (Vergrößerungsfaktor ≈ 4 -fach) die Core-Struktur genug vergrößert sein müsste, um sie auch mit herkömmlichen Fluoreszenzmikroskopen auflösen zu können.

Die Cep192-SpotH6-exprimierende Zellen wurden fixiert, mit dem Spot-V_{HH} und CP224 gefärbt und anschließend expandiert.

Eine erste mikroskopische Analyse ergab, dass die Fluoreszenz des Spot-V_{HH} nach der Expansion erhalten bleibt. Fragmente des relativ kleinen V_{HH} werden demnach durch die Postfixierung vor dem proteolytischen Verdau ausreichend mit der Gelmatrix verknüpft (Abbildung 14D, Pfeil). Die Einbeziehung der gemessenen Vergrößerung der Gelmatrix ermöglicht eine näherungsweise Einschätzung der tatsächlichen Größe der Struktur vor der Expansion. Dazu wurde im Bildbearbeitungsprogramm FIJI die Skalierung der Bilder ausgelesen und mithilfe des Vergrößerungsfaktors angepasst. Die Größenstandards in den Bildern der Expansion Microscopy wurden so Expansionsfaktor-bereinigt.

3.2.2 Die Etablierung des BioH6-Tags

Zusätzlich zum SpotH6-Tag wurde an der Etablierung eines weiteren Tags gearbeitet, um mehr als ein Protein gleichzeitig in der Expansion Microscopy untersuchen zu können.

Da keine Proteine des Centrosoms endogen biotinyliert werden, wurde die Verwendung einer kurzen Biotin-Akzeptorsequenz, die von endogenen Biotinligasen in *D. discoideum* biotinyliert werden kann, angestrebt. Die Biotinylierung des Tags und somit des Zielproteins kann dann mit fluoreszenzmarkiertem Streptavidin nachgewiesen werden (Abbildung 15 zeigt eine schematische Darstellung). Streptavidin ist zwar mit 52,8 kDa (Herstellerangabe) etwas größer als der Spot-V_{HH},

sollte aber immer noch deutliche Vorteile im Vergleich mit herkömmlichen Antikörpern bieten.

Als Grundlage diente die bereits beschriebene Biotin-Akzeptor-Sequenz einer Transcarboxylase aus *Propionibacterium shermanii* (Cronan, 1990), die bereits in Hefe- und Säugerzellen zur Biotinylierung von Zielproteinen durch endogene Biotinligasen verwendet wurde (Tagwerker et al., 2006). Die 75 Aminosäuren kodierende Sequenz wurde für *D. discoideum* codonoptimiert (<https://www.kazusa.or.jp/codon/>, (Nakamura, 2000)), um einem His-Tag („H6“) ergänzt und mittels „GeneArt Gene Synthesis“ von ThermoFisher Scientific (Waltham, MA, USA) synthetisiert. Die Sequenz aus dem Gensynthese-Plasmid wurde letztlich in einen vorhandenen Knock-in-Vektor für das centrosomale Protein Cep192 umkloniert und in AX2-Zellen transformiert (siehe Kapitel 5.2.1).

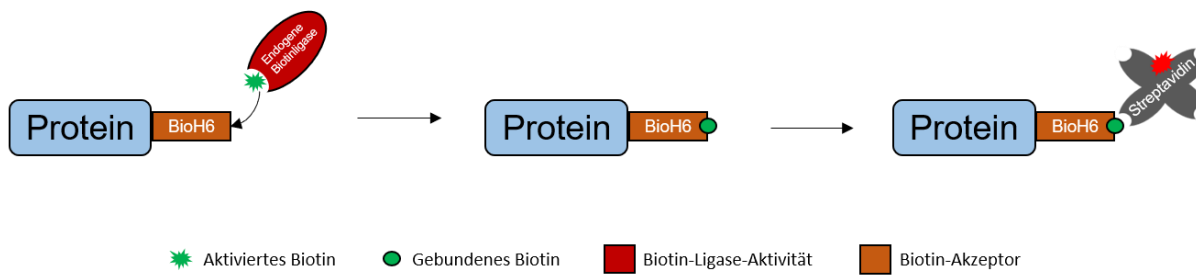


Abbildung 15: Funktionsweise des BioH6-Tags als Biotin-Akzeptorsequenz und anschließender Nachweis mit Streptavidin. Der an das untersuchte Protein fusionierte BioH6-Tag wird von endogenen Biotinligasen von *D. discoideum* biotinyliert und das Fusionsprotein kann dann über Streptavidin-Konjugate nachgewiesen werden.

Die nach der Blasticidin S-Selektion wachsenden Zellen wurden auf eine Biotinylierung am Centrosom untersucht: dazu wurde fluoreszenzmarkiertes Streptavidin verwendet und das Centrosom zusätzlich mit einem CP224-spezifischen Antikörper gefärbt. Die erhaltenen Immunfluoreszenzbilder zeigten das typische Biotinylierungsmuster in *D. discoideum*, mit mehreren markierten, größeren und punktförmigen Strukturen in der Zelle, die den mitochondrialen, biotinylierten methylcrotonyl-CoA- (MccA), propionyl-CoA- (PccA) und acetyl-CoA (AccA)-Carboxylasen entsprechen (Batsios et al., 2016). Darüber hinaus zeigten Cep192-BioH6-Tag-positive Zellen im Vergleich zu AX2-Zellen ein deutliches Streptavidinsignal am Centrosom (Abbildung 16A). Daraus folgte auch, dass das im HL5c-Medium enthaltene Biotin ausreicht, um eine Biotinylierung am BioH6-Tag hervorzurufen. Außerdem ist gut zu erkennen, dass auch Cep192-BioH6, wie zuvor Cep192-SpotH6, eine Lokalisation innerhalb von CP224 zeigt. Auch für den BioH6-Tag war eine Validierung im Western Blot von centrosomalen Fraktionen möglich: zum einen war der Nachweis über den His-Tag mit einem spezifischen Antikörper, zum

anderen, ähnlich wie bei der Immunfluoreszenz, indirekt auch mit Streptavidin möglich. Die in den AX2-Centrosomenpräparationen ebenfalls vorhandenen Banden entsprechen der MccA- (77 kDa) und der PccA-Carboxylase (80 kDa), die mit präpariert werden (Abbildung 16B).

Auch der BioH6-Tag wurde auf seine Tauglichkeit für die Expansion Microscopy getestet. Cep192-BioH6-Zellen wurden methanolfixiert und anschließend expandiert. Auch die Streptavidinfluoreszenz bleibt hier erhalten und machte einen Einsatz des Tags in der Expansion Microscopy möglich (Abbildung 16C).

3.2.3 In der Expansion Microscopy wird die dreidimensionale Form der Core-Struktur sichtbar

Die Core-Struktur des Centrosoms ist zylindrisch aufgebaut. In der Seitenansicht erscheint sie in der Elektronenmikroskopie quadratisch und geschichtet, in der Draufsicht rund (Koonce et al., 2018).

Zellkortex-assoziierte Mikrotubuli können starke Zugkräfte auf das Centrosom ausüben und beeinflussen dadurch die Position des Centrosoms und des Zellkerns in der Zelle (Koonce, 1999). Zugkräfte, die die Position des gesamten Centrosoms verändern, könnten auch einen Einfluss auf die Orientierung der Core-Struktur haben.

Das zellzyklusabhängige Verhalten von endogenem Cep192 und Cep192-GFP (Pitzen et al., 2021) sprach für eine Lokalisation von Cep192 in der äußeren Core-Schichten. Eine Markierung des Corona-Proteins CP224 zusammen mit Streptavidin-markiertem Cep192-BioH6 und der DNA zeigte in der Expansion Microscopy eine zweischichtige Cep192-BioH6-Fluoreszenz mit umgebender CP224-Markierung. Dies entspräche der erwarteten Lokalisation des Proteins in den äußeren Core-Schichten (Abbildung 17A-A', B).

Daneben konnte aber auch eine kreisförmige Struktur für Cep192-BioH6 beobachtet werden (Abbildung 17C). Ein Vergleich mit elektronenmikroskopischen Aufnahmen von Centrosomen zeigte vergleichbare Strukturen, die abhängig von der Orientierung der Core-Struktur in der Zelle auftreten. Die rechteckig erscheinende, dreischichtige Struktur lag am Kern unterschiedlich stark gekippt vor, Abbildung 17D zeigt relativ zum Zellkern unterschiedliche Orientierungen mit einer Core-Schichten Richtung Kern gerichtet (Bild 1 und 2) sowie einer Core-Struktur, bei der die drei Schichten eher lateral orientiert am Kern zu sitzen scheint (Bild 3 und 4).

Lag die Core-Struktur gedreht vor, wie in Abbildung 17E (Bild 1 und 2) zu sehen, erscheint sie in der Elektronenmikroskopie rund, seitlich am Zellkern liegend. Bild 3 und 4 zeigen vermutlich Orientierungen zwischen der Drauf- und der Seitenansicht der Core-Struktur.

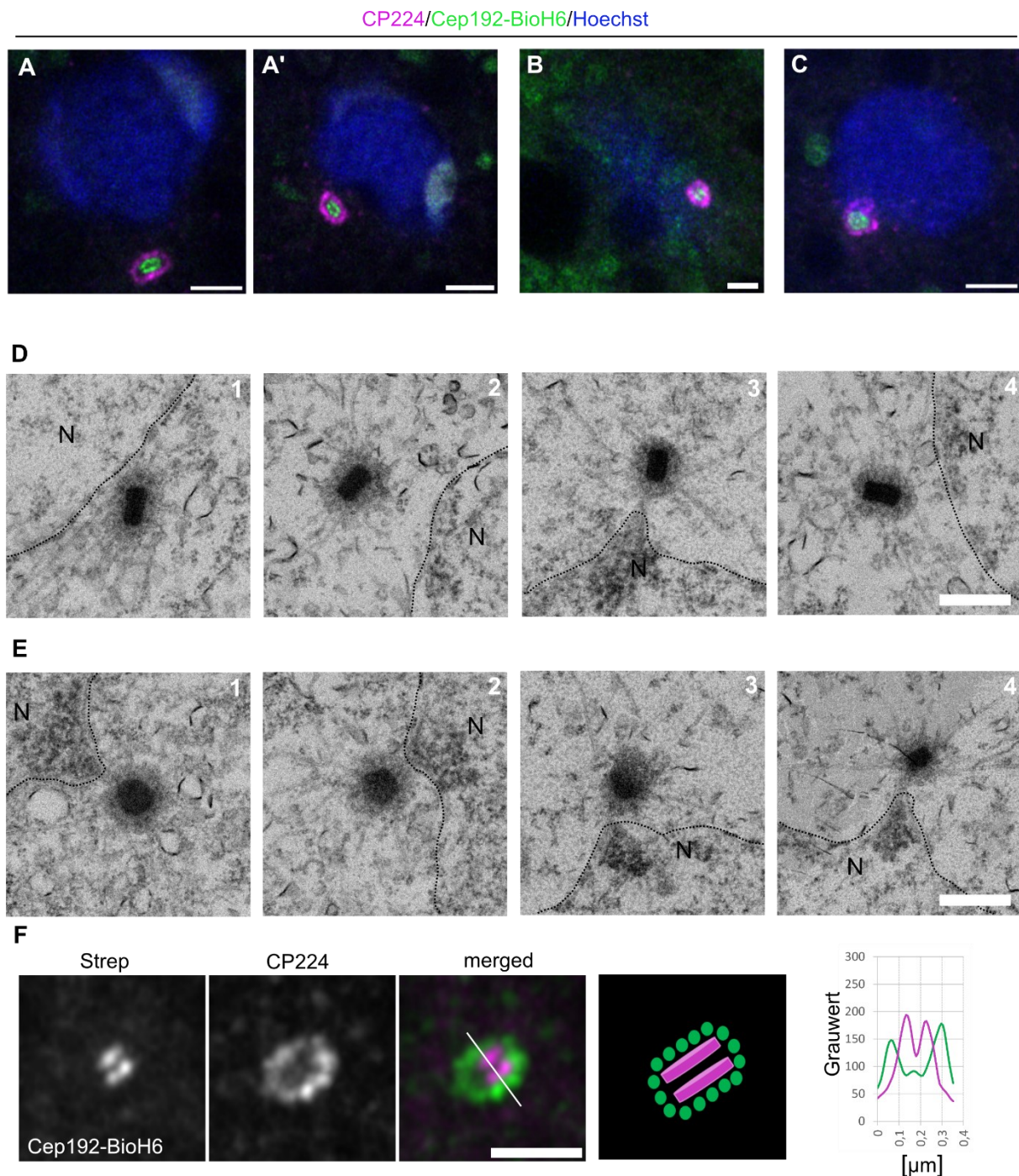


Abbildung 17: Vergleich von expandierten Zellen mit elektronenmikroskopischen Aufnahmen und Orientierung der Core-Struktur. (A-A', B, C) In expandierten Zellen werden unterschiedliche Strukturen für Cep192-BioH6 auflösbar. Zu erkennen ist zum einen eine zweischichtige Cep192-BioH6-Fluoreszenz (A-A' B), mit umgebender CP224-Markierung, die einer Seitenlage des Centrosoms entspricht und zum anderen eine runde, von CP224 umgebene Cep192-BioH6-Fluoreszenz, die einer gedrehten Lage entspricht (C). Färbung mit Streptavidin-AlexaFluor-488 und anti-CP224/anti-mouse-AlexaFluor-568. DNA mit Hoechst-33342. Größenstandard = 500 nm (Expansionsfaktor-bereinigt) (D) Elektronenmikroskopische Aufnahme wildtypischer Centrosomen (AX2/TP36) zeigen die unterschiedliche Orientierung der geschichteten Core-Struktur relativ zum Kern (N, die gestrichelte Linie umreißt die Zellkernmembran). (E) Die Draufsicht auf das Centrosom erscheint in der Elektronenmikroskopie rund, es kommen aber auch immer wieder vermutlich zwischen Seiten- und Draufsicht orientierte Centrosomen vor. Größenstandard in den EM-Bildern= 500 nm. (F) Auswertung der Fluoreszenzintensitäten eines expandierten Centrosoms von CP224 und Cep192-BioH6 entlang der eingezeichneten Linie, deren grafische Auswertung und ein zugehöriges Modell. Fluoreszenzmarkierung erfolgte analog zu (A-C). Größenstandard = 500 nm (Expansionsfaktor-bereinigt).

Wie in Abbildung 17A-C und F zu sehen ist, kann die Core-Struktur also in der Expansion Microscopy gut aufgelöst werden, je nach Orientierung wird sogar die dreidimensionale, zylindrische Form der Core-Struktur, die man bis dato nur in elektronenmikroskopischen Aufnahmen identifizieren konnte, erkennbar. Das bedeutet aber auch, dass bei der Zuordnung der Proteine zu den einzelnen Schichten der Core-Struktur auf die korrekte Orientierung des betrachteten Centrosoms geachtet werden muss, da potenziell eine leicht gekippte Core-Struktur ausreicht, um die drei Schichten nicht mehr auflösen zu können.

Eine Auswertung von $n=176$ Centrosomen in fixierten Zellen ergab in der Immunfluoreszenz zudem eine Variabilität der Lokalisation des Centrosoms am Zellkern relativ zur Z-Achse. Neben einer Lokalisation abgesetzt seitlich am Zellkern war in 15% der Fälle das Centrosom auf oder unter dem Zellkern positioniert. Abbildung 17B zeigt ein entsprechendes Centrosom, welches in einer anderen Z-Ebene als die DNA-Färbung lokalisiert und dementsprechend eine Position ober- oder unterhalb des Kerns hat.

Das Auftreten von zwei Fluoreszenzschichten für Cep192-BioH6 erlaubte die Auswertung der Fluoreszenzintensitäten entlang der in Abbildung 17F eingezeichneten Linie und die grafische Auswertung. Es wird deutlich, dass die Cep192-BioH6-Fluoreszenz auch nach der Expansion Microscopy deutlich innerhalb der CP224-Fluoreszenzmaxima zu finden ist. Dies führt zum gezeigten Modell.

3.2.4 Cep192-SpotH6 und -BioH6 zeigen vergleichbare Ergebnisse

Da Cep192-BioH6 in Abhängigkeit der Orientierung des Centrosoms eine Lokalisation zeigte, die den äußeren Core-Schichten entsprach, erschien das Protein als ein geeigneter Marker für die Einschätzung der räumlichen Lage der Core-Struktur.

Zur Evaluierung der Qualität des Markers und der zwei etablierten Nachweissysteme zur Aufklärung der Core-Struktur wurden die zwei Cep192-Fusionsproteine in der Expansion Microscopy miteinander verglichen. Dazu wurden mikroskopische Aufnahmen fluoreszenzmarkierter Centrosomen verwendet, die zwei Cep192-Fluoreszenzschichten zeigten.

Abbildung 18A zeigt zwei repräsentative mikroskopische Aufnahmen von Spot- V_{HH} - beziehungsweise Streptavidin-markiertem Cep192-Fusionsproteinen. Es wird deutlich, dass das V_{HH} - und das Streptavidin-markierte Cep192 ähnliche Ergebnisse mit zwei Fluoreszenzschichten liefern. Eine Auswertung der Abstände zwischen den

Fluoreszenzschichten unter Einbeziehung des Expansionsfaktors ergab für den durchschnittlichen Cep192-SpotH6-Abstand 110 ± 15 nm (Mittelwert \pm Standardabweichung, $n=25$) und für den Cep192-BioH6-Abstand $93\text{nm} \pm 5\text{nm}$ (Mittelwert \pm Standardabweichung, $n=6$).

Als eine mögliche Fehlerquelle bei der Einschätzung der Größe der Struktur wurde die Anpassung der Skalierung über den gemessenen Expansionsfaktor identifiziert. Die Ermittlung der Größe der weniger als einen Zentimeter Kantenlänge messenden Gele vor der Expansion erfolgte mithilfe einer Millimeter-Skala und könnte zu ungenau sein. Für die beiden gezeigten Intensitätsverteilungen wurde eine Berechnung der Abstände ohne Einbeziehung des Expansionsfaktors durchgeführt. Es zeigt sich, dass der Unterschied für den Abstand der Fluoreszenzmaxima zwischen den Messungen der gezeigten Cep192-SpotH6 und Cep192-BioH6-Messungen nur 34 nm beträgt. 34 nm war die Pixelgröße der ausgewerteten Bilder, somit unterscheidet sich der Abstand in der Fluoreszenz nur um einen einzelnen gemessenen Datenpunkt (=Pixel) und wird durch die Verrechnung mit dem Expansionsfaktors in diesem Fall verstärkt (Abbildung 18B). Das könnte ein Hinweis darauf sein, dass die Hydrogelmatrix ein reproduzierbareres Quellverhalten zeigt, als es die gemessenen Expansionsfaktoren vermuten lassen, die zwischen 4-fach und 4,95-fach schwankten.

Der ermittelte Abstand der beiden Fluoreszenzmaxima von SpotH6- und BioH6-getagtem Cep192 entspricht dabei der Distanz der Mittelpunkte der jeweiligen emittierten Fluoreszenz. Betrachtet man die schematische Darstellung der Core-Struktur in Abbildung 18C und nimmt als Breite, die zuvor in elektronenmikroskopischen Aufnahmen gemessenen, 142 nm an, ergibt sich für den Abstand der Mitte der beiden äußeren Core-Schichten 94 nm, was sehr nah an den Werten ist, die in der Expansion Microscopy mit dem Cep192-BioH6 und SpotH6 ermittelt wurden.

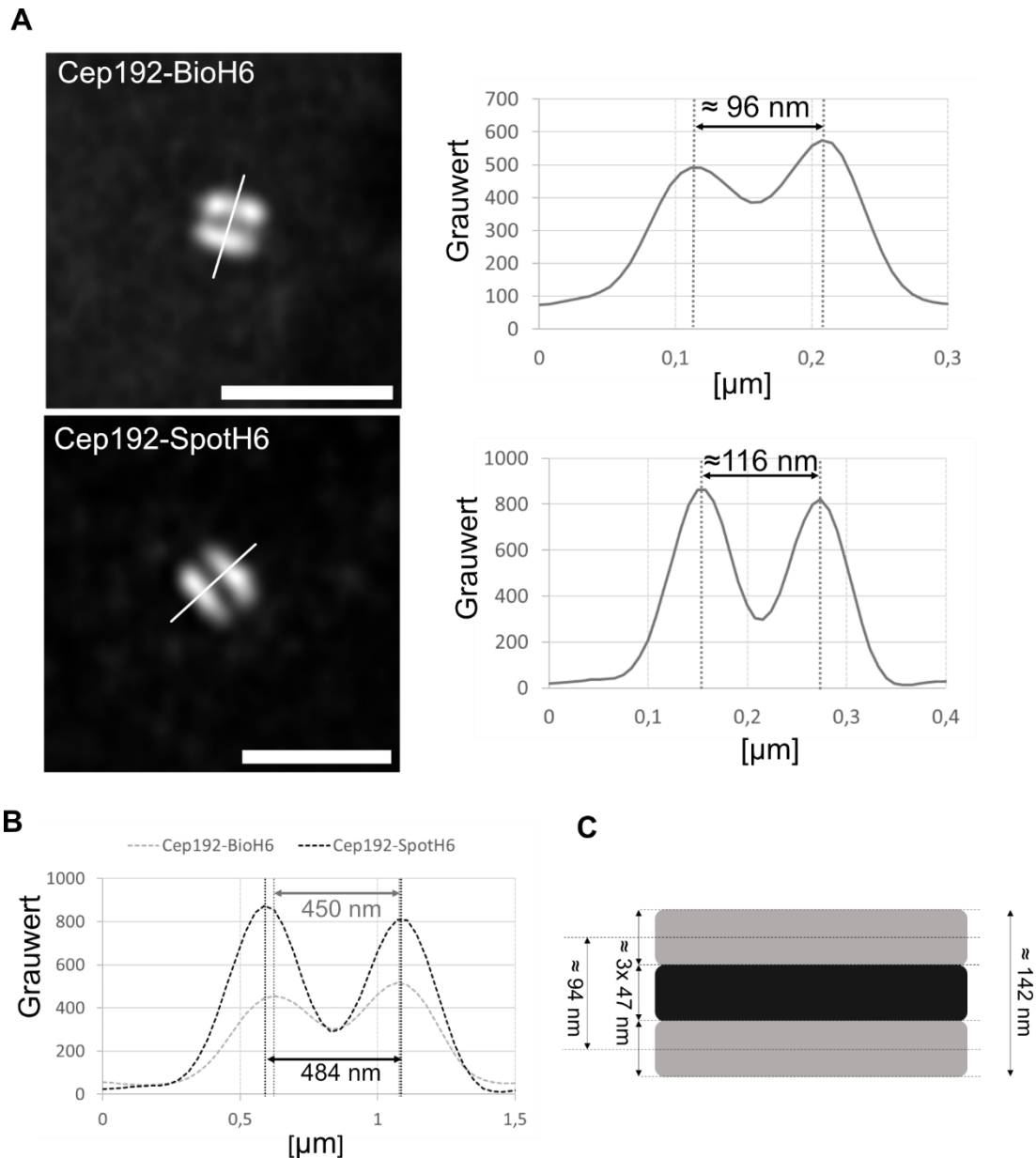


Abbildung 18: Cep192-SpotH6 und Cep192-BioH6 im Vergleich in der Expansion Microscopy. (A) Beispielhafte Auswertung der zweischichtigen Cep192-SpotH6-/Cep192-BioH6-Struktur entlang der eingezeichneten Linie und zugehörige Intensitätsverteilung mit gemessenem Peakabstand, Maximum Intensity-Projektion von AiryScan-prozessiertem Bild, Größenstandard = 500 nm (Expansionsfaktor-bereinigt). (B) Vergleich der Abstände der zuvor gezeigten Messungen der Fluoreszenzmaxima von Cep192-BioH6 und Cep192-SpotH6 ohne Berücksichtigung des Expansionsfaktors zeigt einen nur geringfügigen Unterschied, der erst durch den Expansionsfaktor verstärkt wird. (C) Schematische Darstellung der centrosomalen Core-Struktur zur Erklärung der erwarteten Abstände: Die Mitte der äußeren Core-Schichten läge bei einer Breite von 142 nm (eigene Messung in elektronenmikroskopischen Bildern) und unter der Bedingung, dass die einzelnen Schichten vergleichbar breit sind, 94 nm voneinander entfernt.

3.2.5 Cep192-BioH6 in der Ultrastructural Expansion Microscopy

Eine Untersuchung der möglichen Fixierungen ergab, dass der BioH6-Tag auch in einer schwachen Fixierung mit 1,4%Formaldehyd/2% Acrylamid, wie sie bei der Ultrastructural Expansion Microscopy zum Einsatz kommt, mit Streptavidin nachweisbar war. Die Methode ermöglicht eine Fluoreszenzmarkierung im Gel nach der ersten Expansion und wurde etabliert, da der gemessene Durchmesser von Centriolen in der klassischen Expansion Microscopy mit Antikörpern fast 100 nm größer als in der dSTORM-Mikroskopie ist (Gambarotto et al., 2019). Die Unterschiede waren bei Cep192-BioH6 und Cep192-SpotH6 im Vergleich zu elektronenmikroskopischen Aufnahmen nicht so groß, aber die Möglichkeit, eine

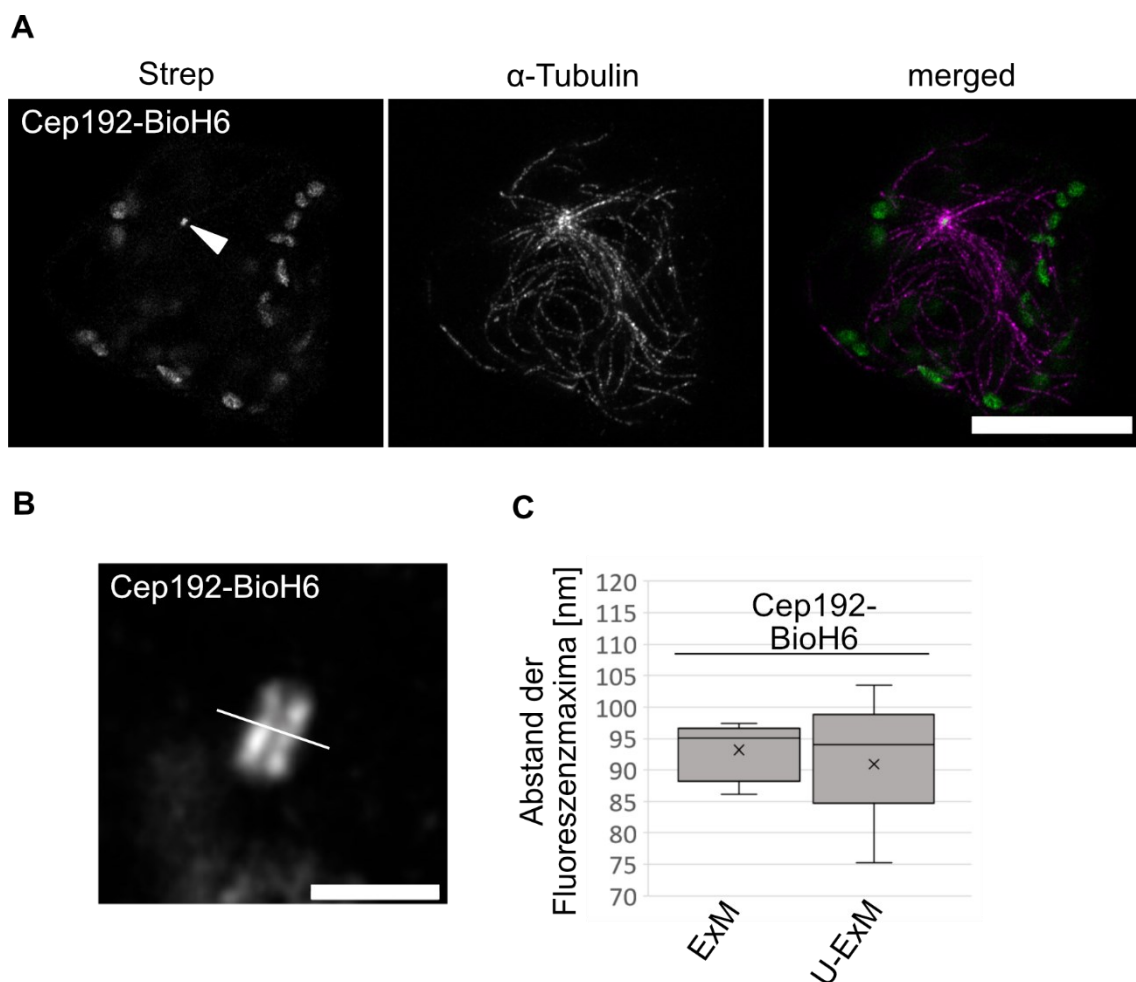


Abbildung 19: Vergleich von Cep192-BioH6 in Expansion Microscopy und Ultrastructural Expansion Microscopy. (A) Ultrastructural Expansion Microscopy von Cep192-BioH6 mit α -Tubulin-Färbung. Cep192-BioH6-Nachweis über Streptavidin-AlexaFluor-488, α -Tubulin-Färbung mit YL1/2/anti-rat-AlexaFluor-568. Größenstandard = 5 μ m (Expansionsfaktor-bereinigt). (B) Vergrößerte Darstellung einer repräsentativen Streptavidin-Färbung von Cep192-BioH6 in der U-ExM, deren Fluoreszenzintensität entlang der eingezeichneten Linie ausgewertet wurde. Größenstandard = 500 nm (Expansionsfaktor-bereinigt). (C) Abstand der ausgewerteten Fluoreszenzmaxima. Zur Erstellung der Boxplots wurden Abstandsmessungen der Fluoreszenzmaxima von n=6 (ExM) und n=9 (U-ExM) Bildern herangezogen. Es zeigten sich vergleichbare Ergebnisse.

andere Fixierung zu verwenden, war in Bezug auf die eher schlechte Strukturhaltung der Methanolfixierung sinnvoll (Hoetelmans et al., 2001).

Eine gemeinsame Färbung von Cep192-BioH6 mit α -Tubulin erlaubte die Lokalisation des centrosomspezifischen Streptavidin-Fluoreszenzsignals (Abbildung 19A, Pfeilspitze). Das Fusionsprotein Cep192-BioH6 zeigte auch hier zur Expansion Microscopy vergleichbare Ergebnisse, die sich auch in den gemessenen Abständen zwischen den zwei Fluoreszenzschichten widerspiegeln: In der Ultrastructural Expansion Microscopy (Abbildung 19B) betrug der mittlere Abstand $91 \text{ nm} \pm 9 \text{ nm}$ (Mittelwert \pm Standardabweichung, $n=9$) und war damit im selben Bereich wie die $93 \text{ nm} \pm 5 \text{ nm}$ (Mittelwert \pm Standardabweichung, $n=6$) in der Expansion Microscopy (Abbildung 19C).

3.2.6 Potenzielle Artefaktbildung in der Expansion Microscopy

Die Etablierung des SpotH6- und des BioH6-Tag an Cep192 ermöglichte den Vergleich einer direkten Fluoreszenzmarkierung über den V_{HH} und Streptavidin mit klassischer, antikörperbasierter Fluoreszenzmarkierung am Centrosom in der Expansion Microscopy.

Da die Kompaktheit der centrosomalen Core-Struktur potenziell zu Zugänglichkeitsproblemen führt, sollte das Phänomen für antikörperbasierte Färbungen mit Spot- V_{HH} /Streptavidin in der Expansion Microscopy verglichen werden. Die Zugänglichkeitsprobleme werden bereits durch die limitierte Auswahl an Fixierungsmethoden bei der Markierung der Core-Struktur in *D. discoideum* deutlich: eine Markierung mit Antikörpern funktioniert in der Regel nur mit der Methanolfixierung gut, andere Fixierungen hingegen scheinen die dichte Struktur zu gut zu erhalten beziehungsweise quervernetzen die Struktur so stark, dass die Antikörper nicht mehr an ihre Epitope binden können. Was dem Detektor aufgrund der Auflösungsgrenze bei herkömmlicher Mikroskopie und kleinen Strukturen verborgen bleibt, ist, ob diese tatsächlich komplett durchdrungen wird, oder der Antikörper lediglich den Teil der verfügbaren Antigene bindet, die er auch erreicht. Derartige Zugänglichkeitsprobleme könnten in der Expansion Microscopy zu Artefakten führen.

Anhand der in Abbildung 20 gezeigten Markierung des Core-Proteins CP91 mit konventionellen Antikörpern gemeinsam mit den mit V_{HH} /Streptavidin markierten Fusionsproteinen Cep192-SpotH6 beziehungsweise Cep192-BioH6 wurde diese

Problematik sichtbar: Vor der Expansion der Gelmatrix erschien antikörpermarkiertes CP91 als punktförmige Fluoreszenz, die mit Cep192-SpotH6 kolokalisierte (Abbildung 20A). Nach der Expansion traten zwei sehr unterschiedliche Strukturen für CP91 auf, die anhand der Cep192-spezifischen Färbung als Drauf- und Seitenansicht der Core-Struktur identifiziert werden konnten. In der Seitenansicht zeigte sich eine

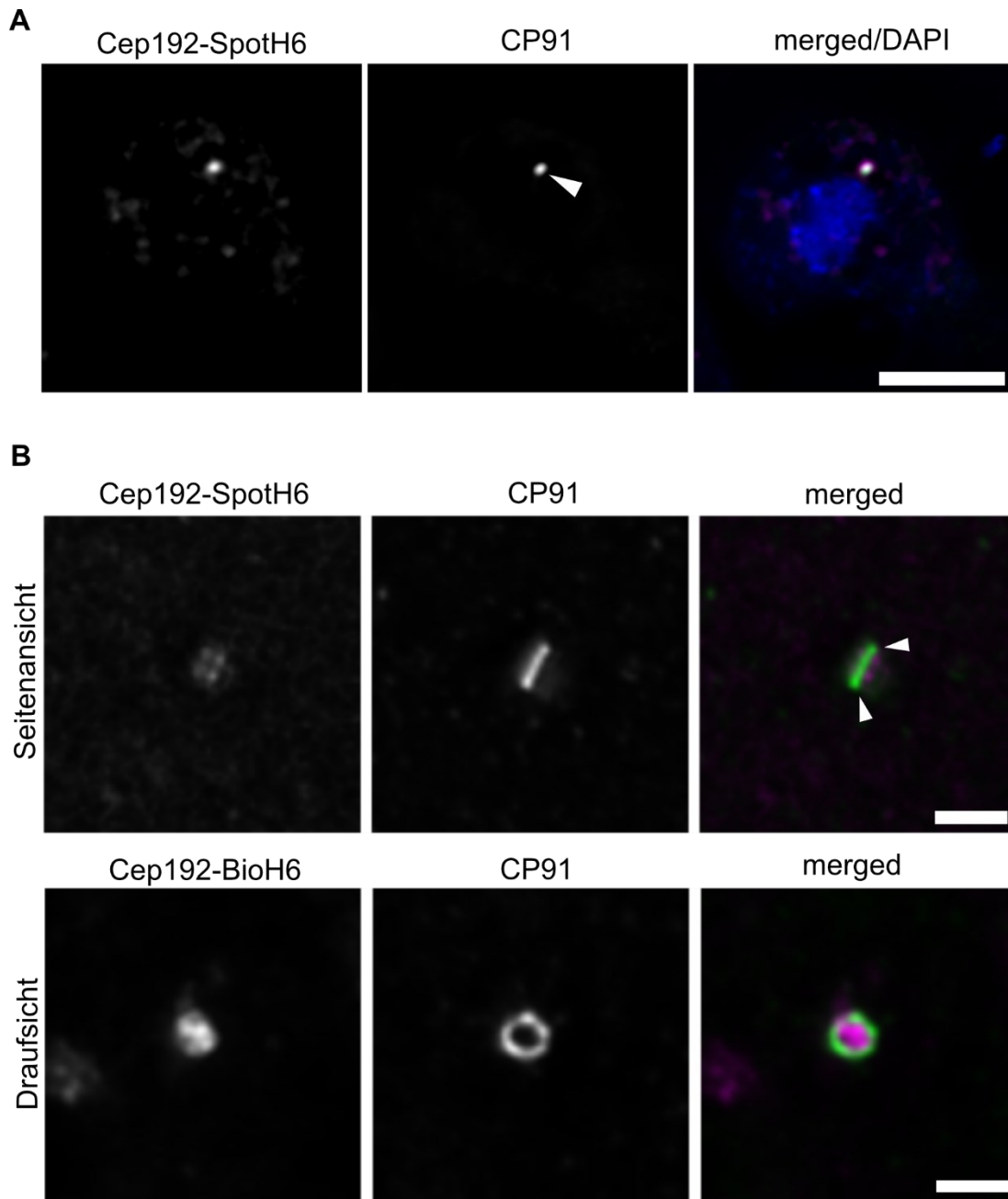


Abbildung 20: CP91-Antikörpermarkierung zeigt Anzeichen für Artefakte in der Expansion Microscopy. (A) Mit Antikörpern markiertes CP91 erscheint nicht expandiert wie Cep192-SpotH6 als punktförmige Fluoreszenz (Pfeilspitze). (B) Expandiert wird erkennbar, dass je nach Lage der Core-Struktur die CP91-Antikörper-Fluoreszenz über die Fluoreszenz des Spot-Tags hinausreicht (Pfeilspitzen, oberes Bild), oder eine ringförmige Struktur bildet, die von Cep192-BioH6 ausgefüllt wird. Färbung mit anti-CP91/anti-rabbit-AlexaFluor-488 und Spot-V_HH-Atto-594 (A, B oberes Bild) beziehungsweise Streptavidin-AlexaFluor-488 (B, unteres Bild), DNA mit DAPI. Gezeigt sind Maximum Intensity-Projektionen von dekonvolvierten Bildern. Scale Bar = 5 μ m (A) beziehungsweise 500 nm (B, Expansionsfaktor-bereinigt).

strichförmige und in der Draufsicht eine ringförmige Fluoreszenzmarkierung. Im Vergleich der Markierungen in der Draufsicht, ist klar erkennbar, dass die Cep192-BioH6-Fluoreszenz die antikörpergenerierte, ringförmige CP91-Fluoreszenz ausfüllt. Die strichförmige CP91-Fluoreszenz wiederum überragt die Ränder der zweilagigen Cep192-SpotH6-Fluoreszenz (Abbildung 20B, Pfeile).

Insbesondere die ringförmige Struktur muss als Hinweis darauf gesehen werden, dass es sich um eine Artefaktbildung handeln könnte. Eine solche Struktur wäre typisch, wenn ein Antikörper nur in den Randbereichen der gefärbten Struktur binden kann, obwohl es weitere Epitope im Innern gibt. Wird die angefärbte Struktur vor der Aufnahme expandiert und ist wie bei CP91 vorher aufgrund der Auflösungsgrenze nur als punktförmige Fluoreszenz detektierbar, wird der ungefärbte Bereich dann potenziell sichtbar. Auch die über die Cep192-SpotH6-Fluoreszenz hinausreichende CP91-Fluoreszenz passt zu dieser Erklärung, da der Antikörper dann nur Randbereiche bindet und dementsprechend an den Rändern der dreischichtigen Core-Struktur überstehen würde. Ein derartiger struktureller Unterschied zwischen den inneren und äußeren Schichten der Core-Struktur ist auch elektronenmikroskopisch nicht zu erkennen (vgl. Abbildung 10). Die Gefahr von Artefakten und die falsche Einschätzung der Größe der Struktur, wie in anderen Publikationen beobachtet (Gamberotto et al., 2019), ist bei konventionellen Antikörpern aufgrund ihrer Größe ungleich höher, deshalb ist ihr Einsatz bei sehr kleinen Strukturen, wie der Core-Struktur, in der klassischen Expansion Microscopy unvorteilhaft.

3.3 TOPOLOGIE DER CORE-STRUKTUR UND DER INNEREN CORONA

3.3.1 CP91-BioH6 und CP39-BioH6 lokalisieren zwischen Cep192-SpotH6

Die Verfügbarkeit von zwei Tags, die für Cep192-Fusionsproteine vergleichbare Ergebnisse zeigten und mit denen die beschriebenen Nachteile der Expansion Microscopy vermindert werden konnten, ermöglichte die Erstellung von Doppelmutanten, die Cep192-SpotH6 gemeinsam mit weiteren BioH6-getagten Proteinen exprimierten.

Aufgrund ihrer vermuteten Lage in der inneren Core-Schicht (Meyer et al., 2017; Putzler et al., 2016), wurden CP91- beziehungsweise CP39 ausgewählt: dazu wurde die Blasticidin-Resistenzkassette im Cep192-SpotH6-Stamm mittels Cre-LoxP-Systems entfernt (siehe Kapitel 5.2.13). Danach konnten CP39 und CP91 per Knock-in mit dem BioH6-Tag versehen werden.

Nach einer Methanolfixierung konnten beide Fusionsproteine mit fluorophor-konjugiertem Streptavidin beziehungsweise mit dem Spot-V_{HH} direkt markiert werden.

Abbildung 21A und Abbildung 22A zeigen deutlich, dass vor der Expansion die Fluoreszenzsignale für Cep192-SpotH6 und CP91- beziehungsweise CP39-BioH6 deutlich kolokalisieren und aufgrund der geringen Größe der angefärbten Struktur keine Substrukturen aufgelöst werden können. Abbildung 21B zeigt, dass durch die Expansion Microscopy eine Aufklärung dieser Substrukturen möglich wird: CP91 lokalisiert demnach in zwei Schichten in den Randbereichen der inneren Core-Struktur in räumlicher Nähe zu den äußeren Core-Schichten, die durch Cep192-SpotH6 repräsentiert sind. Die CP91-BioH6-Fluoreszenz geht im Gegensatz zur konventionellen Färbung mit CP91-Antikörper (Kapitel 3.2.6, Abbildung 20) auch nicht über die Ränder der Cep192-SpotH6-Fluoreszenz hinaus. Eine entsprechende Auswertung der Fluoreszenzintensität entlang der in Abbildung 21B eingezeichneten Linie ist in Abbildung 21C dargestellt. Die CP91-BioH6-Fluoreszenzmaxima des dargestellten Bildes wurden verwendet, um näherungsweise die maximale Auflösung der Expansion Microscopy zu berechnen. Der Abstand beträgt hier unter Einbeziehung des Expansionsfaktors ca. 69 nm und ist vergleichbar mit der publizierten Auflösung von 60 bis 70 nm (Gao et al., 2017).

Je nach Orientierung des Centrosoms relativ zur starren Z-Achse des Mikroskops, konnte auch eine Draufsicht auf das Centrosom aufgenommen werden. Cep192-SpotH6 und CP91-BioH6 erscheinen als runde, kolokalisierende Flächen (Abbildung 21E, Modell in Abbildung 21F). Auch hier ist, anders als für den CP91-Antikörper gezeigt wurde, keine ringförmige Struktur, sondern eine durchgehende, ausgefüllte Fluoreszenz für CP91-BioH6 zu erkennen.

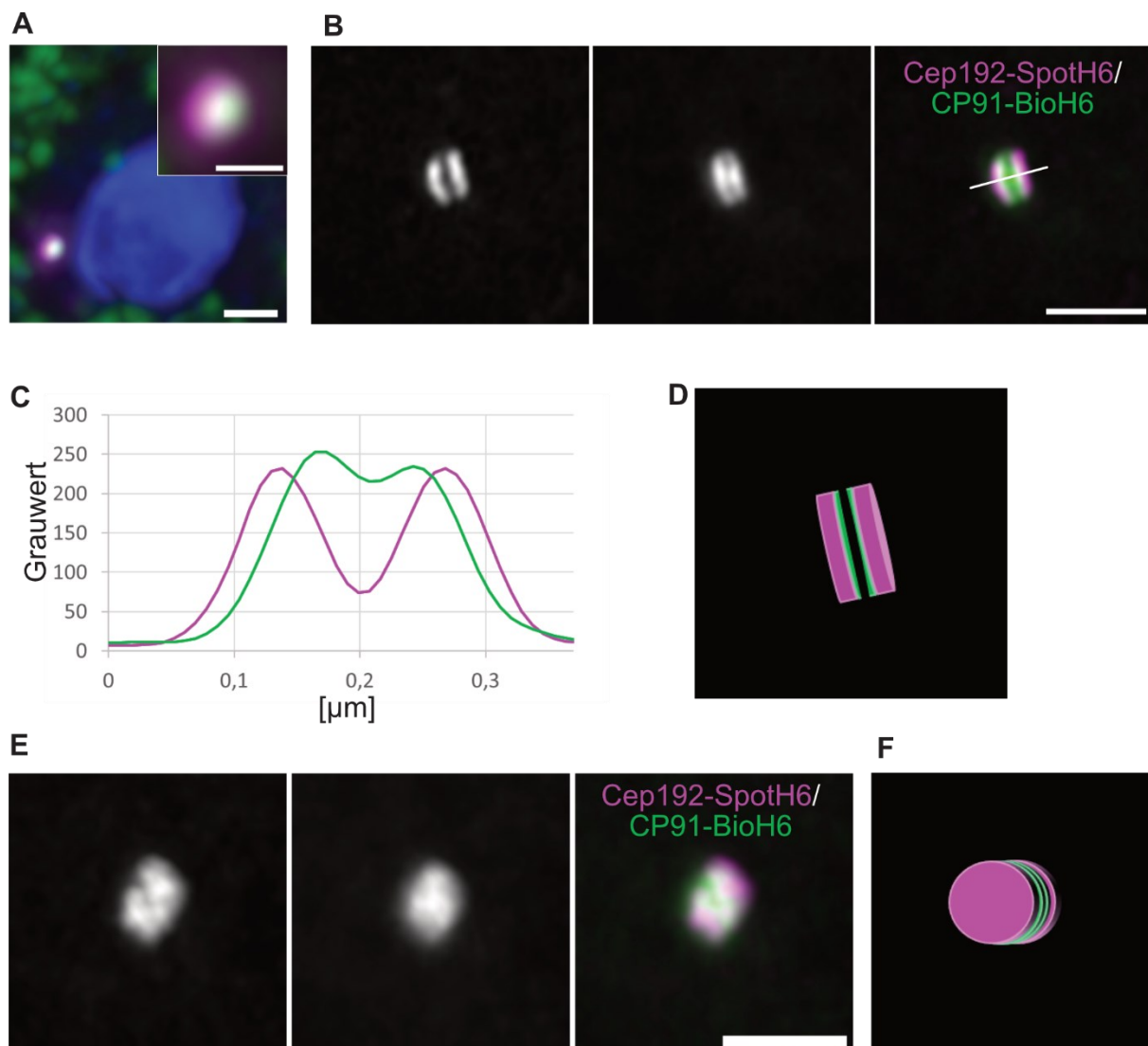


Abbildung 21: Cep192-SpotH6 und CP91-BioH6 in der Expansion Microscopy. (A) Nichtexpandiertes Fluoreszenzsignal von Cep192-SpotH6 und CP91-BioH6 zeigt eine Überlagerung beider Signale. (B) Nach der Expansion zeigt CP91-BioH6 in der seitlichen Lage zwei eng beieinander liegende Fluoreszenzschichten innerhalb der Cep192-SpotH6-Fluoreszenz. (C) Eine Messung der Fluoreszenzintensitäten entlang der eingezeichneten Linie ergibt die Intensitätsverteilung. (D) zeigt das zugehörige Modell der Lokalisation der beiden Proteine. (E) Außerdem konnten auch anders orientierte Centrosomen aufgenommen werden, in denen die beiden Fluoreszenzsignale rund erscheinen und sich deutlich überlagern. (F) zeigt das Modell und soll die im Vergleich zu (D) andere, angenommene Orientierung des Centrosoms zeigen. Markierung erfolgte mittels Streptavidin-AlexaFluor-488 und Spot-VH-Atto-594, DNA-Markierung mit Hoechst-33342. Größenstandard = 500 nm (B und E Expansionsfaktor-bereinigt).

Die Lokalisation von CP91-BioH6 im Grenzbereich der inneren Core-Schicht warf die Frage auf, ob das zur Markierung verwendete Streptavidin tatsächlich die Struktur durchdringt, oder ob es wie in Kapitel 3.2.6 gezeigt, doch zur Artefaktbildung während der Expansion kommt. Die in Abbildung 22B gezeigte Lokalisation von CP39-BioH6 in der inneren Core-Schicht ohne weitere Sublokalisierung und die entsprechende Fluoreszenzintensitäts-Verteilung (Abbildung 22C) lassen vermuten, dass Streptavidin durchaus in der Lage ist, die Core-Struktur komplett zu durchdringen. Die Draufsicht auf CP39-BioH6 sah der von CP91-BioH6 sehr ähnlich (Abbildung 22E, Modell in

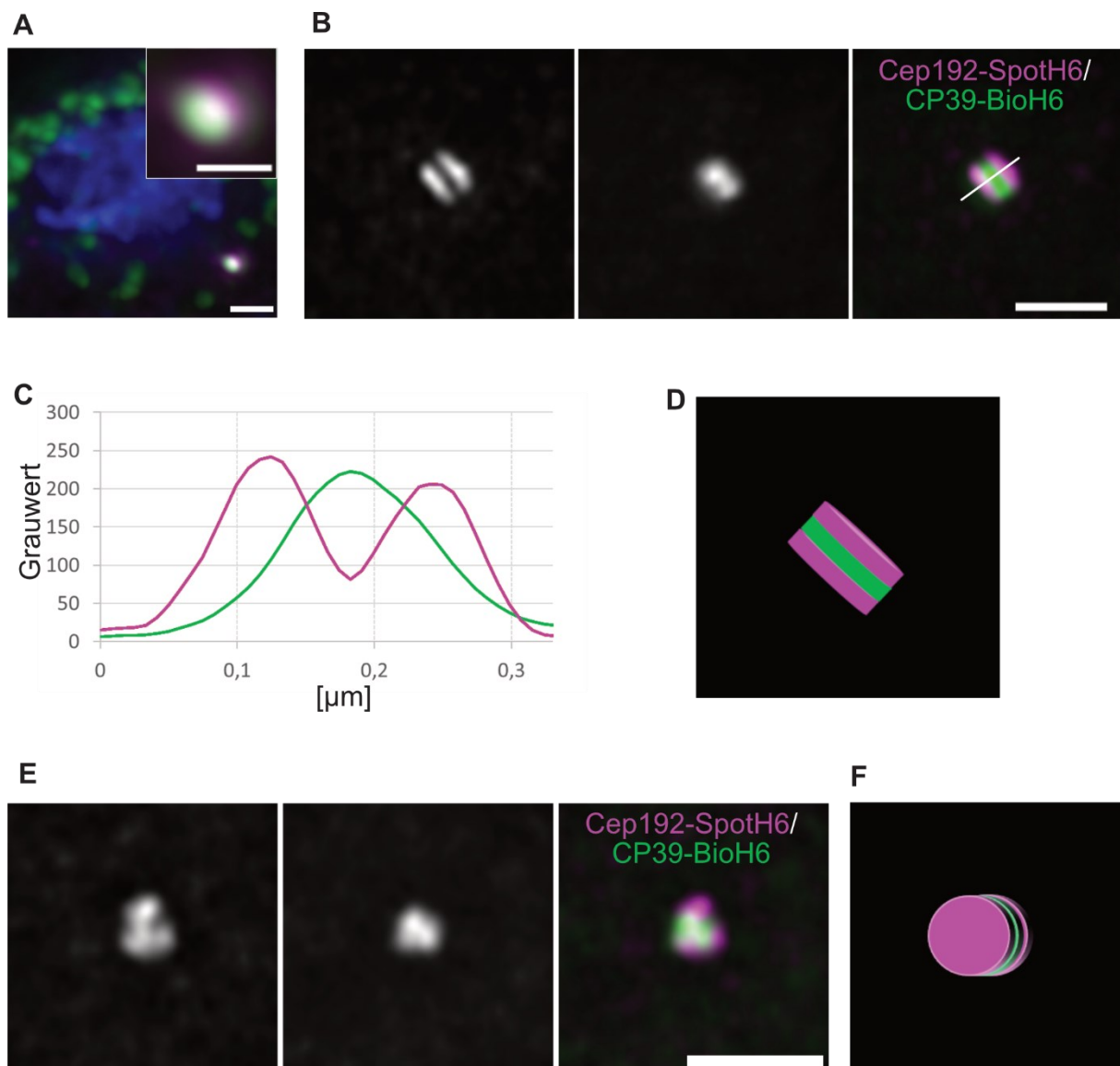


Abbildung 22: Cep192-SpotH6 und CP39-BioH6 in der Expansion Microscopy. (A) Nichtexpandiertes Fluoreszenzsignal von Cep192-SpotH6 und CP39-BioH6 zeigt eine Überlagerung beider Signale. (B) Nach der Expansion zeigt CP39-BioH6 in der seitlichen Lage eine Fluoreszenz zwischen der zweischichtigen Cep192-SpotH6-Fluoreszenz. (C) Eine Messung der Fluoreszenzintensitäten entlang der eingezeichneten Linie ergibt die Intensitätsverteilung. (D) zeigt das zugehörige Modell der Lokalisation der beiden Proteine. (E) Außerdem konnten auch anders orientierte Centrosomen aufgenommen werden, in denen die beiden Fluoreszenzsignale rund erscheinen und sich deutlich überlagern. (F) zeigt das Modell und soll die im Vergleich zu (D) andere, angenommene Orientierung zeigen. Markierung erfolgte mittels Streptavidin-AlexaFluor-488 und Spot-V_H-Atto-594, DNA-Markierung mit Hoechst-33342. Größenstandard = 500 nm (B und E Expansionsfaktor-bereinigt).

Abbildung 22F). Die axiale Auflösung ist auch mit dem verwendeten Airyscan-Detektor nicht hoch genug, um die expandierte Core-Struktur in der Draufsicht gut auflösen zu können (mit entsprechendem Fluorophor maximal 400 nm gemäß Herstellerangaben (Weißhart, 2014)).

Zusammengefasst lässt sich festhalten, dass die Proteine CP39-BioH6 und CP91-BioH6 eine unterscheidbare Lokalisation innerhalb der inneren Core-Struktur zeigen.

3.3.2 Die Lokalisation der Corona-Proteine CDK5RAP2 und CP148

Nachdem über Expansion Microscopy erfolgreich Proteine der äußeren und inneren Core-Schicht zugeordnet werden konnten, sollte als nächstes die Assoziation der Core-Struktur mit der Corona untersucht werden. Wie bereits erwähnt, ist CDK5RAP2 ein Protein der Corona, das gemeinsam mit Cep192 am mitotischen Centrosom lokalisiert. Es wurde ein CDK5RAP2-BioH6-Konstrukt erstellt und in den Cep192-SpotH6-Stamm transformiert. Abbildung 23A zeigt die starke Überlagerung der Fluoreszenzsignale in nicht expandierten Zellen. In der Expansion Microscopy wurde dann die räumliche Lage zueinander genauer untersucht. Die CDK5RAP2-BioH6-Fluoreszenz ist in etwa genauso breit wie die beiden Fluoreszenzschichten von Cep192-SpotH6 (Abbildung 23B/C). Im lateralen Bereich der Core-Struktur ragt das CDK5RAP2-BioH6-Fusionsprotein aber deutlich über Cep192-SpotH6 hinaus und umschließt es ringförmig (Abbildung 23D zeigt ein Modell).

CP148 ist ein weiteres Corona-Protein, das für die Assoziation der Corona mit dem Core wichtig ist. Der CP148-Knockdown zeichnet sich durch centrosomale Core-Strukturen ohne erkennbare Corona aus (Kuhnert et al., 2012b). Es wurde ein CP148-BioH6-Knock-in-Plasmid generiert und wieder in Cep192-SpotH6 exprimierende Zellen transformiert. In den nicht expandierten Zellen war eine Lokalisation des Cep192-SpotH6 innerhalb der CP148-BioH6-Fluoreszenz zu erkennen (Abbildung 23E). Expandierte Centrosomen zeigten eine die Core-Struktur umschließende CP148-BioH6-Fluoreszenz (Abbildung 23F), die wenn man sie mit der CDK5RAP2-BioH6-Lokalisation vergleicht, jedoch weniger mit den durch Cep192-SpotH6 repräsentierten äußeren Schichten überlagert ist. Vielmehr liegen die Fluoreszenzmaxima von Cep192-SpotH6 hier im Vergleich zu CDK5RAP2-BioH6 deutlich innerhalb der Fluoreszenzmaxima von CP148-BioH6 (Abbildung 23C/G). Daraus ergibt sich ein Modell für die Lokalisation von CP148, wie es Abbildung 23H zeigt.

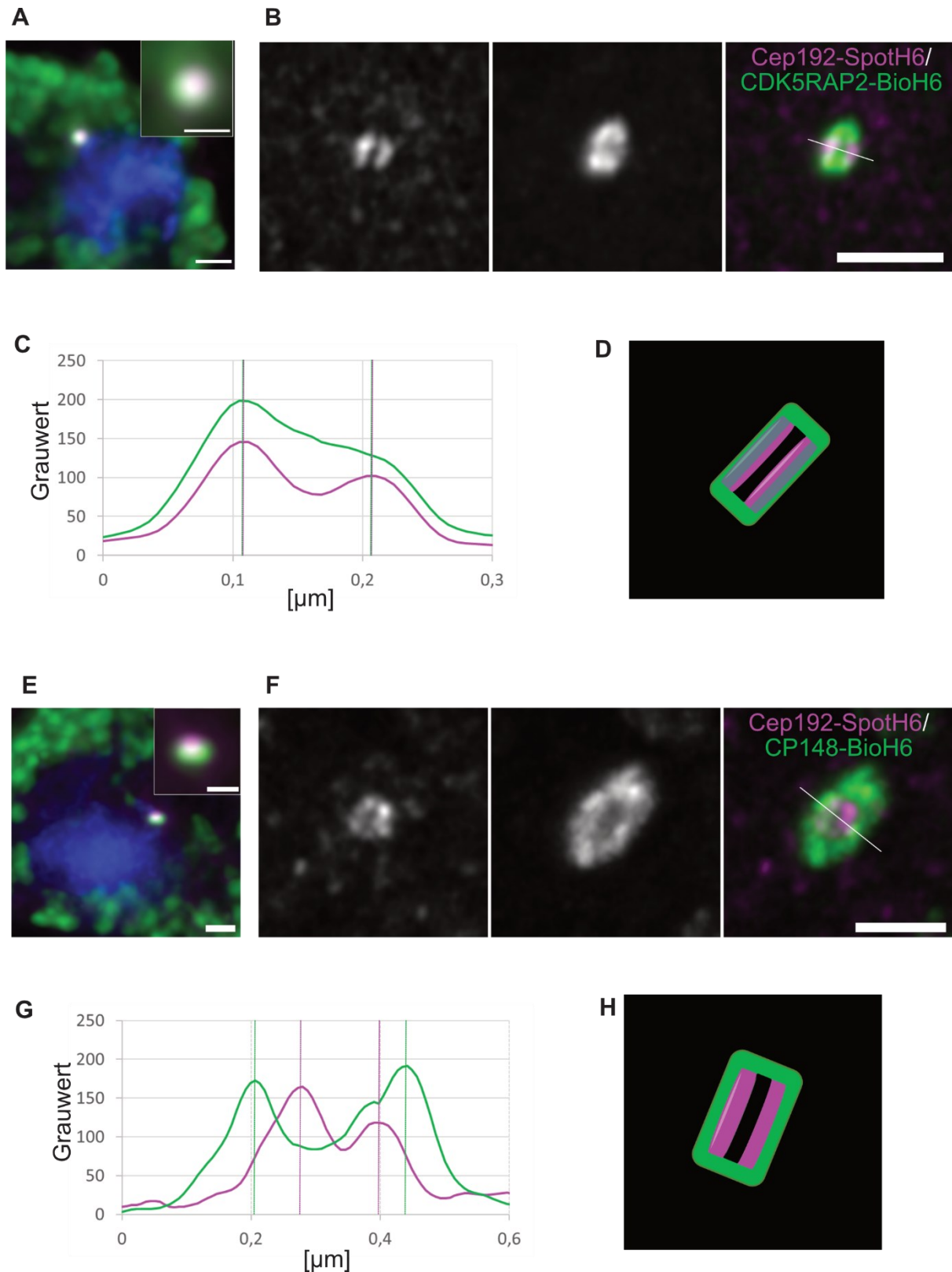


Abbildung 23: Cep192-SpotH6 und CDK5RAP2- beziehungsweise CP148-BioH6 in der Expansion Microscopy. (A) Nichtexpandiertes Fluoreszenzsignal von Cep192-SpotH6 und CDK5RAP2-BioH6 zeigt eine Überlagerung beider Signale. (B) Nach der Expansion zeigt CDK5RAP2-BioH6 in der seitlichen Lage eine ähnlich breite Fluoreszenz wie Cep192-SpotH6, die an den Rändern aber deutlich darüber hinaus reicht. (C) Eine Messung der Fluoreszenzintensitäten entlang der eingezeichneten Linie ergibt eine überlappende Intensitätsverteilung. (D) zeigt das dazugehörige Modell der Lokalisation mit dem Umschließen der Cep192-SpotH6-Fluoreszenz und dem Überstehen an den Seiten. (E-H) zeigt nach demselben Schema wie (A-D) die Untersuchung von CP148-BioH6 und Cep192-SpotH6. Markierung erfolgte mittels Streptavidin-AlexaFluor-488 und Spot-V_HH-Atto-594, DNA-Markierung mit Hoechst-33342. Größenstandard = 500 nm (B und F Expansionsfaktor-bereinigt).

3.3.3 Die Lokalisation der Proteine CDK5RAP2, CP148 und CP224 innerhalb der Corona

Neben der Lokalisation der zuvor untersuchten Corona-Proteine relativ zu Cep192-SpotH6, wurde eine Lokalisationsuntersuchung der Corona-Proteine untereinander angestrebt. Als Referenzprotein diente hier, trotz der zuvor besprochenen Nachteile, das mit herkömmlichen Antikörpern markierte CP224. Mit CP224 wurde die Lokalisation von CP148- und CDK5RAP2-BioH6 verglichen. Nicht expandierte Centrosomen zeigen bereits eine deutliche Lokalisation von CDK5RAP2- und CP148-BioH6 innerhalb der CP224-Markierung (Abbildung 24A/E).

CDK5RAP2-BioH6 zeigt expandiert sehr deutlich eine Lokalisation innerhalb der CP224-Markierung (Abbildung 24B). Diese Unterschiede in der Lokalisation wurden bereits beschrieben (Pitzen et al., 2018), zeigten sich in der Expansion Microscopy nun deutlich und führen zu einem Modell, in dem CDK5RAP2 eine ähnliche Ausdehnung in der Breite hat wie Cep192 (vgl. Abbildung 23) und von CP224 umschlossen wird. Die im Modell in grau dargestellte Core-Struktur stellt die vermutete Lage der Core-Struktur dar und wurde nicht tatsächlich markiert (Abbildung 24D).

CP148-BioH6 zeigte in der Expansion Microscopy wie CDK5RAP2-BioH6 eine von CP224 unterscheidbare Lokalisation weiter innen innerhalb der Corona (Abbildung 24F). Beim Vergleich der beiden Fluoreszenzintensitätsplots (Abbildung 24C/G) wird deutlich, dass die CP148-BioH6-Fluoreszenz näher an die CP224-Markierung heranreicht (Modell Abbildung 24H), als die CDK5RAP2-BioH6-Fluoreszenz. Das passt gut zu den in Kapitel 3.3.2 durchgeführten Lokalisationsuntersuchungen mit Cep192-SpotH6, wo CP148-BioH6 breiter um die äußeren Core-Schichten lokalisierte und somit relativ zu CDK5RAP2-BioH6 näher an CP224 heranreichen sollte.

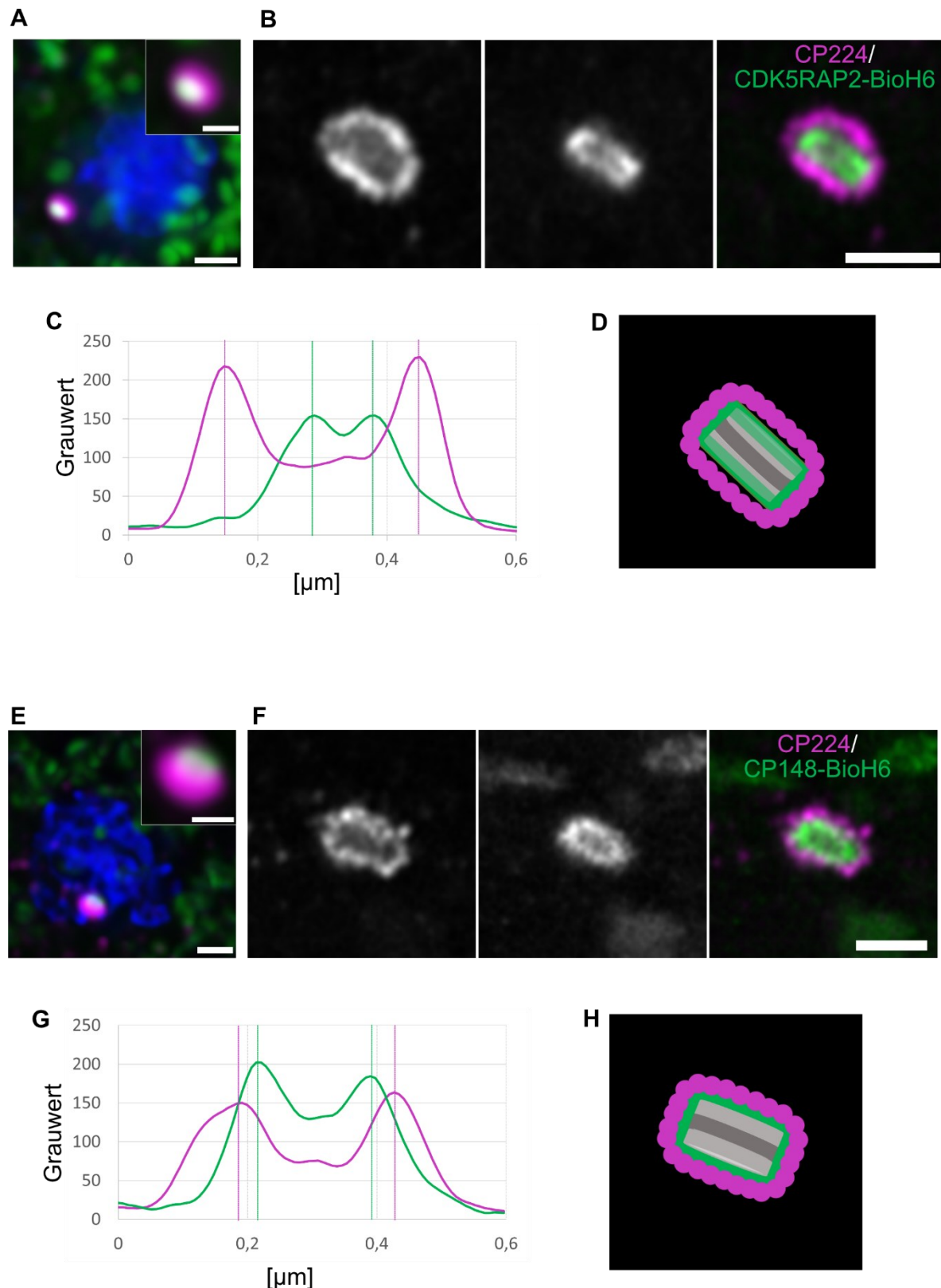


Abbildung 24: CP224 und CDK5RAP2- beziehungsweise CP148-BioH6 in der Expansion Microscopy. (A) Nichtexpandiertes Fluoreszenzsignal von CP224 und CDK5RAP2-BioH6 zeigt bereits eine unterscheidbare Lokalisation von CDK5RAP2-BioH6 innerhalb von CP224. (B) Nach der Expansion zeigt CDK5RAP2-BioH6 in der seitlichen Lage eine deutlich innerhalb von CP224 liegende Lokalisation. (C) Eine Messung der Fluoreszenzintensitäten entlang der eingezeichneten Linie ergibt die jeweilige Intensitätsverteilung. (D) zeigt das dazugehörige Modell der Lokalisation, in grau ist die vermutete Core-Struktur-Position eingezeichnet. (E-H) zeigt nach demselben Schema wie (A-D) die Untersuchung von CP148-BioH6 und CP224. Markierung erfolgte mittels Streptavidin-AlexaFluor-488 und anti-CP224/anti-mouse-AlexaFluor-568, DNA-Markierung mit Hoechst-33342. Größenstandard = 500 nm (B und F Expansionsfaktor-bereinigt).

3.4 IDENTIFIKATION MÖGLICHER INTERAKTIONSPARTNER AM CENTROSOM

3.4.1 Die Etablierung des BioID2-Systems

Das BioID/BioID2-System bietet eine Methode zur Identifizierung von möglichen Protein-Protein-Interaktionen durch die Biotinylierung von benachbarten Proteinen von einem mit der BioID/BioID2 fusionierten Protein (vgl. Kapitel 2.4). Batsios et al. schlagen zwei Kontrollen für die BioID vor: Einen Stamm, der die BioID ohne fusioniertes Protein exprimiert und die Inkubation der Fusionsprotein-Stämme ohne Biotin, um die Induzierbarkeit der BioID zu zeigen (Batsios et al., 2016).

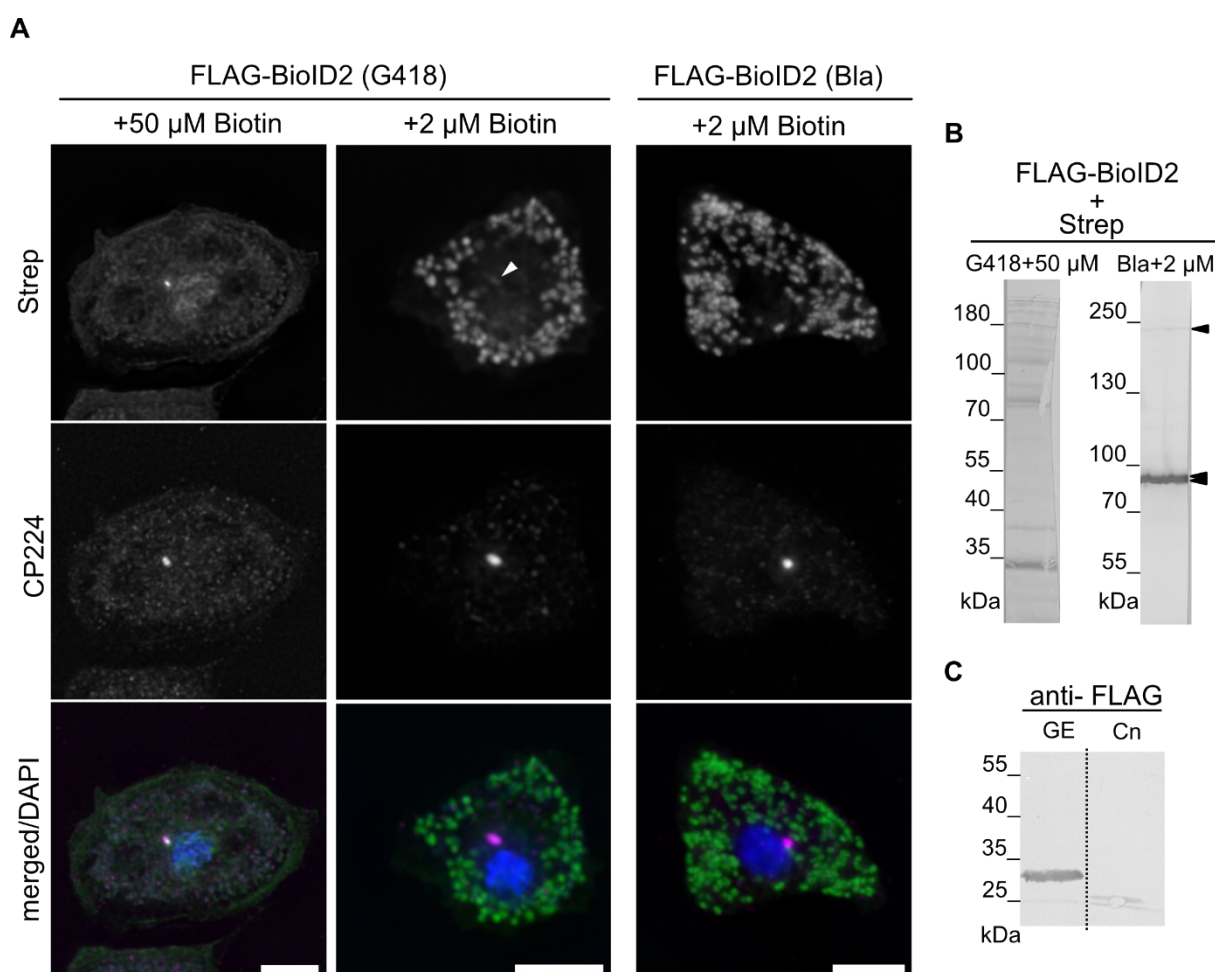


Abbildung 25: Einfluss der Expressionsstärke der FLAG-BioID2 und der Biotinkonzentration auf das Biotinylierungsverhalten. (A) In der starken Überexpression (G418) tritt in der Immunfluoreszenz eine deutlich zu erkennende Biotinylierung am Centrosom auf, die bei einer Reduzierung der Biotinkonzentration auf 2 μ M abnimmt (Pfeilspitze). Diese Konzentration zeigt in der schwächeren Expression (Bla) keine Biotinylierung mehr am Centrosom. Fluoreszenzmarkierung mit anti-CP224/anti-mouse-AlexaFluor-568 und Streptavidin-AlexaFluor-488, DNA mit DAPI im überlagerten Bild. Größenstandard = 5 μ m (B) Das Biotinylierungsmuster im Western Blot mit 50 μ M Biotin und starker Überexpression zeigt einige Banden in einer Centrosomen-Präparation, die mit verringerter Biotin-Konzentration und schwächerer Überexpression nicht mehr auftreten. Dort sind lediglich die endogen biotinylierten Carboxylasen nachweisbar (Pfeilspitzen). Markierung mit Streptavidin-AP, 8% SDS-Gele. (C) In Gesamtextrakten (GE) von FLAG-BioID2 (G418) exprimierenden Zellen lässt sich das BioID2-Protein nachweisen, in entsprechenden Centrosomen-Präparationen (Cn) nicht. Markierung mit anti-FLAG/anti-mouse-AP-Antikörper, 10% SDS-Gel. Entwickelt mit NBT/BCIP. „PageRuler prestained plus“- bzw. „PageRuler prestained“ Protein-Größenstandard.

Für die BioID2 aus *Aquifex aeolicus* lag zu Beginn der Arbeit bereits eine für *Dictyostelium* codonoptimierte DNA-Sequenz vor. Als Kontrolle wurde ein Überexpressionskonstrukt erstellt und transformiert, welches aus der BioID2 sowie einem N-terminal fusionierten FLAG-Tag bestand und unter dem *actin6*-Promotor stark überexprimiert wird. Die FLAG-BioID2 exprimierenden Zellen wurden 3-4 Tage mit der für die BioID üblichen Konzentration von 50 μ M Biotin inkubiert. Zur weiteren Untersuchung wurden die Zellen fixiert, mit CP224 das Centrosom markiert und mit Streptavidin die Biotinylierung sichtbar gemacht. Es zeigte sich eine starke Biotinylierung in der gesamten Zelle und auch am Centrosom. Der vom Streptavidin erzeugte, vermutlich durch unspezifische Biotinylierung entstandene Hintergrund war dabei so stark, dass die übliche mitochondriale Markierung kaum noch erkennbar ist (Abbildung 25A, linkes Bild). Ein Western Blot einer centrosomalen Präparation zeigte eine Reihe an biotinylierten Proteinen und bestätigte das vorangegangene Ergebnis (Abbildung 25B, linker Blot). Um auszuschließen, dass die BioID2 unspezifisch am Centrosom lokalisiert, wurden Zellextrakte mit aufgereinigten Centrosomen der FLAG-BioID2 exprimierenden Zellen im Western Blot verglichen: Der anti-FLAG-Antikörper zeigt eine deutliche, der BioID2 entsprechende Bande bei ca. 30 kDa im Gesamtextrakt, die an der centrosomalen Präparation nicht nachweisbar ist. Eine unspezifische Lokalisation der BioID2 am Centrosom schien nicht vorzuliegen. Dazu passte auch, dass durch die Reduzierung der Biotinkonzentration auf 2 μ M, die Biotinylierung in den Zellen in der Immunfluoreszenz nur noch schwach am Centrosom auftritt und auch die charakteristische Färbung der Mitochondrien wieder besser zu erkennen ist (Abbildung 25A, mittleres Bild). Die hohe Biotinylierungseffizienz der BioID2 auch bei niedrigeren Biotin-Konzentrationen ist in anderen Systemen bereits nachgewiesen und evaluiert (Kim et al., 2016).

Um eine brauchbare Kontrolle zu erhalten, wurde das Konstrukt in einen Vektor umklont, der eine Blastocidin S- statt einer G418-Resistenzkassette kodiert. Das reduziert die Expressionshöhe der FLAG-BioID2, da im Gegensatz zur G418-Selektion nicht auf Mehrfach- sondern nur auf Einfachinsertion selektiert wird (Pang et al., 1999). Zusätzlich wurde mit der reduzierten Biotinkonzentration von 2 μ M gearbeitet. Die so behandelten Zellen zeigten keine unspezifische Biotinylierung mehr am Centrosom in der Immunfluoreszenz (Abbildung 25A, rechtes Bild). Auch im Western Blot einer Centrosomen-Präparation waren nur noch die auch im Wildtyp vorhandenen drei

endogen biotinylierten Carboxylasen in *D. discoideum* nachweisbar, die mit präpariert werden (Abbildung 25B, rechter Blot).

Es wird deutlich, wieso aufgrund der Funktionsweise der BioID2, der gewollt unspezifischen Biotinylierung benachbarter Proteine, die Expressionshöhe und die Biotinkonzentration kritische Parameter in Bezug auf die Detektion falsch-positiver Ergebnisse sein können. Da in dieser Arbeit die Fusionsproteine mit der Knock-in-Strategie erzeugt wurden, ist das Expressionslevel durch den jeweiligen endogenen Promotor bestimmt. Als Folge der Kontrollversuche wurde eine Biotin-Arbeitskonzentration von 2 μM für die BioID2-Fusionsproteine festgelegt.

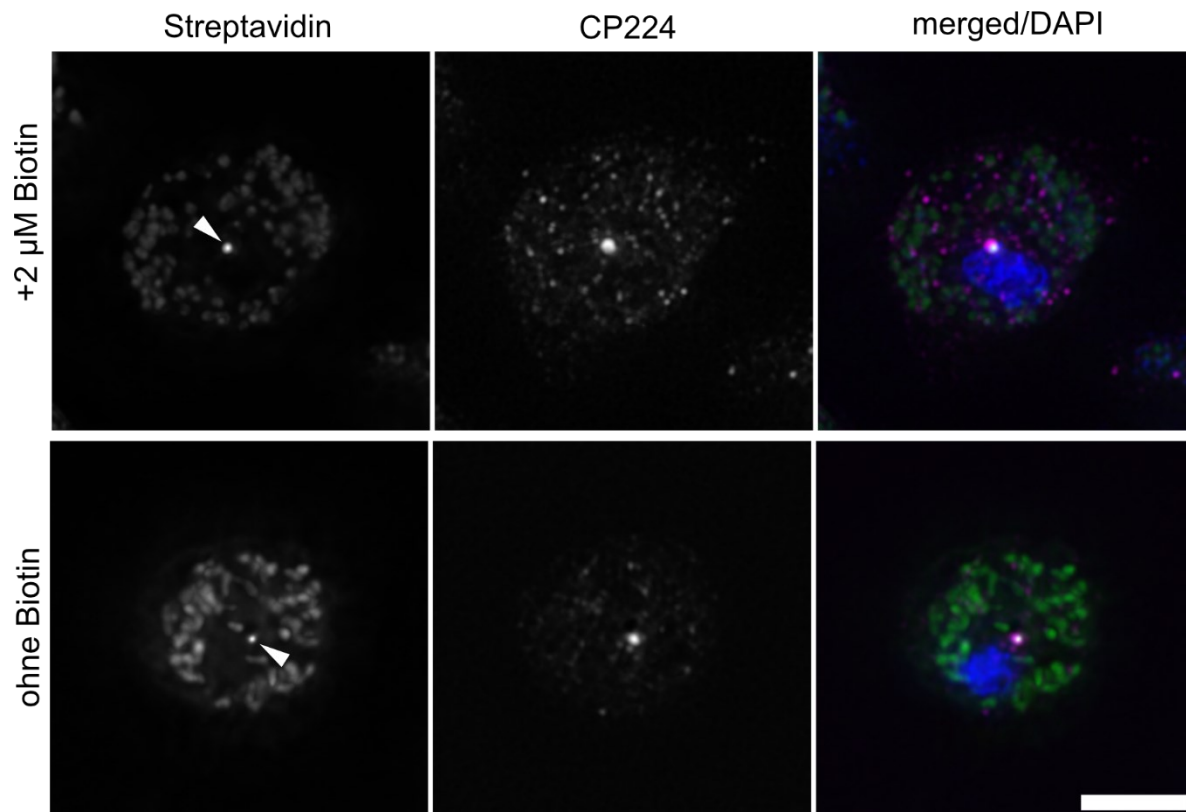


Abbildung 26: Cep192-BioID2-Validierung in der Immunfluoreszenz. Die erfolgreiche Transformation des Cep192-BioID2-Konstrukts wurde über eine Biotinylierung am Centrosom festgestellt. Das Centrosom ist mit CP224 markiert, es zeigt sich eine klare Biotinylierung am Centrosom in der Streptavidin-Fluoreszenz, die sogar ohne zugesetztes Biotin identifizierbar ist (Pfeilspitzen). Markierung mit anti-CP224/anti-mouse-AlexaFluor-568 und Streptavidin-AlexaFluor-488. DNA-Färbung mit DAPI im überlagerten Bild. Größenstandard = 5 μm .

Am Beispiel von Cep192-BioID2 ist in Abbildung 26 die Identifizierung einer erfolgreichen Transformation der BioID2 in der Immunfluoreszenz gezeigt. Im Vergleich zur BioID (BirA* aus *E. coli*) wurde deutlich, dass es zu einer basalen Biotinylierung am Centrosom kommt (Pfeilspitzen), die nicht in AX2-Zellen auftritt. Auch diese basale Biotinylierung ist in anderen Systemen beschrieben (Kim et al., 2016). Das im Medium beziehungsweise in den Zellen endogen verfügbare Biotin

reicht der BioID2 bereits für eine Biotinylierung am Centrosom. Insofern entfällt für die BioID2 die Möglichkeit, als weitere Kontrolle die Induzierbarkeit der Ligase zu zeigen.

3.4.2 Das Biotinylierungsverhalten der Core-Proteine CP39- und CP91-BioID2

Ergänzend zur Untersuchung der Core-Struktur in der Expansion Microscopy wurden entsprechende Knock-in-Plasmide für die Core-Proteine mit der BioID2 erstellt und transformiert. Die so erhaltenen Klone mit C-terminal getagtem Fusionsprotein wurden in eine Schüttelkultur überführt, mit 2 μM Biotin versetzt und anschließend eine Centrosomen-Präparation durchgeführt. Im folgenden Western Blot erfolgte der Nachweis der biotinylierten Proteine am Centrosom mit an alkalische Phosphatase gekoppeltem Streptavidin. Die Identifizierung der auftretenden Banden wurde mit spezifischen Antikörpern gegen centrosomale Proteine durchgeführt: Die mit der Centrosomen-Präparation beladene Blotmembran wurde dazu in Streifen geschnitten, mit Streptavidin-AP das Biotinylierungsmuster sichtbar gemacht und der benachbarte Streifen mit dem spezifischen Antikörper behandelt. Die Streifen wurden zur Auswertung wieder zusammengefügt und eingescannt.

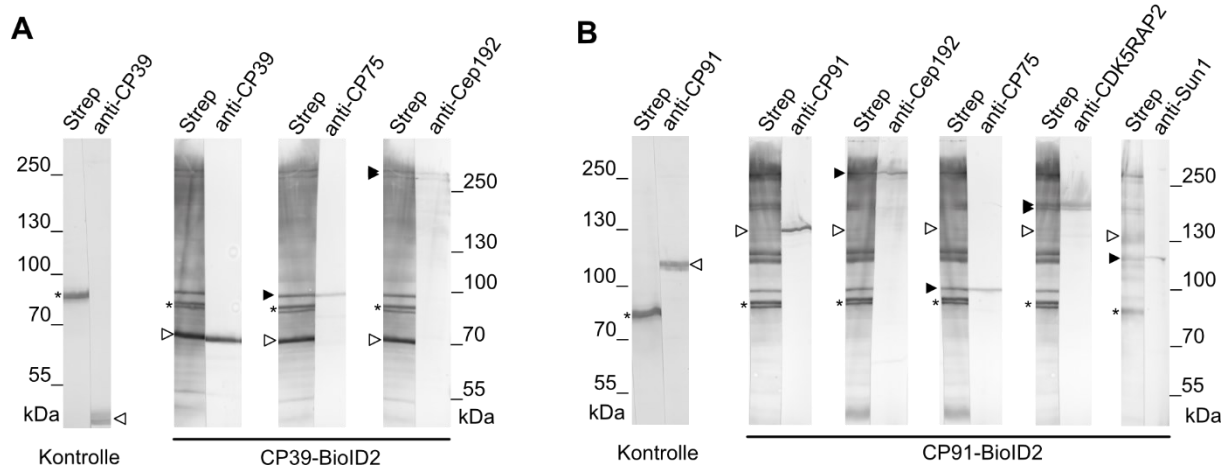


Abbildung 27: Biotinylierungsverhalten von CP39- und CP91-BioID2. (A) CP39-BioID2 biotinyliert CP75 und Cep192 (gefüllte Pfeilspitze) und sich selbst (leere Pfeilspitze). (B) CP91-BioID2 biotinyliert Cep192, CP75, CDK5RAP2 und biotinyliert ein Protein auf Höhe von Sun1 (gefüllte Pfeilspitze). Die Selbstbiotinylierung ist bei CP91-BioID2 eher schwach ausgeprägt (leere Pfeilspitze). Die Kontrollen zeigen einen FLAG-BioID2-Stamm, der mit der identischen Menge Biotin kultiviert wurde und nur die bekannten, immer biotinylierten Proteine aufweist (*). Außerdem ist der Größenunterschied zwischen endogenem Protein in der Kontrolle und Fusionsprotein durch den BioID2-Tag zu erkennen. Primäre Antikörper: aufgereinigte Kaninchen-Seren mit anti-CP39-, anti-CP75-, anti-Cep192-, anti-CP91-, anti-CDK5RAP2- oder anti-Sun1-Antikörper, sekundärer Antikörper: anti-rabbit-AP-Antikörper. Entwickelt mit NBT/BCIP. 8%-SDS-PAGE-Gel mit „PageRuler prestained plus“-Größenstandard.

Durch CP39-BioID2 wurden das Fusionsprotein selbst, CP75 und Cep192 biotinyliert. Gut zu identifizieren ist auch die Größenverschiebung des Fusionsproteins im Vergleich zum endogenen Protein in der FLAG-BioID2-Kontrolle (Abbildung 27A).

Durch CP91-BioID2 wurden Cep192 und CP75 als centrosomale Core-Proteine und CDK5RAP2 aus der Corona biotinyliert. CP91-BioID2 biotinylierte sich nur sehr schwach selbst, gleichzeitig sind im Bereich, wo das endogene CP91 in der Kontrolle läuft zwei stark biotinylierte, bisher nicht identifizierte Proteine identifizierbar. Das obere zeigt ein ähnliches Laufverhalten wie das Sun1-Protein, dass in der Zellkernmembran an der Assoziation des Centrosoms beteiligt ist (Abbildung 27B).

3.4.3 Biotinylierungsverhalten von Cep192-, CDK5RAP2- und CP224-BioID2

Die Proteine Cep192 und CDK5RAP2 zeigten in der hochauflösenden Fluoreszenzmikroskopie eine nahe Assoziation und sind zudem beide am mitotischen Centrosom nachweisbar. Cep192-BioID2 biotinylierte CDK5RAP2 und zeigt zudem eine breitere Bande im Biotinylierungsmuster in der Größe von CP91 (Abbildung 28A), mit einer eindeutigen Färbung unterhalb von CP91, die den beiden Proteinen im CP91-BioID2-Biotinylierungsmuster entsprechen könnte, deren Identität nicht aufgeklärt werden konnte. Umgekehrt biotinylierte CDK5RAP2-BioID2 Cep192 und sich selbst (Abbildung 28B).

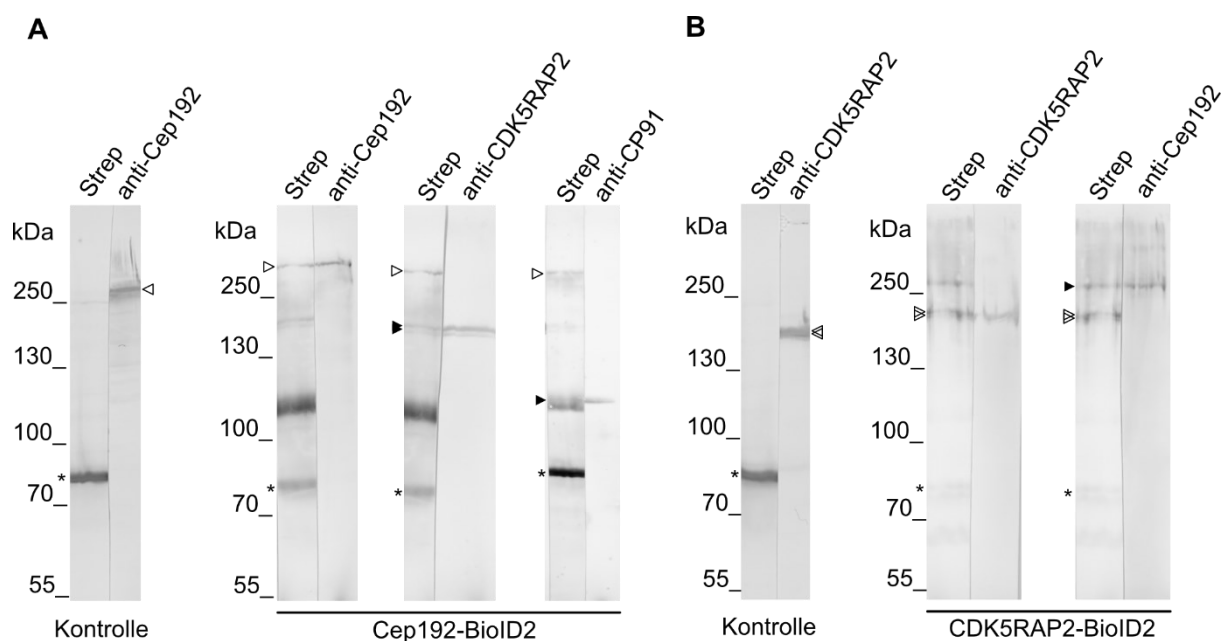


Abbildung 28: Biotinylierungsverhalten von Cep192- und CDK5RAP2-BioID2. (A) Cep192-BioID2 biotinyliert CDK5RAP2, sowie eine breitere Protein-Bande, in der sich CP91 befindet (gefüllte Pfeilspitzen) und sich selbst (offene Pfeilspitzen). (B) CDK5RAP2-BioID2 biotinyliert nur Cep192 (gefüllte Pfeilspitze) und sich selbst (offene Pfeilspitzen). Die Kontrollen zeigen einen FLAG-BioID2-Stamm, der mit der identischen Menge Biotin kultiviert wurde und nur die bekannten, immer biotinylierten Proteine aufweist (*). Zudem ist der Größenunterschied zwischen endogenem Protein und Fusionsprotein durch den BioID2-Tag zu erkennen. Primäre Antikörper: aufgereinigte Kaninchen-Seren mit anti-Cep192-, anti-CP91-, oder anti-CDK5RAP2-Antikörper, sekundärer Antikörper: anti-rabbit-AP-Antikörper. Entwickelt mit NBT/BCIP. 8%-SDS-PAGE-Gel mit „PageRuler prestained plus“-Protein-Größenstandard.

CP224-BioID2 biotinylierte deutlich CDK5RAP2. Ein anderes bereits bekanntes interagierendes Protein von CP224, TACC (Samereier et al., 2011), konnte im CP224-BioID2-Stamm nicht nachgewiesen werden und läuft im Western Blot knapp über CP224-BioID2 (Abbildung 29). Die zweite, schwache Bande in der TACC-Antikörperfärbung (markiert mit #), die auch im Streptavidin-Muster sichtbar ist, tritt auch als zusätzliche Bande in einer CP248-Färbung auf und kann nicht sicher zugeordnet werden.

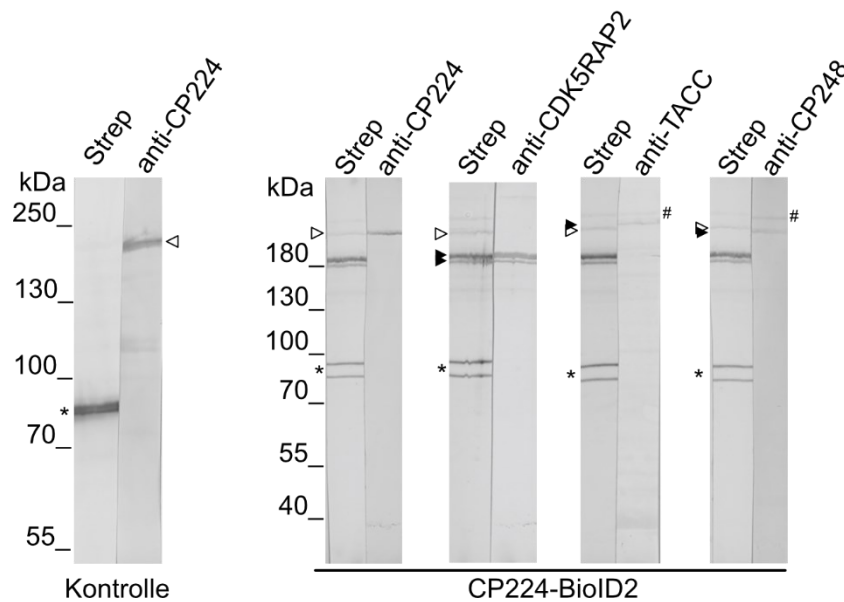


Abbildung 29: Biotinylierungsverhalten von CP224-BioID2. CP224-BioID2 biotinyliert CDK5RAP2 (gefüllte Pfeilspitze) und sich selbst (leere Pfeilspitzen). TACC und CP248 scheinen nicht biotinyliert. Die mit „#“ markierte Bande ist nicht eindeutig zuzuordnen und scheint in der Streptavidin-Färbung, der CP248- und TACC-Färbung aufzutreten. Die Kontrolle zeigt einen FLAG-BioID2-Stamm, der mit der identischen Menge Biotin kultiviert wurde und nur die bekannten, immer biotinylierten Proteine aufweist (*). Primäre Antikörper: monoklonaler anti-CP224-, anti-CP248-Antikörper (Maus) und Kaninchen-Serum mit anti-CDK5RAP2- bzw. TACC-Antikörper. Sekundäre Antikörper: anti-mouse- bzw. anti-rabbit-AP-Antikörper. Entwickelt mit NBT/BCIP. 8%-SDS-PAGE-Gel mit „PageRuler prestained plus“- (Kontrolle) bzw. „PageRuler prestained“ Protein-Größenstandard (CP224-BioID2).

4 DISKUSSION

4.1 FUNKTIONELLE CHARAKTERISIERUNG DES CENTROSOMALEN CORE-PROTEINS CEP192

Cep192 ist eins der in *D. discoideum* bekannten centrosomalen Proteine, welches über Orthologe in anderen Organismen verfügt. Es gibt einen homologen Sequenzbereich und eine für Cep192-Proteine typische ASH-Domäne. Das Verhalten während der Mitose wurde in dieser Arbeit mithilfe eines Cep192-GFP-Knock-in-Stamms näher untersucht. Fixierte Zellen mit fluoreszenzmarkierten Mikrotubuli wie auch Lebendzellaufnahmen zeigen, dass das Fusionsprotein dauerhaft – auch während der Aufspaltung in der Prophase – am mitotischen Centrosom zu finden ist. Das ist im Einklang mit früheren Untersuchungen mit einem Cep192-spezifischen Antikörper (Sander, 2011; Pitzen et al., 2021). Dieses Verhalten zeigen neben Cep192 von den bekannten Core-Proteinen nur CP55 und die Kinase Nek2 (Gräf, 2002; Kuhnert et al., 2012a), während CP39, CP75 und CP91 während der Mitose nicht dort lokalisieren (Putzler et al., 2016; Meyer et al., 2017). Für CP55 existieren keine bekannten Homologe in anderen Organismen und es war ein kompletter Knockout des Proteins erfolgreich. Dieser Knockout zeigt in der Elektronenmikroskopie kleine Änderungen in der Struktur der Corona, wohingegen die Core-Struktur weitestgehend unverändert ist. Die Zellen weisen überzählige MTOC auf, die während der Mitose entstehen und aus Corona-Proteinen bestehen (Kuhnert et al., 2012a).

Der für Cep192 durchgeführte Knockdown mittels RNAi führte zu einer insgesamt recht geringen Reduzierung der Proteinmenge, der jedoch bereits einen signifikanten Phänotyp aufwies, bei dem in 39% der untersuchten Zellen überzählige MTOC auftraten. Diese enthielten ähnlich wie der CP55-Knockout kaum Proteine der centrosomalen Core-Struktur, dafür aber die Corona-Proteine CDK5RAP2, CP148 und CP224.

Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen der Centrosomen im Cep192-RNAi zeigten eine eindeutige Veränderung der Core-Struktur mit deutlich weniger elektronendichter äußerer Core-Schicht und allgemein weniger hohem Ordnungsgrad. Teilweise war auch ein kompletter Verlust der Core-Struktur zu erkennen. Im Vergleich zum CP55-Knockout wird erkennbar (Kuhnert et al., 2012a), dass die Morphologie der Core-Struktur stärker verändert war. Diese stark veränderte Morphologie der Core-

Struktur lässt eine Destabilisierung des gesamten Centrosoms vermuten. Ein Vergleich der Proteinmenge mittels der Fluoreszenzintensitäten der beiden GFP-Knock-in-Fusionsproteine ergab, dass erheblich weniger CP55- als Cep192-GFP exprimiert wird. Insofern kann Cep192 als Hauptkomponente der bekannten Core-Strukturproteine am mitotischen Centrosom bezeichnet werden.

In der Reifung des centriolären Centrosoms spielt Cep192 über die sequenzielle Rekrutierung der AuroraA- und der Plk1-Kinase eine wichtige Rolle: eine Reihe von Phosphorylierungen durch die AuroraA und Plk1-Kinase ermöglicht Cep192 die Rekrutierung von γ -Tubulin. In U2OS-Zellen konnte gezeigt werden, dass in Cep192-siRNA-Zellen deutlich weniger AuroraA und Plk1 am Centrosom lokalisiert (Meng et al., 2015). Zudem ist in Cep192-siRNA-Zellen der Wiederaufbau des Mikrotubuli-Skeletts am Centrosom in Interphasezellen nach einer Kältebehandlung signifikant gestört (O'Rourke et al., 2014).

Da mögliche Phosphorylierungsstellen für die Aurora-Kinase und die Polo-Kinase in Cep192 in *Dictyostelium* identifiziert wurden, könnte Cep192 auch hier durch eine Signalkaskade für die Rekrutierung von Proteinen ans mitotische Centrosom verantwortlich sein. Sowohl die Aurora-Kinase dDAurora, als auch die Polo-Kinase Plk zeigen in *D. discoideum* eine Lokalisation am Centrosom in der Mitose (Bleich, 2020; Li et al., 2008; Schulz et al., 2009b).

Das Verschwinden zu Beginn der Mitose und die Rückkehr ans mitotische Centrosom ist für CDK5RAP2 und γ -Tubulin nachgewiesen ((Pitzen et al., 2018), unveröffentlicht), Cep192 erscheint aufgrund der Homologie und der Rolle in centriolären Centrosomen als ein guter Kandidat für Interaktionen mit den ans mitotische Centrosom zurückkehrenden Proteinen.

In CHO-Zellen wurde ein Teilfragment vom CDK5RAP2-Homolog Cep215 identifiziert, welches in der Interphase nicht am Centrosom lokalisiert, aber für die Bindung während der Mitose ausreicht. Diese Lokalisation ist nicht mehr nachweisbar, wenn die Cep192-Expression reduziert ist (Kuriyama et al., 2020). Diese mitosespezifische Interaktion zwischen CDK5RAP2 und Cep192 könnte in *D. discoideum* größeren Stellenwert haben, da Pericentrin, das häufig als Interaktor von CDK5RAP2 beschrieben wird (S. Kim et al., 2014), zwar mit CP148 ein mögliches Homolog in *D. discoideum* hat, welches aber erst spät in der Telophase wieder am Centrosom lokalisiert (Kuhnert et al., 2012b).

Neben dem Knockdown zeigt auch die Überexpression von GFP-Cep192 dessen Rekrutierungsfähigkeit für weitere centrosomale Proteine, da diese Zellen vollständige, überzählige Centrosomen aufweisen (Pitzen et al., 2021).

Die Entstehung der überzähligen MTOC beim Knockdown von Cep192 scheint spät in der Mitose stattzufinden, was auf eine Destabilisierung des Centrosoms hindeutet. Einen möglichen Mechanismus zur Entstehung der überzähligen MTOC stellt das Ausreißen von Corona-Proteinen durch auf das destabilisierte Centrosom wirkende, Mikrotubuli-basierte Kräfte dar (Koonce et al., 2002). CDK5RAP2 und γ -Tubulin könnten vom Centrosom abgerissen werden und dann funktionelle MTOC mit weiteren Corona-Proteinen gebildet werden.

Bereits vorhandene MTOC waren während der Mitose als GFP- α -Tubulin-Fluoreszenzpunkte weiterhin erkennbar, interferierten aber nicht mit der Spindel. Da *D. discoideum* eine semi-geschlossene Mitose durchführt (O'Day et al., 2015), ist eine Störung der Spindel durch MTOC ohne Kernassoziierung weitestgehend ausgeschlossen. Die Tatsache, dass gezeigt werden konnte, dass MTOC in den Mitosen sichtbar sind, ist ein Hinweis auf intakte Mikrotubuli-Nukleationskeime an den MTOC auch in der Mitose. Die Mitose war vereinzelt massiv verlängert, auch wenn eine Auswertung der Anzahl unterschiedlicher Mitosephasen im Knockdown im Vergleich zu Kontrollzellen nicht signifikant war. Es trat zudem eine leicht erhöhte Ploidie auf. Als Erklärungsansatz könnte hier in Betracht gezogen werden, dass die Reduzierung von Cep192 zu Problemen bei der Rekrutierung Mikrotubuli-nukleierender Proteine, führen könnte, die zum Spindelaufbau notwendig sind. In HeLa-Zellen war beim Knockdown von Cep192 die Konzentration von γ -Tubulin am mitotischen Centrosom niedriger. Es traten fehlerhafte Spindeln auf und der mitotische Index in den Zellen war erhöht (Zhu et al., 2008).

4.2 DIE EXPANSION MICROSCOPY ZEIGT DIE VARIABLE ORIENTIERUNG DER CORE-STRUKTUR AM ZELLKERN

Die Aufklärung der Lokalisation von Proteinen wie Cep192 mittels Fluoreszenzmikroskopie, die in einer Struktur lokalisieren, die unterhalb der Auflösungsgrenze herkömmlicher Fluoreszenzmikroskopie liegen, bedarf einiger grundlegender Überlegungen: Durch die großen Abstände zwischen Fluorophor und Epitop bei der Verwendung von Antikörpern wurde von Beginn an angestrebt, die centrosomalen Proteine mit kurzen Protein-Tags zu versehen, um sie über kleine fluoreszenzmarkierte Konjugate direkt markieren und so höher aufgelöst sichtbar machen zu können. In *D. discoideum* konnten im Zuge dieser Arbeit zwei Protein-Tags an centrosomalen Proteinen etabliert werden: der nur 18 Aminosäuren lange SpotH6- und der 81 Aminosäuren lange BioH6-Tag. Beide Tags konnten an Cep192 fusioniert werden und erwiesen sich für die Expansion Microscopy als geeignet.

Für Cep192 waren in der Expansion Microscopy unterschiedliche Strukturen auflösbar: Cep192-BioH6 zeigt eine kreisrunde und eine zweilagige Fluoreszenz innerhalb des Corona-Markers CP224. Die zweilagige Struktur entspricht einer Lokalisation von Cep192 in den äußeren Core-Schichten.

In elektronenmikroskopischen Aufnahmen zeigten sich für die Core-Struktur vergleichbare Strukturen (Abbildung 17B, (Koonce et al., 2018)), die sich aus der Seitenansicht und der Draufsicht des Centrosoms ergeben. In diesen Aufnahmen wurde auch deutlich, dass die seitliche Orientierung der Core-Struktur relativ zum Zellkern stark variiert. Es gab eine Ausrichtung, bei der der laterale Bereich der Core-Struktur zum Kern gerichtet ist und Orientierungen, bei denen nur eine der äußeren Schichten zum Zellkern orientiert ist. Eine Drehung der Core-Struktur ließ diese zusätzlich seitlich am Zellkern rund erscheinen. Die Expansion Microscopy macht beide Orientierungen auflösbar.

Die teilweise schwierige Suche nach seitlich orientierten Centrosomen in der Expansion Microscopy führen zum Modell in Abbildung 30. Es soll verdeutlichen, dass die Orientierung der Core-Struktur variabler zu sein scheint, als es die gängigen Modelle vermuten lassen, in denen das Centrosom mit einer der äußeren Schichten zum Zellkern orientiert gezeichnet wird (Abbildung 1B, (Gräf et al., 2015)). Dabei können durch das Kippen der Core-Struktur am Kern (Abbildung 30A) und durch Drehbewegungen (Abbildung 30B) eine Vielzahl an Orientierungen entlang der starren

Z-Achse beobachtet werden. Mittels einer Untersuchung der Position des Centrosoms in der Zelle relativ zum Kern konnte zudem festgestellt werden, dass in fixierten Zellen ebenfalls eine Lokalisation oberhalb und unterhalb des Kerns vorkommt: Abbildung 30C zeigt mögliche Positionen des Centrosoms am Kern und die variable Orientierung der Core-Struktur innerhalb des Corona.

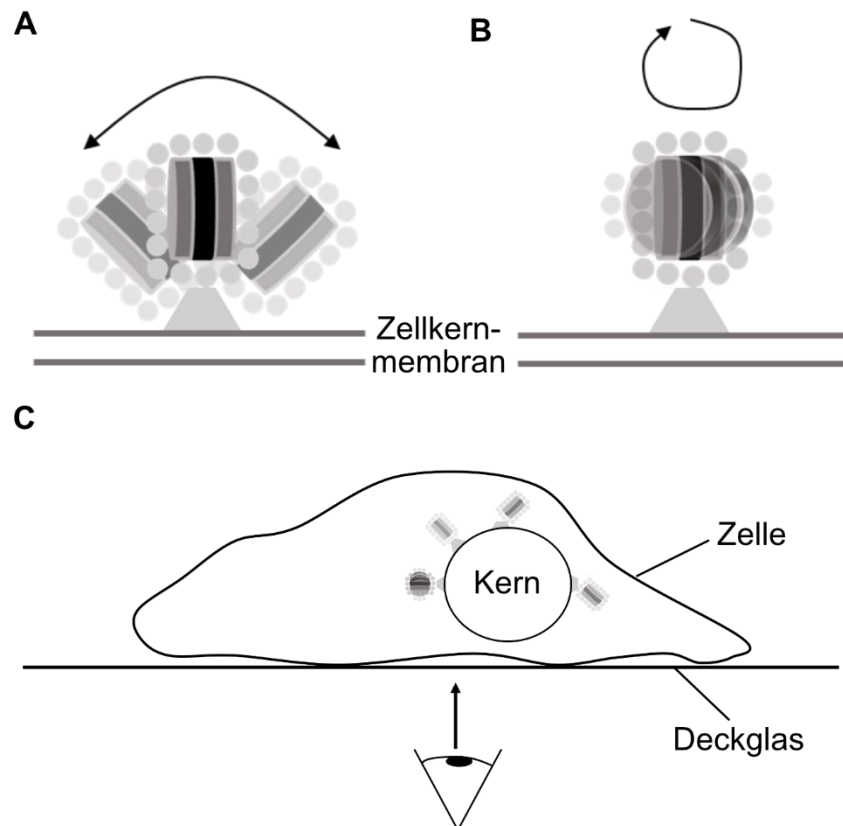


Abbildung 30: Modell zur Orientierung der Core-Struktur. (A) Elektronenmikroskopische Aufnahmen legen eine Kippbewegung der Core-Struktur relativ zum Kern nah. (B) In Kombination mit einer Drehung um die eigene Achse ergeben sich so zahlreiche Orientierungsmöglichkeiten der Core-Struktur am Kern. (C) Das Centrosom hat zusätzlich unterschiedliche Lokalisationen am Kern, von denen hier mögliche gezeigt sind, die die Variabilität der Orientierung entlang der Z-Achse (angedeutet durch das Auge) zusätzlich erhöhen (vereinfachte Darstellung mehrerer Centrosomen in einer Zelle).

Während bei einem kleinen Neigungswinkel des Centrosoms entlang der Schnittachse in der Elektronenmikroskopie aufgrund der hohen Auflösung die dreischichtige Struktur trotzdem aufgelöst werden kann, ist eine optimale Auflösung der zwei äußeren Schichten in der Expansion Microscopy nur bei einem möglichst parallelen Verlauf der Z-Achse zu den Schichten möglich. Abbildung 31A zeigt schematisch eine, entlang der Z-Achse zur Auflösung der beiden fluoreszierenden Schichten ideal positionierte, Core-Struktur. Die beiden fluoreszierenden Schichten können in diesem Fall sehr gut getrennt werden. Liegt das Centrosom leicht gekippt in

der Z-Achse (Abbildung 31B), verkleinert sich der Spalt (Pfeil) zwischen den Fluoreszenzschichten in den einzelnen Z-Stapeln und fällt letztlich unter die Auflösungsgrenze.

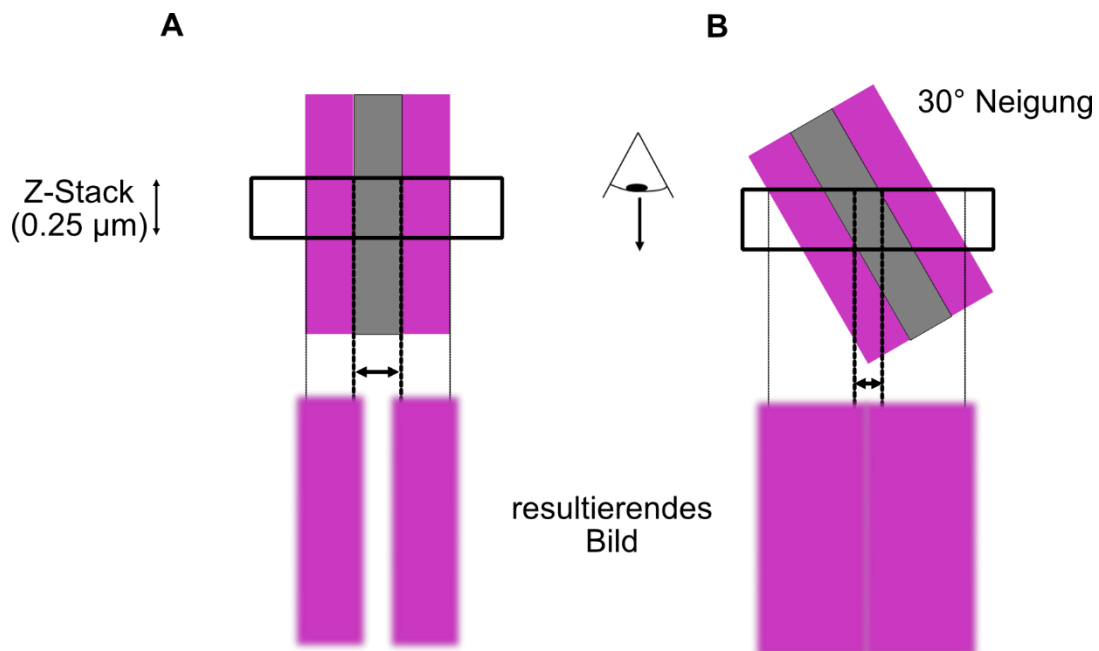


Abbildung 31: Negative Effekte einer nicht ideal orientierten Core-Struktur in der Fluoreszenzmikroskopie. (A) Ist die expandierte Core-Struktur ideal in der Z-Achse (angedeutet durch das Auge) orientiert, kann die zweischichtige Fluoreszenz von Cep192-BioH6 (magenta) gut aufgelöst werden. (B) Liegt die Core-Struktur leicht gekippt in der Z-Achse, verkleinert sich der Bereich, in dem keine Fluoreszenz detektiert wird, bis er schließlich nicht mehr detektierbar ist.

Die Tatsache, dass die sehr kleine Core-Struktur keine feste Orientierung in der Zelle hat, unterstreicht die Stärken der Expansion Microscopy zur Aufklärung dieser Struktur: man erhält in kurzer Zeit eine dreidimensionale Aufnahme der markierten Strukturen und erreicht so einen relativ hohen Durchsatz, z.B. im Vergleich zur STORM-Mikroskopie. Da ohne Expansion kein zuverlässiger Marker zur Abschätzung der Orientierung existiert, ist eine Vorhersage über die Orientierung vor Beginn der Aufnahme nicht möglich. Insofern ist ein hoher Durchsatz ein großer Vorteil bei der Aufklärung.

Diesem Vorteil der Expansion Microscopy stehen einige potenziell negative Effekte gegenüber, die evaluiert wurden: die Vergrößerung der angefärbten Struktur in der Gelmatrix muss in Bezug auf die mögliche Bildung von Artefakten untersucht werden, die z.B. durch mangelnde Zugänglichkeit zur Struktur hervorgerufen werden können. Zur Untersuchung solcher Artefakte wurde die Cep192-SpotH6/BioH6-Fluoreszenz mit einer herkömmlichen Färbung des Core-Proteins CP91 mit primärem und sekundärem Antikörper verglichen: deutlich wurde, dass die Antikörperfärbung zwar die vermutete Lokalisation in der inneren Schicht zeigt, aber an den Rändern über das Cep192-

SpotH6-Signal hinausragt. Die Draufsicht zeigt ebenso Anzeichen einer Artefaktbildung. Die CP91-Färbung zeigt eine ringförmige Struktur, während Cep192-BioH6 die gesamte Fläche abdeckt. Wird eine Struktur z.B. aufgrund sterischer Hinderung nicht komplett durchdrungen, sondern nur in den Randbereichen gefärbt, ist das, wenn die Struktur unterhalb der Auflösungsgrenze liegt, mit herkömmlicher Fluoreszenzmikroskopie nicht zu erkennen. Wenn die gefärbte Struktur nun expandiert wird, vergrößert sich der nichtgefärbte Bereich und wird unter Umständen als nicht fluoreszierend sichtbar (Abbildung 32).

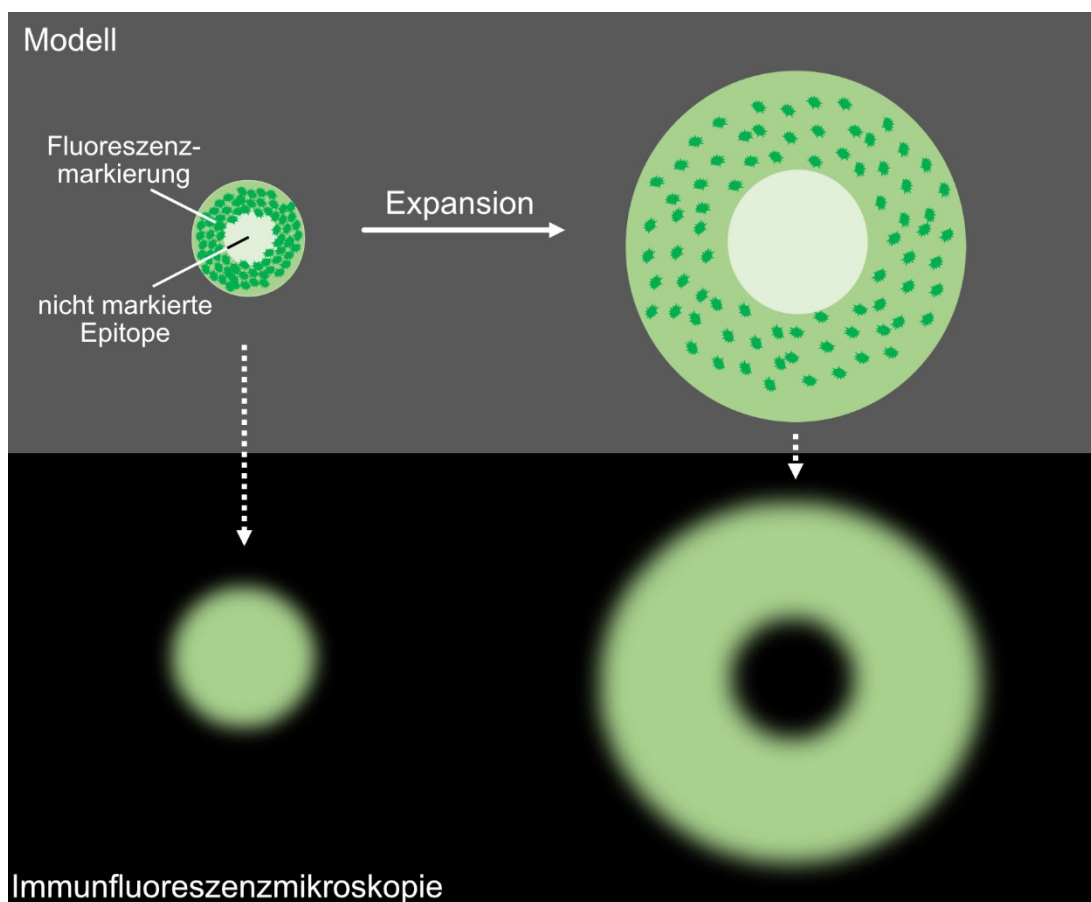


Abbildung 32: Möglicherweise auftretende Artefakte durch mangelnde Zugänglichkeit zur Struktur in der Expansion Microscopy. Während in nichtexpandierten Proben die mangelnde Zugänglichkeit (hellgrüner Bereich) durch die Auflösungsgrenze nicht sichtbar wird, wird sie in der Expansion Microscopy als Artefakt erkennbar. Der hellgrüne, nichtmarkierte Bereich zeigt dann keine Fluoreszenz mehr, da der nichtmarkierte Teil der Struktur nach der Expansion über der Auflösungsgrenze liegt.

4.3 CEP192-BIOH6 UND CEP192-SPOTH6 LOKALISIEREN IN DEN ÄUßEREN SCHICHTEN DER CENTROSOMALEN CORE-STRUKTUR

Da Cep192-BioH6 in Abhängigkeit der Orientierung eine zweischichtige Fluoreszenz zeigte, wurde es als möglicher Marker für die seitliche Orientierung der Core-Struktur in der Expansion Microscopy genauer untersucht. Die Verfügbarkeit von Cep192-SpotH6 machte einen Vergleich der beiden Tags möglich.

Der direkte Vergleich von Cep192-BioH6 mit Cep192-SpotH6 ergab in der Expansion Microscopy trotz des etwas größeren Streptavidins vergleichbare Ergebnisse bei der Abstandsmessung der beiden Fluoreszenzschichten. Diese passen auch gut zu den Messungen in der Elektronenmikroskopie, wenn man eine Lokalisation von Cep192 in den äußeren Schichten annimmt.

Diese Tatsache, die sehr ähnlichen Ergebnisse von Cep192-BioH6 und Cep192-SpotH6 in der Expansion Microscopy, das beschriebene Verhalten von Cep192-GFP in der Mitose und die Veränderungen der Core-Struktur in den elektronenmikroskopischen Aufnahmen der Cep192-RNAi-Centrosomen sind zusammengenommen genug, um die Lokalisation in den äußeren Schichten anzunehmen.

Durch das unterscheidbare Erscheinungsbild der Fluoreszenz je nach Orientierung der Core-Struktur ist Cep192 auch ein geeigneter Marker zur Einschätzung der Orientierung. Mit Cep192-BioH6 konnte zudem die Qualität der herkömmlichen Expansion Microscopy durch die Durchführung von Ultrastructural Expansion Microscopy überprüft werden. Ursprünglich entwickelt, da Strukturen in der Expansion Microscopy im Vergleich zu Referenzmethoden zu groß erschienen, wurde die Methode an Centriolen angewandt und führte zu deutlichen Verbesserungen (Gambarotto et al., 2019). Obwohl die erhaltenen Abstände für die Cep192-SpotH6/BioH6-Fluoreszenzschichten als repräsentative Struktur der äußeren Core-Schicht gut im Einklang mit den Messungen der Breite der Core-Struktur aus der Elektronenmikroskopie waren, wurde ein Vergleich beider Methoden mit Cep192-BioH6 durchgeführt: Es ergab sich kein signifikanter Unterschied im Abstand der beiden Fluoreszenzschichten. Die Annahme liegt nahe, dass der beschriebene Vorteil der Ultrastructural Expansion Microscopy teilweise daraus resultiert, dass man den großen Abstand vom Epitop zum Fluorophor am sekundären Antikörper durch die Expansion nicht zusätzlich vergrößert, sondern die bereits expandierte Struktur mit

primärem und sekundärem Antikörper färbt. Durch den Einsatz kurzer Tags und kleiner direkt fluoreszenzmarkierter Nachweiskonjugate scheint dieser Vorteil in der klassischen Expansion Microscopy kompensiert.

4.4 DIE CORE-STRUKTUR: AUFKLÄRUNG DER CORE-SCHICHTEN UND MÖGLICHE INTERAKTIONEN

Cep192 war das einzige Protein, bei dem die Implementierung des SpotH6-Tags erfolgreich war. Die Eignung als Marker für die Orientierung der Core-Struktur machten Cep192-SpotH6-Stamm zu einer sehr guten Plattform für die Erstellung von Doppelmutanten. Für die Erstellung wurde der zweite etablierte Tag, der BioH6-Tag, verwendet: CP91-BioH6 und CP39-BioH6 Knock-in-Konstrukte wurden erstellt und in einen resistenzfreien Cep192-SpotH6-Stamm kloniert. Beide BioH6-Fusionsproteine zeigen in der Expansion Microscopy eine Lokalisation innerhalb der zwei Cep192-SpotH6-Fluoreszenzschichten, was gut zu ihrer bisher angenommenen Lokalisation aufgrund des Verhaltens in der Mitose passt. Während für CP39-BioH6 keine weitere Substruktur erkennbar war, scheint CP91-BioH6 in zwei Schichten innerhalb der inneren Core-Struktur zu lokalisieren. Ein ähnliches Modell mit mehr als drei Core-Schichten existiert bereits basierend auf frühen elektronenmikroskopischen Aufnahmen (Omura et al., 1985). Nichtsdestotrotz ist aufgrund des gleichen Verhaltens der inneren Core-Struktur-Proteine in der Mitose, die Beschreibung von drei Schichten sinnvoll, auch wenn es Substrukturen in der inneren Core-Schicht zu geben scheint.

Dass es sich bei der zuvor beschriebenen, möglichen Artefaktbildung mit dem CP91-Antikörper, tatsächlich um Artefakte handelte, die vermutlich durch die mangelnde Zugänglichkeit in der Expansion Microscopy sichtbar werden, konnte in entsprechend orientierten Centrosomen des Cep192-SpotH6/CP91-BioH6 nachgewiesen werden. CP91-BioH6 erschien nicht ringförmig, sondern als gefüllter Kreis und ging lateral nicht über die Cep192-SpotH6-Fluoreszenz hinaus, was den Schluss zulässt, dass die Durchdringung der Core-Struktur durch Streptavidin und den Spot-V_HH vollständiger ist.

Es existieren weitere erste Daten zu den zwei anderen Proteinen der Core-Struktur: CP75-BioH6 scheint in der inneren Core-Schicht zu lokalisieren (Gharib, 2021). In ersten Untersuchungen von CP55-BioH6 zeigte das Protein eine Lokalisation

zwischen den beiden Cep192-SpotH6-Fluoreszenzschichten. Für CP55, welches während der Mitose die ganze Zeit an den Spindelpolen zu finden ist, wird auf dieser Grundlage eigentlich eine Lokalisation in den äußeren Schichten der Core-Struktur angenommen. Die Datenlage für CP55 ist für eine sichere Beurteilung noch nicht qualitativ genug, da der Fluoreszenzverlust bei der CP55-BioH6-Markierung mit Streptavidin nach der Expansion oft so stark ausfiel, dass es nicht mehr gut nachweisbar war. Das steht in Übereinstimmung mit der Auswertung der Proteinmenge basierend auf der Fluoreszenzintensität: die ergab, dass CP55 von den untersuchten Core-Proteinen am geringsten exprimiert ist. Die Kombination aus niedriger Expression unter dem endogenen Promotor, der 1:1-Markierung durch fluoreszenzkonjugiertes Streptavidin und dem Fluoreszenzverlust durch das Quellen der Gelmatrix setzt der Expansion Microscopy hierbei Grenzen.

Es erscheint aber durchaus möglich, dass das bisherige Modell zur Zuordnung der Core-Proteine zu den einzelnen Schichten zu einfach ist und weitere Umstrukturierungen am mitotischen Centrosom ablaufen, die es Proteinen der inneren Schicht ermöglichen, am mitotischen Centrosom zu lokalisieren.

4.5 CORE UND CORONA: MÖGLICHE INTERAKTIONEN UND RÄUMLICHE ANORDNUNG

Die Analyse der centrosomalen Proteine in der Expansion Microscopy wurde im Folgenden auf die Corona-Strukturproteine CDK5RAP2 und CP148 ausgeweitet. Zur genaueren Untersuchung der Lokalisation von CDK5RAP2 wurde ein Cep192-SpotH6/CDK5RAP2-BioH6-Stamm in der Expansion Microscopy untersucht. Es zeigte sich eine relative große Überlagerung entlang der Cep192-SpotH6-Fluoreszenz, CDK5RAP2 überragt Cep192 aber lateral und umschließt so die gesamte Core-Struktur. Die Möglichkeit einer Interaktion von CDK5RAP2 und Cep192 erscheint auch durch ihr Verhalten in der Mitose naheliegend. Wie bereits in Kapitel 4.1 diskutiert, gehören CDK5RAP2, welches kurz zu Beginn der Mitose vom Centrosom disassembliert, und Cep192 zu den Proteinen, die später gemeinsam am mitotischen Centrosom lokalisieren. Die Rolle von Cep192 in anderen Organismen und der Phänotyp des Cep192-RNAi lässt die Vermutung zu, dass Cep192 für die Rekrutierung von CDK5RAP2 und die Verankerung am mitotischen Centrosom wichtig sein könnte.

Relativ zu Cep192-SpotH6 lokalisiert CP148-BioH6 in der Expansion Microscopy weiter außen als CDK5RAP2-BioH6, aber vergleichbar zu CDK5RAP2-BioH6 an den lateralen Bereichen der centrosomalen Core-Struktur. Eine gemeinsame Funktion im Interphase-Centrosom von CDK5RAP2 und CP148 ist wahrscheinlich, da Knockdown-Versuche mit beiden Proteinen einen vergleichbaren Phänotyp mit dem weitgehenden Verlust der normalen Mikrotubuli-Organisation zeigen. Beim Knockdown von CP148, einem möglichen Pericentrin-Homolog, war der Spindelaufbau in der Mitose dabei nicht betroffen (Kuhnert et al., 2012b; Pitzen et al., 2018). Auch in anderen Organismen ist die wechselseitige Interaktion von Pericentrin und CDK5RAP2 beschrieben (S. Kim et al., 2014; Jung et al., 2021).

In elektronenmikroskopischen Aufnahmen erscheint die Corona als amorphe, den elektronendichten Core umgebende Struktur. Die Expansion Microscopy von CDK5RAP2-BioH6, CP148-BioH6 und CP224 zeigen jedoch eine klar unterscheidbare Lokalisation dieser drei Proteine relativ zum äußeren Core-Protein Cep192-SpotH6. Zusätzlich wurde die Lokalisation der Corona-Proteine CDK5RAP2 und CP148 relativ zu CP224 untersucht. CP148-BioH6 ist hier im Vergleich zu CDK5RAP2-BioH6 näher assoziiert mit CP224, was die Erwartung aus der erhaltenen Lokalisation relativ zu Cep192-SpotH6/BioH6 widerspiegelt.

Im Vergleich zu Cep192-BioH6 lokalisiert demzufolge von den untersuchten Proteinen CP224 am weitesten entfernt in der Corona. Einschränkend sei angemerkt, dass CP224 nur mit herkömmlichen Antikörpern markiert wurde, was in der Expansion Microscopy, wie gezeigt wurde, ungenau sein kann. Hinzu kommt für CP224, dass es als XMAP215-Homolog ein großes, vermutlich langgestrecktes Protein ist (Cassimeris

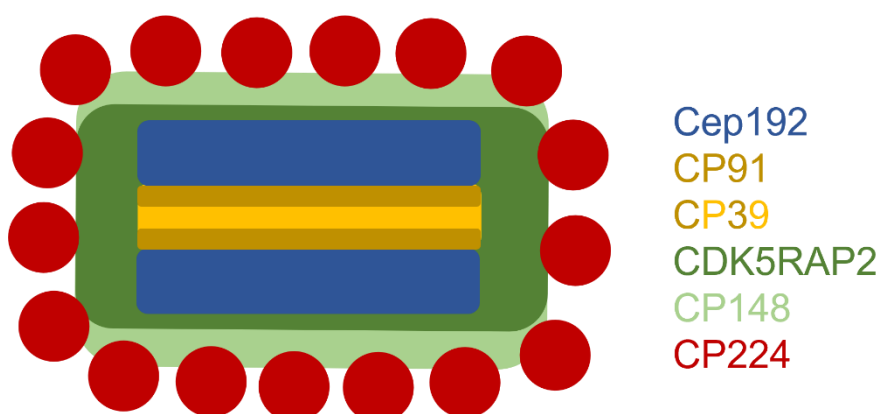


Abbildung 33: Topologie der untersuchten Proteine am *Dictyostelium* - Centrosom. Cep192 lokalisiert in den äußeren Schichten der Core-Struktur (blau). Nah an den beiden äußeren Core-Schichten lokalisiert CP91 in der inneren Schicht (dunkelgelb), gemeinsam mit CP39 (gelb). Die Core-Struktur ist eng umschlossen von CDK5RAP2 (dunkelgrün). Weiter außen lokalisieren CP148 (hellgrün) und CP224 (rot).

et al., 2001), dessen N- und C-Terminus weit voneinander entfernt liegen könnten. Andererseits ist die Gefahr der Entstehung von starken Artefakten durch die Lokalisation in der größeren, weniger dicht gepackten Corona kleiner.

Zusammengefasst deuten diese Ergebnisse auf einen hohen Organisationsgrad der Corona hin, bestehend aus mit dem Core eng assoziiertem CDK5RAP2, damit interagierendem CP148 und der äußeren Corona mit weiteren, Mikrotubuli-assoziierten Proteinen wie CP224. Die aufgrund der Expansion Microscopy angenommene, verfeinerte Topologie des Centrosoms ist in Abbildung 33 dargestellt.

4.6 BIOTINYLIERUNGSASSAYS ERGÄNZEN DIE DATEN AUS DER EXPANSION MICROSCOPY

Der Biotinligase-Tag BioID2 ermöglichte zusätzlich eine Untersuchung potenzieller Interaktionspartner der zuvor fluoreszenzmikroskopisch untersuchten Proteine durch deren Biotinylierungsverhalten.

Trotz der in den Kontrollversuchen mit BioID2 aufgetretenen, ungewollten unspezifischen Biotinylierung am Centrosom, konnte durch eine Anpassung der Biotinkonzentration und der Reduzierung der Überexpressionsstärke in der Kontrolle eine hohe Auflösung der Methode, also ein begrenzter Biotinylierungsradius erreicht werden. Dieser wird angenommen, da zahlreiche BioID2-Fusionsproteine am Centrosom, trotz ähnlicher Lokalisation unterschiedliche Biotinylierungsmuster zeigten, die im Folgenden auch vergleichend mit überexprimierten, bereits publizierten BirA*-Stämmen diskutiert werden. Eine Übersicht zu den im Folgenden diskutierten Biotinylierungsmustern befindet sich in Abbildung 34 auf Seite 68 am Ende dieses Kapitels.

Aufgrund des Aufbaus des Knock-in-Plasmids, ist der Tag nach der erfolgreichen Transformation immer C-terminal ans Protein fusioniert. Die Überexpressionskonstrukte der BirA* (BioID) sind hingegen oft N-terminal fusionierte Fusionsproteine. Aufgrund des kleinen Radius der Biotinylierung kann eine N- oder C-terminale Fusion der Biotinligase zu unterschiedlichen Ergebnissen führen.

Cep192 wurde sowohl von CP39-BioID2 und CP91-BioID2 biotinyliert. CP39-BioID2 zeigte außerdem eine deutliche Biotinylierung von CP75, aber nicht von CP91. Die spezifische Interaktion von CP39 mit CP75 konnte bereits in einem

„Yeast2Hybrid“-Assay beobachtet werden (Meyer et al., 2017). Für die Tatsache, dass CP91 bei CP39-BioID2 nicht biotinyliert vorlag, aber Cep192 schon, lieferte der CP91-BioID2-Stamm selbst eine mögliche Erklärung. CP91-BioID2 biotinylierte die Core-Proteine CP75 und Cep192. Das CP91-BioID2-Fusionsprotein war aber kaum in der Lage, sich selbst zu biotinylieren und könnte selbst ein schlechtes Biotinylierungsziel sein. Die Lage von CP39 und CP91 in der inneren Schicht ist zwar in der Expansion Microscopy unterscheidbar, aber eine Interaktion dort trotzdem wahrscheinlich. So war im BirA*-CP91-Stamm CP39 deutlich biotinyliert. Hier wird auch eine Biotinylierung von CP91 durch BirA*-CP39 und -CP75 beschrieben (Meyer et al., 2017).

Durch das veränderte Laufverhalten von CP91-BioID2 im entsprechenden Stamm wurden zwei Banden sichtbar, die in der Nähe des in diesem Stamm nicht mehr vorhandenen endogenen CP91 zu laufen scheinen. Hier zeigt sich eine Schwäche des BioID2-Ansatzes. Zwar handelt es sich um eine aufgereinigte Protein-Fraktion, im Western Blot erfolgt die Zuordnung der biotinylierten Banden aber nur mithilfe spezifischer Antikörper, hierbei kann ohne weitere Analysen (z.B. Massenspektrometrie) nie komplett ausgeschlossen werden, dass ein weiteres, eventuell unbekanntes Protein mit ähnlichem Laufverhalten in der SDS-PAGE und Western Blot zu finden ist. Diese Problematik ist bei größeren Proteinen verschärft, da die Auftrennung geringer ausfällt und durch den BioID2-Tag die Proteine ein noch ähnlicheres Laufverhalten aufweisen. Dies ist z. B. bei CP224-BioID2 und TACC zu beobachten.

Trotz dieser Limitierung wurde versucht in den CP91-BioID2-Centrosomen die zwei Banden mit verfügbaren Antikörpern gegen bekannte Proteine zu identifizieren: eine der beiden Banden läuft in etwa auf Höhe des an der Kernassoziation des Centrosoms beteiligten Membranproteins Sun1.

Eine Biotinylierung von Sun1 durch CP91-BioID2 ist allerdings fraglich: Sun1 lokalisiert in der inneren und äußeren Zellkernmembran, besonders konzentriert auf der Seite, an der das Centrosom lokalisiert ist und einseitig am Centrosom. Zwar wird Sun1 in der Centrosomen-Präparation mitaufgereingt und ist im Western Blot und der Immunfluoreszenz nachweisbar, es verfügt aber über keine bekannte Spleiß-Variante ohne Transmembrandomäne. Schulz et al. gehen deshalb davon aus, dass es sich um Fragmente der Kernmembran handelt, die mit in die Centrosomen-Präparation geraten. Elektronenmikroskopische Untersuchungen mit goldmarkierten Antikörpern zeigen keine centrosomale Fraktion von Sun1 (Schulz et al., 2009a). Andererseits

zeigt ein BirA*-Sun1-Überexpressions-Stamm einige biotinylierte centrosomale Proteine, auch die infrage kommende breite Bande, auf deren Höhe CP91 in der Elektrophorese läuft, ist darunter (Meyer, unveröffentlicht). Da CP91 in dieser Arbeit aber als schlechtes Biotinylierungsziel identifiziert wurde, kann aufgrund der vorliegenden Daten keine sichere Aussage getroffen werden.

Die nahe Assoziation von Cep192 und CDK5RAP2 in der Expansion Microscopy spiegelte sich auch bei den jeweiligen BioID2-Konstrukten wider: CDK5RAP2-BioID2 biotinylierte als Protein der Corona nur das Core-Protein Cep192 deutlich. Das stellt einen Unterschied zum BirA*-CDK5RAP2-überexprimierenden Stamm dar, wo neben Core-Proteinen auch CP248 biotinyliert war, aber Cep192 im Vergleich schwach (Pitzen et al., 2018). Sicherlich spielt die Überexpression des Fusionsproteins hier eine Rolle, aber der Unterschied kann auch mit der anderen Tag-Positionierung erklärt werden: CDK5RAP2 hat eine N-terminal gelegene γ -TuRC-Domäne (Sukumaran et al., 2015). Wird die Biotinligase hier fusioniert, ist ein Nachweis von dort interagierenden Proteinen wahrscheinlich, während aufgrund der Größe des Proteins unter Umständen andere Interaktionen nicht gezeigt werden können.

Cep192-BioID2 biotinylierte CDK5RAP2 ebenso und eine Bande um CP91, die aber breiter ist als die CP91-spezifische Antikörper-Markierung und potenziell auch den beiden im CP91-BioID2 auftretenden Banden entsprechen könnte.

CP148-BioID2 zeigt eine Biotinylierung von CDK5RAP2 (Pitzen et al., 2018), die im Einklang mit der ähnlichen Lokalisation in der Expansion Microscopy und der möglichen, gemeinsamen Funktion in der Zellkern-Befestigung steht.

CDK5RAP2 wurde auch von CP91-BioID2 biotinyliert. Eine solche Interaktion ist am ehesten lateral an der dreilagigen Core-Struktur denkbar. Die beiden unbekannt Banden im Biotinylierungsmuster der CP91-BioID2-Centrosomen könnten unbekannte Proteine mit einer Lokalisation in der äußeren Core-Schicht oder der Corona sein, da die breitere Bande auch im Cep192-BioID2-Stamm auftritt, der wie CP91 das Corona-Protein CDK5RAP2 zu biotinylieren scheint. CP39-BioID2 hingegen zeigte keine entsprechende, unbekannte Bande.

CP224-BioID2 zeigte im Biotinylierungsassay eine deutliche Biotinylierung von CDK5RAP2. Bemerkenswert ist, dass CP148 nicht erkennbar biotinyliert wurde, obwohl CP148 laut der Daten aus der Expansion Microscopy näher an CP224 zu lokalisieren scheint. Jedoch sind CDK5RAP2 und CP224 als Bestandteile der Corona beide am

mitotischen Centrosom zu finden, was eine direkte Interaktion durchaus möglich erscheinen lässt.

CP224-BioID2 zeigte keine Biotinylierung des bekannten interagierenden Proteins TACC, was unter Umständen durch die C-terminale Position des Tags erklärt werden kann. Die CDK5RAP2-Biotinylierung deutet hier ähnlich wie bei CDK5RAP2-BioID2 auf eine Orientierung des C-Terminus Richtung Core-Struktur hin.

TACC ist in der Immunfluoreszenz ebenso wie CP224 an den Mikrotubuli-Plus-Enden und in der Corona zu finden. Die CP224-Lokalisation an den Mikrotubuli-Plus-Enden ist in einem TACC-RNAi gestört, die am Centrosom ist nicht betroffen (Samereier et al., 2011), scheint also unabhängig von TACC. Dazu passt auch, dass ein C-terminales Fragment von CP224 in der Lage war, am Centrosom zu lokalisieren, während die Bindung an die Mikrotubuli gestört war (Gräf et al., 2000). TACC könnte zudem ein schwaches Biotinylierungsziel sein. Möglicher Kandidat für die Assoziation am Centrosom für CP224 aufgrund der BioID2-Daten wäre also CDK5RAP2. Auch die Tatsache, dass weder CP148-BioID2 noch CP224-BioID2 das Core-Struktur-Protein Cep192 biotinylieren, stützt die Theorie, dass es eine Interaktion von Cep192 und CDK5RAP2 gibt, auf der der weiter außen gelegene Aufbau der Corona basiert.

Alles in allem wird trotz der diskutierten Nachteile deutlich, wie hoch die Auflösung der BioID2 ist, da proteinspezifische, potenziell sogar von der gewählten Position am N- oder C-Terminus innerhalb des Proteins abhängige Biotinylierungsmuster erreicht werden.

biotinyliert → -BioID2 ↓	CP39	CP75	CP91	Cep192	CDK5 RAP2	CP148	CP224	Sun 1
CP39								
CP91								?
Cep192			?					?
CDK5RAP2						?		
CP148 *								
CP224								

Abbildung 34: Übersicht zu den biotinylierten Proteinen in der BioID2-Analyse. In den Zeilen sind die BioID2-Fusionsproteine eingetragen, in den Spalten die jeweils biotinylierten Proteine in grün. Graue Felder sollen illustrieren, dass die Proteine nicht biotinyliert sind bzw. nicht im Western Blot nachgewiesen wurden. Die „?“ sollen illustrieren, dass die Biotinylierung fraglich ist, der Grund dafür ist z.B. ähnliches Laufverhalten mit anderen Proteinen im Western Blot. Die CP148-BioID2-Daten (*) stammen von (Pitzen et al., 2018).

4.7 FAZIT UND AUSBLICK

In dieser Arbeit wurde das Protein Cep192 weiter erfolgreich charakterisiert und als integraler Bestandteil der äußeren Core-Schichten erstmals optisch mittels Expansion Microscopy bestätigt. Die dauerhafte Lokalisation am Centrosom durch alle Zellzyklusphasen passt gut dazu. Bereits eine insgesamt eher geringe Verminderung der Proteinmenge sorgte für einen starken Phänotyp mit überzähligen MTOC und leicht erhöhter Ploidie: Cep192 ist insofern offenbar ein wichtiger struktur- und stabilitätgebender Bestandteil des Centrosoms. Das spiegelte sich auch in der häufigen Biotinylierung von Cep192 im Biotinylierungsassay mit BioID2-Fusionsproteinen wider.

Das Überwinden der Auflösungsgrenze mittels Expansion Microscopy ermöglichte die Darstellung der vielfältigen Orientierung der Core-Struktur. Die Expansion Microscopy war hier ideal, um in kurzer Zeit viele Centrosomen und somit eine ausreichend große Anzahl mit der richtigen Lage relativ zur Z-Achse aufzunehmen.

Dafür ist die Gefahr für die Entstehung von Artefakten durch das Quellen der Gelmatrix in der Expansion Microscopy hoch. Diesem Problem konnte durch die Verwendung kleiner Tags in Verbindung mit direkt fluoreszenzmarkierten Nachweiskonjugaten begegnet werden. Die Kombination aus SpotH6- und BioH6-Tag erlaubte die parallele Markierung von zwei Proteinen und führte gemeinsam mit den in der BioID2-Analytik erhaltenen Ergebnissen zu einem verfeinerten Bild der Struktur des Centrosoms: Cep192 ist eine Hauptkomponente der äußeren Core-Schichten, an dessen Innenseite CP91 zu finden ist. CP39 lokalisiert ebenfalls in der inneren Core-Schicht, im Gegensatz zu CP91 aber ohne weitere erkennbare Sublokalisierung. Nach außen wird die Core-Struktur von dem Corona-Protein CDK5RAP2 eng umlagert. CP148 und CP224 lokalisieren weiter außen in der Corona.

Da in dieser Arbeit ein Fokus auf die Aufklärung der Struktur des Centrosoms gelegt wurde, sind wichtige regulatorische Fragen noch offen. So bleibt unklar, ob Cep192 tatsächlich, wie im centriolären Centrosom, eine Schlüsselrolle bei der Reifung des Centrosoms durch die Rekrutierung von Kinasen einnimmt. Die identifizierten, möglichen Phosphorylierungsstellen von Cep192 könnten gezielt mutiert werden, um die Effekte zu untersuchen.

Eine weitere Limitierung in der Expansion Microscopy war, dass der SpotH6-Tag nur an Cep192 erfolgreich etabliert werden konnte. Dadurch konnten alle

centrosomalen Core-Proteine nur mit Cep192 sinnvoll verglichen werden. Zur Erstellung von Dreifachmutanten oder mehr Kombinationsmöglichkeiten wäre die Etablierung weiterer Tags um drei Proteine gleichzeitig sichtbar zu machen, sinnvoll. Aussichtsreicher Kandidat wäre z.B. der kleine ALFA-Tag mit zugehörigem V_{HH} (Götzke et al., 2019).

Obwohl die Knock-in-Strategie über homologe Rekombination an den centrosomalen Proteinen gut funktioniert, wäre eine Erweiterung der Knock-in-Möglichkeiten über das Crispr-Cas9-System sinnvoll. Aus unbekanntem Gründen gibt es insbesondere bei kurzen Fusionsproteinen häufiger Probleme mit dem Knock-in über homologe Rekombination. Das Crispr-Cas9 System ist mittlerweile in *Dictyostelium* etabliert (Iriki et al., 2019; Muramoto et al., 2019) und könnte dazu beitragen, das Knock-in-Repertoire zu erweitern. Dann wären z.B. auch N-terminale Knock-ins möglich, diese wären insbesondere bei der BioID2-Analyse interessant, um die Auflösung der Methode in *Dictyostelium* näher zu betrachten. Dazu könnten Unterschiede im Biotinylierungsmuster N- und C-terminaler Fusionen der BioID2 an größeren Proteinen untersucht werden.

Sicherlich wäre trotz der durchgeführten Validierung der Expansion Microscopy auch eine zusätzliche Untersuchung der Topologie der untersuchten Proteine am Centrosom mithilfe einer anderen hochauflösenden Mikroskopiemethode sinnvoll.

5 MATERIAL UND METHODEN

5.1 MATERIAL

5.1.1 Allgemeine Chemikalien und Puffer

Die eingesetzten Chemikalien wurden von Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland), Formedium (Hunstanton, Großbritannien), Fluka (Buchs, Schweiz) und Merck (Darmstadt, Deutschland) bezogen. Die hier aufgeführten Medien und Puffer wurden verschiedentlich eingesetzt, alle weiteren Puffer befinden sich unter der jeweiligen Methode. Plastikverbrauchsmaterialien wurden von Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland) bezogen.

HL5c-Medium

16,55 g/l HL5c (ohne Glucose) (Formedium, Hunstanton, Großbritannien), 10 g/l Glucose nach dem Autoklavieren

LoFlo-Medium

16,8 g/l LoFlo (Formedium, Hunstanton, Großbritannien)

1x PBS-Puffer

70 mM Na₂HPO₄, 30 mM KH₂PO₄; pH 6

1x Phosphat-Puffer

2 mM Na₂HPO₄, 14,6 mM KH₂PO₄; pH 6

LB-Medium

20 g/l LB-Broth Lennox (Formedium, Hunstanton, Großbritannien); pH 7

LB-Agar

20 g/l LB-Broth Lennox (Formedium, Hunstanton, Großbritannien), 15 g/l Bacto-Agar; pH 7

SM-Agar

20 g/l Pepton, 10 g/l Glucose, 1 g/l Hefe-Extrakt, 1 g/l MgSO₄, 2,2 g/l K₂HPO₄, 20 g/l Bacto-Agar; pH 6,5

Phosphat-Agar

14,6 mM KH₂PO₄, 2 mM Na₂PO₄, 15 g/l Bacto-Agar; pH 6

5.1.2 Antibiotika

Name	Stock-Konzentration	Endkonzentration
Ampicillin	100mg/ml	100 µg/ml
Blasticidin S	8mg/ml	4 µg/ml
G418	20 mg/ml	10 µg/ml
100x PenStrep	10000 U/ml Penicillin, 10 mg/ml Streptomycin	100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin

5.1.3 Kits und Enzyme

FastDigest®-Restriktionsenzyme	Thermo Fisher (Waltham, MA, USA)
Phusion® High Fidelity Polymerase	Thermo Fisher (Waltham, MA, USA)
Proteinase K	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
T4 DNA-Ligase	Thermo Fisher (Waltham, MA, USA)
NucleoBond® Xtra Midi	Macherey-Nagel (Düren, Deutschland)
NucleoSpin® Gel and PCR Clean Up	Macherey-Nagel (Düren, Deutschland)
Q5® Site-directed Mutagenesis Kit	NEB (Frankfurt (Main), Deutschland)

5.1.4 Primer und Oligonukleotide

Die Oligonukleotide wurden von Biolegio (Nijmegen, Niederlande) als Lyophilisat bezogen und Primer-Stocks angelegt (100 pmol/µl). Tabelle 1 zeigt die in Sequenzierungen oder in der Generierung von PCR-Fragmenten verwendeten Primer.

Tabelle 1: Verwendete Primer und Oligonukleotide.

Bezeichnung	Sequenz	Schnittstelle
A2	CTTCTGATAATAATTTTTGTTCTAATGC	ohne
L1	AAAGGTACCGATTTAACATTGGATGGTATTC	KpnI
L2	GGGGAATTCTTCATTAGATTTACTAGTTAATT GAG	EcoRI
L3	GGGGCTGCAGGCTCAATTAAGTAAATCT AATG	PstI
L3	GCATGGATCCGTAACATCAAGAGCCACC	BamHI
R38	ACATTGGTCATCACATCATCATCATCA TTAAATG	ohne
R39	GAAACTGCTCTAACTCTATCTGGGAATTCT TTTATTTG	ohne
Q27	CGGGAAGCTTGTTTCAACTAGTATAATTTAA ATTTATACC	HindIII
Z55	TAAATTGTCGACTTAACTTCTTCTAAGTGAA AATTCAC	Sall
Z56	CAGGCTAGCATGGATTATAAAGATGAT	NheI
Z61	GATACGCGTCGACGAATTCGCAGGTAAAGC AGGTG	EcoRI/Sall

5.1.5 Bakterien-Stämme, *D. discoideum*-Stämme und Plasmide

Die Transformation von Plasmiden in Bakterien erfolgte in die chemisch kompetenten *Escherichia coli*-Stämme TOP10 oder DH5 α (Thermo Fisher, Waltham, USA). Die verwendeten Plasmide kodieren zur Selektion der transformierten Bakterien zusätzlich zur Blasticidin S/G418-Resistenz eine Ampicillin-Resistenz, die nicht mitaufgeführt ist. Kursiv gedruckte Plasmide und Stämme (Tabelle 2, Seite 74) waren zu Beginn der Arbeit bereits verfügbar. Die folgenden Plasmide wurden nur in Bakterien transformiert oder keine Sporen erzeugt:

<i>pIS76</i>	pA6P GFP
<i>pIS103</i>	pDEX NLS-Cre
<i>pIS1168</i>	pA6P FLAG-BioID2
<i>pIS1236</i>	p15A CP39-BC2H6
<i>pIS1346</i>	BioH6 (GeneArt)

pIS1347	p15A CP39-BioH6
Knock-in-Plasmide	
pIS1286	CDK5RAP2-BC2H6
pIS1300	CDK5RAP2-SpotH6

Wenn nicht explizit erwähnt, kamen in der *Dictyostelium*-Transformation als Ausgangsstamm axenisch wachsende *Dictyostelium* AX2-Zellen ohne Resistenz zum Einsatz. Im Fall von Knock-in-Plasmiden wurde kein zirkuläres Plasmid transformiert, sondern linearisierte DNA (Kapitel 5.2.1).

Tabelle 2: Übersicht der verwendeten *D. discoideum*-Stämme.

Stammname	Plasmid	Produkt	Resistenz
TP36	<i>pIS176</i>	pA6P GFP- α -Tubulin	Blasticidin S
IS550	pIS1321	pA6P FLAG-BioID2	G418
IS586	pIS1382	pA6P FLAG-BioID2	Blasticidin S
IS713	<i>pIS701</i>	Cep192-RNAi	G418
IS754	<i>pIS701</i> in TP36	Cep192-RNAi/ GFP- α -Tubulin	Blasticidin S/ G418
(Knock-in)			
IS420	<i>pIS1133</i>	CP39-GFP	Blasticidin S
IS432	<i>pIS1137</i>	CP55-GFP	Blasticidin S
IS445	<i>pIS1155</i>	Cep192-GFP	Blasticidin S
IS473	<i>pIS1185</i>	CP91-GFP	Blasticidin S
IS491	<i>pIS1187</i>	CP75-GFP	Blasticidin S
IS538	pIS1263	Cep192-BioID2	Blasticidin S
IS539	pIS1285	CP224-BioID2	Blasticidin S
IS546	pIS1265	CP39-BioID2	Blasticidin S
IS549	pIS1251	CDK5RAP2-BioID2	Blasticidin S
IS569	pIS1314	Cep192-SpotH6	Blasticidin S
IS571	pIS1352	Cep192-BioH6	Blasticidin S
IS584	pIS1314	Cep192-SpotH6	keine
IS592	pIS1362 in IS584	Cep192-SpotH6/ CP39-BioH6	Blasticidin S

IS598	pIS1378 in IS584	Cep192-SpotH6/ CP91-BioH6	Blasticidin S
IS604	pIS1361 in IS584	Cep192-SpotH6/ CDK5RAP2-BioH6	Blasticidin S
IS605	<i>pIS1199</i>	CP91-BioID2	Blasticidin S
IS798	pIS1391 in IS584	Cep192-SpotH6/ CP148-BioH6	Blasticidin S

5.1.6 Antikörper und Konjugate

Die verwendeten primären Antikörper wurden in der Immunfluoreszenz in Antikörper-Verdünnungsserum oder in unverdünntem Kulturüberstand eines anderen Antikörpers verdünnt. Für die Inkubation von Nitrocellulose-Membranen im Western Blot wurden die Antikörper in 1%Fischgelatine/TBST verdünnt. Tabelle 3 führt die verwendeten primären Antikörper und ihre Verdünnungen in Western Blot (WB) und Immunfluoreszenz (IF) auf.

Tabelle 3: Übersicht der verwendeten primären Antikörper und Nachweiskonjugate, produzierendes Tier, verwendete Verdünnungen und Herkunft.

Bezeichnung	Produzent	Antigen	Verdünnung	Herkunft
anti-CP39	Hase	CP39	1:2000 (WB)	(Meyer et al., 2017)
anti-CP75	Hase	CP75	1:1000 (WB)	(Meyer et al., 2017)
anti-CP91	Hase	CP91	1:2000/1:200 (WB/IF)	(Putzler et al., 2016)
anti-Cep192	Hase	Cep192	1:2000 (WB)	(Pitzen et al., 2021)
anti-CDK5RAP2	Hase	CDK5RAP2	1:5000 (WB)	(Pitzen et al., 2018)
anti-CP224	Maus/ Hybridom	CP224	1/3 KÜ (WB)/ KÜ (IF)	(Gräf et al., 1999)
anti-CP248	Maus/ Hybridom	CP248	1/3 KÜ (WB)	(Blau-Wasser et al., 2009)
YL1/2	Ratte/ Hybridom	α -Tubulin	KÜ (IF)	(Wehland et al., 1983)
anti-NE81	Hase	NE81	1:500 (IF)	(Krüger et al., 2012)
anti-Sun1	Hase	Sun1	1:2000 (WB)	(Schulz et al., 2009a)

anti-TACC	Hase	TACC	1:2000 (WB)	(Samereier et al., 2011)
anti-FLAG	Maus	FLAG-Tag	1:5000 (WB)	Thermo Fisher, Waltham, MA, USA
anti-His	Maus	His-Tag	1:2000 (WB)	Merck, Darmstadt, Deutschland

In der Immunfluoreszenzmikroskopie kamen gegen Maus-, Ratte- oder Hasen-Antikörper gerichtete, mit AlexaFluor-488 bzw. -568 konjugierte, sekundäre Antikörper (1:1000) von Thermo Fisher (Waltham, MA, USA) zum Einsatz.

Im Western Blot erfolgte der Nachweis der primären Antikörper mit alkalischer Phosphatase gekoppelten sekundären Antikörpern (1:10000) von Merck (Darmstadt, Deutschland). Biotinylierte Proteine wurden über alkalische Phosphatase gekoppeltes Streptavidin (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA) nachgewiesen.

Für die direkte Fluoreszenz-Markierung am BioH6-Tag kam Streptavidin-AlexaFluor-488 (1:1000, Thermo Fisher, Waltham, MA, USA) zum Einsatz. Der SpotH6-Tag wurde über den Spot-Label®-Atto-594/Spot-V_HH (1:1000, Chromotek, Planegg-Martinsried, Deutschland) sichtbar gemacht.

5.1.7 Verwendete Software

ApE – a plasmid Editor

Affinity Photo

AxioVs40 V 4.8.2.0

Jalview

FIJI 2.1.0

Microsoft Office 365/Microsoft Office für Mac

Zen blue/Zen black

Zotero 5.0

5.2 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN

5.2.1 Konstruktion der verwendeten Plasmide

Cep192-RNAi (pIS701)

Der Knockdown von Cep192 basierte auf der RNAi-Strategie von Martens et al. (Martens et al., 2002). Dabei bildet sich durch komplementäre Sequenzen nach der Transkription eine Haarnadelstruktur. Das bereits vorhandene Plasmid enthielt dazu zweimal die ersten 453 bp der den N-Terminus kodierenden Region des Gens *cepH*. Dabei war eine der Sequenzen anti-sense orientiert. Die beiden Sequenzen waren durch ein 200 bp langes mCherry-Fragment voneinander getrennt.

Knock-in-Plasmide (am Beispiel von pIS1285)

Im Rahmen dieser Arbeit wurden mehrere Fusionsproteine mit der Knock-in-Strategie erstellt. Da für CP39, CP91, CP148, Cep192 und CDK5RAP2 bereits Knock-in-Plasmide mit anderen Tags existierten, konnte in den vorhandenen Plasmiden die Tag-Kassette mittels Restriktionsverdau (EcoRI/HindIII) getauscht werden.

Der Knock-in basierte auf homologer Rekombination. Dafür wurden homologe Sequenzbereiche der kodierenden Sequenz des C-Terminus und der 3'-untranslatierten Region (3'-UTR) des Gens mittels PCR amplifiziert. Für das Knock-in-Plasmid pIS1285 wurde auf genomischer DNA von AX2-Zellen mit dem Primerpaar L1/L2 ein 555 bp langes Fragment kodierende Sequenz ohne Stopp-Codon und mit dem Primerpaar L3/L4 ein 584 bp langes Fragment der 3'-UTR des CP224-kodierenden Gens *cepJ* synthetisiert. Über die Primer wurden mit dem Knock-in-Plasmid kompatible Schnittstellen in die amplifizierte Sequenz eingebracht (KpnI/EcoRI und PstI/BamHI), die eine Ligation in den Zielvektor ermöglichten. Ein fertiges Knock-in-Konstrukt ist dann wie in Abbildung 35 zu sehen, aufgebaut: an die kodierende Sequenz schließt sich der gewünschte Tag an, es folgt eine Blasticidin S-Resistenzkassette und der homologe Sequenzbereich zur 3'-UTR. Vor der Transformation in *Dictyostelium*-Zellen wurde das Plasmid über die KpnI/BamHI-Schnittstellen linearisiert. *Dictyostelium* baut bei erfolgreicher Transformation den Bereich zwischen den homologen Sequenzbereichen ins Genom ein, sodass Zellen, die das Fusionsprotein exprimieren über Blasticidin S selektiert werden können.

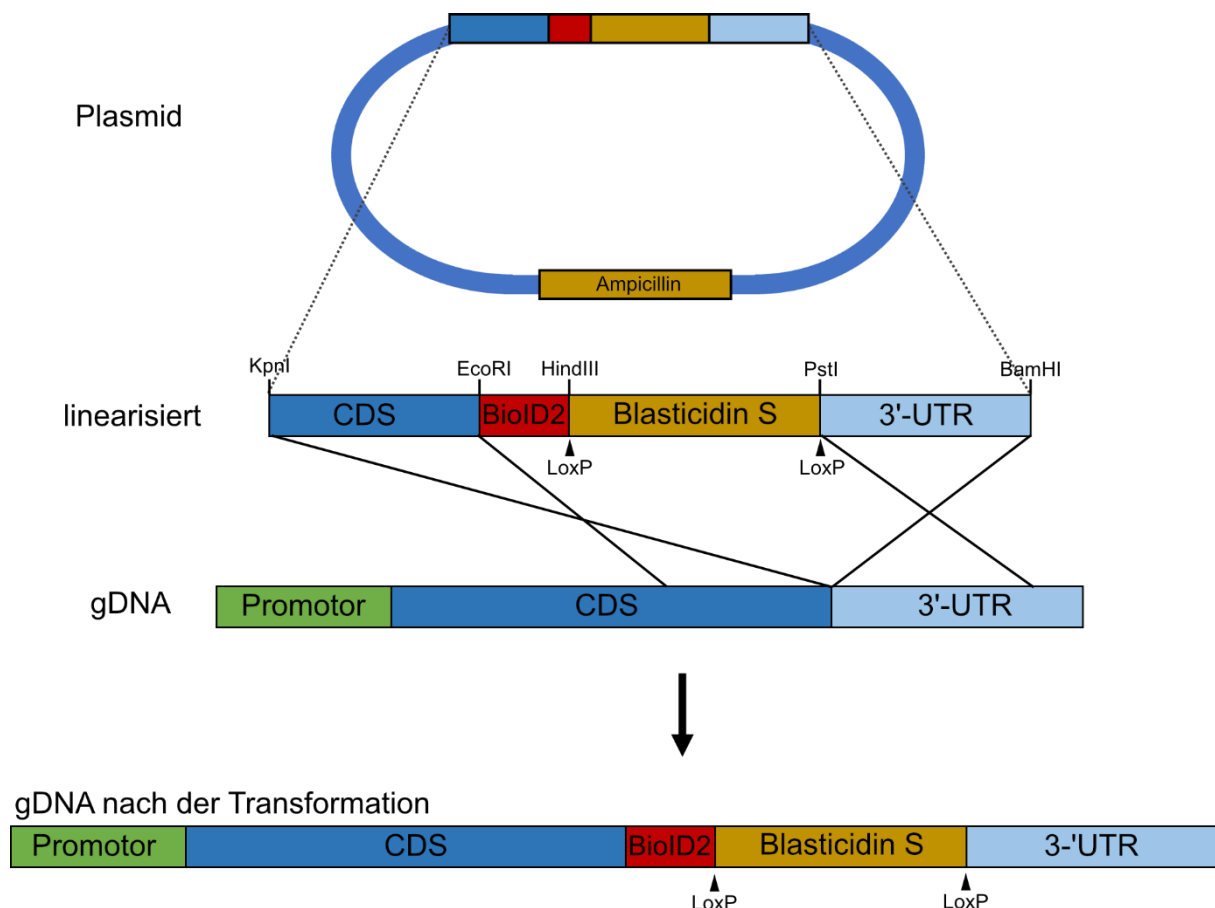


Abbildung 35: Schematischer Ablauf der Knock-in-Strategie. Das Knock-in-Plasmid wird linearisiert und enthält die von der den C-Terminus kodierenden Region (CDS) und der 3'-untranslatierten Region (3'-UTR) flankierte Tag-Sequenz mit Blastidicin S-Resistenzkassette. Die linearisierte DNA wird nach der Transformation über homologe Rekombination in das *Dictyostelium*-Genom eingebaut und führt zu einer Expression des Fusionsproteins unter dem endogenen Promotor. Über die miteingebaute Blastidicin S-Resistenz können die Klone selektiert werden. Die flankierenden LoxP-Sequenzen erlauben eine nachträgliche Entfernung der Resistenz-Kassette.

BioH6-Tag

Aus dem von GeneArt (Thermo Fisher, Waltham, USA) produzierten Plasmid pIS1346 wurde die codonoptimierte BioH6-Tag-Sequenz über NsiI/BamHI in das Plasmid pIS1236 eingebracht. Auf dem resultierenden Plasmid pIS1347 wurde die BioH6-Sequenz mit Terminator über eine PCR mit den Primern Z61/Q27 amplifiziert, dabei mit kompatiblen Enden (EcoRI/HindIII) zum Einbau in Knock-in-Plasmide versehen und anschließend die Tag-Sequenz in den entsprechenden Plasmiden ausgetauscht.

FLAG-BioID2 (pIS1321/pIS1382)

Das Plasmid der BioID2-Kontrolle pIS1321 entstand durch die Ligation des über die Primer Z55/Z56 generierten PCR Fragments mit dem Plasmid pIS1168. Als Template für die PCR diente pIS1168, der Primer Z56 enthielt neben einer NheI-Schnittstelle auch ein Stopp-Codon, welches der BioID2-Sequenz im Plasmid pIS1168

fehlte. Das PCR-Fragment mit Stopp-Codon wurde nach einem NheI/Sall-Restriktionsverdau mit pIS1168 ligiert. Das Plasmid trug eine G418-Resistenz. Mit G418 wird auf Mehrfachinsertion (=höhere Überexpression) selektiert (Nellen et al., 1985).

Das Blasticidin S-basierte Plasmid der BioID2-Kontrolle, pIS1382, wurde über eine Ligation des Inserts aus pIS1321 über NheI/Sall-Restriktionsverdau in den Blasticidin S-Vektor pIS76 erstellt.

5.2.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Für die Amplifikation von DNA-Fragmenten kam die Phusion® High Fidelity Polymerase (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA) zum Einsatz. Es wurden 50 µl-Reaktionsansätze verwendet, die auf Eis wie folgt pipettiert wurden:

5x Phusion High Fidelity Puffer	10 µl
Phusion	0,6 µl
dNTP-Mix (25 mM)	0,4 µl
Forward-Primer (10 µM)	2 µl (400 nM)
Reverse Primer (10 µM)	2 µl (400 nM)
Template-DNA	1 -5 µl (10-250 ng)
H ₂ O	29-34 µl
Gesamt	50 µl

Die anschließende PCR wurde im „peqSTAR96 Universal Gradient“-Thermocycler (VWR Peqlab, Darmstadt, Deutschland) wie folgt durchgeführt:

Initiales Denaturieren	98 °C	2 min	} 35 x
Denaturieren	98 °C	15-20 sec	
Annealing	X °C	20-30 sec	
Elongation	68 °C	Template-abhängig	
Finale Elongation	68 °C	5 min	

Die Annealing-Temperatur wurde mithilfe des „NEB Tm Calculator“ (<https://tmcalculator.neb.com/>) berechnet. Je nach Länge der zu amplifizierenden Sequenz wurde die Zeit für die Elongation eingestellt (30 sec pro kb).

Die PCR-Reaktion wurde nach Ablauf des Programms in der Agarose-Gelelektrophorese weitergehend untersucht.

5.2.3 Q5-Mutagenese

Zur Erzeugung des SpotH6-Tags wurde die vorhandene Sequenz des BC2H6-Tags im Plasmid pIS1286 mit dem „Q5® Site-directed Mutagenesis“-Kit von NEB (Frankfurt (Main), Deutschland) mutiert. Die Sequenz der Primer R38 und R39 wurde über das Online-Tool „NEBasechanger“ (<https://nebasechanger.neb.com>) ermittelt, die Q5®-PCR nach den Herstellerangaben angesetzt und mit den folgenden Einstellungen im peqSTAR96 Universal Gradient“-Thermocycler (VWR peqlab, Darmstadt, Deutschland) durchgeführt:

Initiales Denaturieren	98 °C	30 sec	} 25 x
Denaturieren	98 °C	10 sec	
Annealing	58 °C	20 sec	
Elongation	72 °C	3 min	
Finale Elongation	72 °C	2 min	

Der Erfolg der PCR wurde im Agarose-Gel überprüft und nach der Aufreinigung aus dem Gel das nichtmutierte Template der PCR gemäß den Herstellerangaben entfernt, die Sequenz ligiert und anschließend in DH5α transformiert.

5.2.4 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese erfolgte mit 1%-Agarose, die in 1xTAE-Puffer gelöst war. Die Proben wurden sofern nötig mit 1x Ladepuffer (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA) versetzt und die DNA im Gel in einer mit 1xTAE-Puffer gefüllten Kammer für eine Stunde bei 100V aufgetrennt. Zur Größeneinschätzung kam der 1kb GeneRuler (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA) zum Einsatz. Nach der Elektrophorese wurde das Gel für 15 Minuten in Ethidiumbromid (1 µg/ml in 1x TAE) inkubiert, um die DNA sichtbar zu machen. Die Analyse erfolgte mit dem Intas iX20 Imager (Intas Science Imaging Instruments, Göttingen, Deutschland) oder dem BlueLight-Table (SERVA, Heidelberg, Deutschland)

1x TAE-Puffer

40 mM TRIS, 1 mM EDTA, 0,1% Essigsäure; pH 8,3

5.2.5 DNA-Verdau mit Restriktionsendonukleasen

Zum Erzeugen von DNA-Fragmenten wurden FastDigest®-Restriktionsenzyme (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA) verwendet. Der Ansatz zum Testverdau nach einer Mini-Präparation hatte 15 µl, der zur Erzeugung ligationskompatibler Überhänge 50 µl und der für die Linearisierung eines Knock-in-Plasmids vor der *Dictyostelium*-Transformation 200 µl Volumen.

10x FastDigest®-Puffer	1,5 µl	5 µl	20 µl
Restriktionsenzym 1	0,2 µl	1 µl	1 µl
Restriktionsenzym 2	0,2 µl	1 µl	1 µl
DNA	5 µl (≈5 ng)	5-43 µl (≈5 ng)	50 µl (≈50 ng)
H ₂ O	8,1 µl	0-38 µl	128 µl
Gesamt	15 µl	50 µl	200 µl

Die so erstellten Ansätze wurden für zwei Stunden bei 37°C inkubiert.

5.2.6 Ligation von DNA-Konstrukten

Zur Ligation von DNA-Fragmenten kam die T4 DNA-Ligase (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA) zum Einsatz. Das Insert würde dabei im molaren Überschuss verwendet.

10x Ligase-Puffer	1,5 µl
T4 Ligase	1 µl
DNA (Vektor)	1 µl
DNA (Insert)	6-8 µl
H ₂ O	3,5-5,5 µl
Gesamt	15 µl

Der Reaktionsansatz wurde anschließend mindestens drei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert und dann in Bakterien transformiert.

5.2.7 Aufreinigung von DNA-Fragmenten

Die Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Verdauen, Agarose-Gelen und PCR-Reaktionen erfolgte mit dem NucleoSpin® Gel and PCR Clean Up-Kit (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) gemäß den Herstellerangaben. Die Elution erfolgte in 15-30 µl H₂O in 1,5ml-Reaktionsgefäße. Wo notwendig, wurde die Konzentration der eluierten DNA photometrisch bestimmt.

5.2.8 Sequenzierungen und DNA-Synthesen

Zur Überprüfung von DNA-Sequenzen wurden Proben gemäß den Konzentrationsangaben der Sequenzierungsdienstleister an LGC Genomics (Berlin, Deutschland) und Eurofins Genomics (Ebersberg, Deutschland) verschickt. Dabei kamen die im Labor vorhandenen Primer (A3 und Q27) oder Standardprimer von den Dienstleistern zum Einsatz.

5.2.9 Transformation chemisch kompetenter Zellen

Die Transformation in *E. coli* erfolgte in die chemisch kompetenten TOP10- oder DH5α-Zellen. 50-100 µl kompetente Zellen wurden 10 Minuten auf Eis aufgetaut und anschließend der 15µl-Ligationsansatz oder 0,5 µl einer Mini-Plasmidpräparation zugegeben. Nach 30 Minuten erfolgte der Hitzeschock bei 42°C für 90 Sekunden im Thermoblock. Nach dem Hitzeschock wurden die Zellen für zwei Minuten auf Eis abgekühlt und als Verdünnungsausstrich auf einer Ampicillin-haltige LB-Agar-Platte ausgebracht. Die Inkubation der Platte erfolgte für 16 Stunden über Nacht bei 37°C oder bei Raumtemperatur über wenige Tage. Die gewachsenen Einzelklone wurden dann in einer Übernachtskultur (ÜNK) vermehrt und die Plasmid-DNA näher untersucht.

5.2.10 Konservierung von Bakterien

Trug eine Bakterienkultur ein zu sicherndes Plasmid, wurde die entsprechende Mini-Präparation und die Bakterienkultur gesichert. Dazu wurde 1 ml Bakteriensuspension einer ÜNK mit 1 ml Einfriermedium versetzt und gut gemischt. Die Langzeitlagerung der DNA und der Bakterien-Glycerol-Stocks erfolgte bei -80°C.

Einfriermedium

1:1-Mischung aus LB-Medium und Glycerin

5.2.11 Plasmidpräparation aus einer Übernachtskultur

Zur Plasmidpräparation aus *E. coli* wurden Übernachtskulturen der plasmidtragenden Bakterienstämme angesetzt. Je nach benötigter DNA-Menge wurden 3-10 ml (Mini-Präparation) oder 100 ml (Midi-Präparation) Ampicillin-haltiges LB-Medium mit Bakterien aus Glycerol-Stocks oder Einzelklonen von einer LB-Platte angeimpft. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 37°C und 220 rpm.

Bei der Mini-Präparation wurden 1,5 ml-Reaktionsgefäße mit der dicht gewachsenen Bakteriensuspension befüllt und zwei Minuten bei 9000 x g (Biofuge pico, Heraeus, Hanau, Deutschland) pelletiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet mit 220 µl S1-Puffer versetzt. Durch vortexen wurde das Pellet gelöst und der Suspension anschließend 220 µl S2-Puffer zugesetzt. Die Proben wurden mehrfach invertiert, mit Puffer S3 versetzt und wieder durch Invertieren vermischt. Die anschließende Zentrifugation bei 13000 x g für 10 Minuten pelletierte das weiße Präzipitat und der Überstand mit der Plasmid-DNA wurde in vorbereitete 1,5ml-Reaktionsgefäße mit 600 µl Isopropanol gegeben. Nach erneutem Invertieren wurde wieder bei 13000 x g zentrifugiert, dann das Isopropanol vorsichtig abgesaugt und das Pellet mit 70% Ethanol versetzt. Im letzten Schritt wurde nochmals fünf Minuten mit 13000 x g zentrifugiert, das Ethanol abgenommen und kurz abgewartet, damit verbliebenes Ethanol evaporieren konnte. Das Plasmid-Pellet wurde in 50 µl Tris (10 mM) aufgenommen und für dreißig Minuten bei 37 °C bei 1000 rpm im Thermo-Block in Lösung gebracht.

Die Midipräparation erfolgte gemäß den Herstellerangaben mit dem NucleoBond® Xtra Midi (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland). Das Pellet wurde hier in 100 µl Tris (10 mM) gelöst und die Konzentration photometrisch bestimmt.

5.2.12 Transformation von *D. discoideum*-Zellen

Die Transformation von DNA in *Dictyostelium* erfolgte über Elektroporation. Die zur Transformation verwendeten Zellen wurden in 25 ml HL5c-Medium in T75-Zellkulturflaschen bis zu einer Dichte von $2 \cdot 10^6$ Zellen/ml kultiviert. Vor der Transformation wurden die Zellen im Medium resuspendiert und die Suspension für 20 Minuten auf Eis abgekühlt. Die Zellen wurden durch eine fünfminütige

Zentrifugation bei 1350 rpm in einer gekühlten Zentrifuge (Heraeus Multifuge 1 S-R) pelletiert und zweimal mit 20 ml Phosphatpuffer gewaschen sowie erneut zentrifugiert. Nach dem Waschen mit Phosphatpuffer erfolgte ein weiterer Waschschrift mit 10 ml Elektroporationspuffer und Zentrifugation. Danach wurde das Zellpellet in 700 µl Elektroporationspuffer gelöst und das Plasmid beziehungsweise die linearisierte DNA zugegeben (30-50 µg). Die Suspension wurde in die vorgekühlte 4mm-Elektroporations-Küvette (VWR peqlab, Darmstadt, Deutschland) überführt und die Elektroporation mit dem „GenePulser® II“ (Bio-Rad, Feldkirchen, Deutschland) bei 3 µF, 1,1 kV und 1000 Ω (Plasmide) beziehungsweise 200 Ω (Knock-ins) durchgeführt. Nach 10 Minuten bei Raumtemperatur wurde die Zellsuspension in 1,5ml-Reaktionsgefäße überführt, mit 7 µl CaCl₂/MgCl₂ (Endkonzentration= 100 mM) versetzt und für 15 Minuten sanft bei Raumtemperatur im Überkopf-Rotator vermischt.

Handelte es sich bei der transformierten DNA-Sequenz um ein Konstrukt mit Blasticidin S-Resistenzkassette, wurde die Suspension zu 25 ml HL5c-Medium, das mit 1x PenStrep versetzt war, gegeben. Das Medium wurde anschließend in einer 24-Well-Platte verteilt und 24 Stunden ohne Selektionsmedium inkubiert. Danach erfolgte die Selektion der Transformanten durch Zugabe von 2x Blasticidin S (8 µg/ml).

Bei einer G418-Resistenz hingegen wurden die 25 ml in einer T75-Zellkulturflasche 24 Stunden inkubiert und eine *Klebsiella aerogenes*-Kultur auf einer SM-Agar-Platte angezüchtet. Nach 24 Stunden wurde die erhaltene Bakterienkultur von der Platte in 5 ml Phosphatpuffer mit PenStrep und G418 (10µg/ml) aufgenommen. Die transformierten *Dictyostelium*-Zellen wurden resuspendiert und für 5 Minuten bei 1350 rpm abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 2,5 ml Bakteriensuspension gelöst und je 500 µl auf insgesamt 5 Phosphat-Agarplatten (mit 10µg/ml G418) verteilt. Im Verlauf einiger Wochen bildeten sich Fraßplaques im Bakterienrasen, die dann in Flüssigkultur überführt wurden. Die Validierung der erfolgreichen Transformation erfolgte über Immunfluoreszenzmikroskopie und Western Blot.

Elektroporationspuffer

50 mM Saccharose, 10 mM KH₂PO₄; pH 6,1

5.2.13 Entfernung der Blastocidin-Resistenz mittels Cre-Rekombinase

Die Blastocidin S-Resistenzkassette in den Knock-in-Plasmiden war flankiert von LoxP-Sequenzen (Abbildung 35). Diese konnten genutzt werden, um im Cep192-SpotH6-exprimierenden Stamm über die transiente Expression der Cre-Rekombinase in den Zellen die Blastocidin S-Resistenz zu entfernen (Faix et al., 2004): Das Plasmid pIS103, das die Cre-Rekombinase kodiert, wurde in die Zellen transformiert und die Zellen in 25 ml HL5c-Medium (+1x PenStrep) in T75-Zellkulturflasche überführt. Am folgenden Tag wurde zur Selektion G418 (10 µg/ml) zugegeben und die Zellen drei Tage damit inkubiert. Anschließend wurde das G418-haltige Medium rückstandsfrei entfernt und wieder durch HL5c (+1x PenStrep) ersetzt. Es wurde einige Tage gewartet, bis größere Einzelkolonien zu erkennen waren. Die Zellen wurden im Medium resuspendiert und ein Verdünnungsausstrich durchgeführt: Dazu wurden die Zellen pelletiert und in etwas Phosphatpuffer aufgenommen. Je 500 µl einer *K. aerogenes*-Kultur wurde auf fünf SM-Agar-Platten (ohne Antibiotika) verteilt und auf die erste Platte die *Dictyostelium*-Zellsuspension gegeben und wiederum verteilt. Auf den weiteren vier Platten kam derselbe Spatel zum Einsatz.

Auf zwei SM-Agar-Platten wurden *K. aerogenes* angezogen (37°C, über Nacht). Für die Überprüfung der Entfernung der Blastocidin S-Resistenz wurden zwei Replika-Platten hergestellt: Der *K. aerogenes*-Zellrasen einer SM-Platte wurde in 500 µl 1x Phosphatpuffer resuspendiert und mit 150 µl Blastocidin S (Stockkonzentration= 8mg/ml) versetzt. Es wurde eine Phosphat-Agarplatte mit 40 µg/ml Blastocidin S hergestellt und die Bakteriensuspension darauf verteilt. Die zweite SM-Platte (ohne Antibiotikum) mit *K. aerogenes* wurde direkt verwendet. Die auf den Verdünnungsplatten auftretenden Einzelklone wurden dann mit einem Zahnstocher in ein vorbereitetes, identisch nummeriertes Raster auf beide Platten überführt und einige Tage bei Raumtemperatur inkubiert. Interessant waren jene Klone, die auf der SM-Agarplatte wuchsen, aber nicht mehr auf der Blastocidin S-haltigen Phosphat-Agarplatte. Diese Klone wurden in Flüssigkultur überführt und in G418/Blastocidin S-freiem, G418-haltigem und Blastocidin S-haltigem HL5c-Medium (mit 1x PenStrep) erneut untersucht. Die Zellen, die sowohl keine G418-Resistenz als auch keine Blastocidin S-Resistenz mehr aufwiesen, wurden anschließend gesichert und waren die Basis für die Erstellung von Doppelmutanten.

5.3 BIOCHEMISCHE METHODEN

5.3.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur elektrophoretischen Auftrennung von Proteinen wurden diskontinuierliche 8 oder 10% SDS-Polyacrylamid-Gele mit dem Mini-Protean®-System (Bio-Rad, Feldkirchen, Deutschland) hergestellt.

	8%	10%	Sammelgel
Acrylamid/bis-			
Acrylamid (37,5:1)	2 ml	2,5 ml	0,5 ml
Lösung B	2,5 ml	2,5 ml	-
Lösung C	-	-	1,25 ml
H ₂ O	5,5 ml	5 ml	3,25 ml
TEMED	7 µl	7 µl	5 µl
10% APS	33 µl	33 µl	25 µl

Die verwendeten Proben wurden mit LöA-Puffer versetzt, gelöst und drei Minuten bei 70°C auf dem Thermoblock inkubiert. Je nach Taschengröße und gelöster Proteinmenge wurde das eingesetzte Volumen in den Taschen variiert. Als Größenstandard wurde der „PageRuler™ prestained plus“ oder der „PageRuler™ prestained“ von Thermo Fisher (Waltham, MA, USA) verwendet. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte mit dem „Mini-PROTEAN® Tetra Cell“-System von Bio-Rad (Feldkirchen, Deutschland) bei 100 V für ca. 45 Minuten.

Lösung B

1,5 M TRIS, 0,4% SDS; pH 8,7

Lösung C

500 mM TRIS, 0,4% SDS; pH 6,8

LöA-Puffer

9 M Harnstoff, 10% SDS, 5% β-Mercaptoethanol, 0,2% Bromphenolblau

5.3.2 Herstellung von *Dictyostelium*-Gesamtextrakten

Zur Herstellung von Gesamtextrakten aus einer *D. discoideum*-Kultur wurden 3 - 5*10⁶ Zellen bei 1350 rpm abzentrifugiert, der Überstand verworfen, das Pellet in 15 µl LöA-Puffer gelöst und wie in Kapitel 5.3.1 beschrieben behandelt.

5.3.3 Western Blot

Die Western Blots wurden semi-trocken mit dem „Trans-Blot® Turbo Transfer“-System von Bio-Rad (Feldkirchen, Deutschland) durchgeführt. Für den Western Blot wurde das Sammelgel vom SDS-PA-Gel abgetrennt und gemeinsam mit der Nitrocellulose-Membran (Roti®-NC, 0,2 µm, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) und acht Whatman®-Filterpapieren (1 CHR, 0,18 mm, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) kurz in Blot-Puffer inkubiert und dann in der Elektrophorese-Kammer wie folgt geschichtet: 4x Filterpapier, Blot-Membran, SDS-PA-Gel, 4x Filterpapier. Das Blotten erfolgte bei 1,3A und 25V für 18 Minuten.

Nach dem Blot wurden mit Ponceau-Lösung die Proteine auf der Membran angefärbt und wenn notwendig die Blot-Membran in Streifen geschnitten, um mehrere Nachweise mit unterschiedlichen Antikörpern durchführen zu können.

Die Blockierung der Membran wurde in 3% Fischgelatine in 1x TBST für eine Stunde durchgeführt. Der primäre Antikörper wurde verdünnt appliziert (Kapitel 5.1.6) und für mindestens eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Waschschritten (dreimal drei Minuten mit 1x TBST) wurde der sekundäre alkalische Phosphatasegekoppelte Antikörper zugegeben und mindestens eine Stunde inkubiert. Nach drei weiteren Waschschritten mit TBST und einem abschließenden mit 1x TBS wurde die Entwicklerlösung hergestellt. Dazu wurden 35 µl BCIP- und 45 µl NBT-Lösung zu 10 ml Reaktionspuffer gegeben und die gewaschene Membran für maximal 10 Minuten im Dunkeln entwickelt. Die Reaktion wurde in H₂O gestoppt und das Ergebnis mit einem Flachbett-Scanner dokumentiert.

Blot-Puffer

300 mM Glycin, 300 mM TRIS

Ponceau S-Lösung

0,1 % Ponceau S, 5% Essigsäure

TBST-Puffer

20 mM TRIS, 150 mM NaCl, 0,05% Tween-20; pH 7,4

TBS-Puffer

20 mM TRIS, 150 mM NaCl; pH 7,2

Reaktionspuffer

100 mM TRIS, 100 mM NaCl, 50 mM MgCl₂; pH 9,5

BCIP (5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat-toluidinsalz)

50 mg/ml in 100% Dimethylformamid

NBT (Nitroblautretazoliumchlorid)

75 mg/ml in 70% Dimethylformamid

5.3.4 Isolation von *D. discoideum*-Centrosomen

Die Isolation von Centrosomen basierte auf dem Protokoll von Schulz et al. (Schulz et al., 2006). Es wurde eine Schüttelkultur (200ml HL5c) mit den Zellen einer dicht gewachsenen T25-Zellkulturflasche angeimpft und bei BioID2-Analysen 2 µM Biotin zugegeben. Die Inkubation erfolgte bei 120 rpm auf einem Rotationsschüttler für circa 5-7 Tage bei Raumtemperatur. Die Schritte der Centrosomenpräparation wurden alle auf Eis, mit frisch angesetzten, kalten Puffern und mit auf 4°C gekühlten Zentrifugen durchgeführt. Dicht gewachsene Schüttelkulturen ($\approx 7-9 \cdot 10^6$ Zellen/ml) wurden in 50ml-Reaktionsgefäße überführt und bei 1350 rpm (Hettich ROTANTA 460R/Hettich-5624) für fünf Minuten pelletiert. Der Überstand wurde verworfen, zweimal mit kaltem Phosphatpuffer gewaschen und über Zentrifugation pelletiert. In einem dritten Waschschrift war der Phosphatpuffer mit 2 µM Cytochalasin A zur Inhibierung der Aktinpolymerisation versetzt. Es folgte die mechanische Lyse der Zellen: Dazu wurde das Zellpellet in 10 ml Lysepuffer aufgenommen und die Suspension mittels einer Spritze durch einen 5 µm-Nuclepore-Filter gedrückt, um die Zellen aufzuschließen. Bei der anschließenden Zentrifugation, bei 4000 rpm für 10 Minuten, wurden die Kerne und die damit assoziierten Centrosomen pelletiert. Nach der Entfernung des Überstands wurde das Kernpellet in 10 ml Pyrophosphatpuffer aufgenommen und für eine Minute gevortext. Nach erneutem Zentrifugieren bei 4000 rpm erhielt man den Centrosomen enthaltenden Überstand, der vorsichtig in ein frisches 50ml-Reaktionsgefäß überführt und mit Heparin (200µg/ml) versetzt, für fünf Minuten inkubiert wurde. Vor der Beladung des Saccharose-Dichtegradienten wurde die Suspension erneut durch einen 5 µm-Nuclepore-Filter geschickt und anschließend auf eine 50%-Saccharose-Lösung in einem Zentrifugenröhrchen des Beckman SW-40

Rotors geschichtet. Die Zentrifugation erfolgte für eine Stunde bei 21000 rpm (Beckman Coulter Optima L-100K).

Nach der Zentrifugation befanden sich die Centrosomen im Pellet. Die Flüssigkeit und die 50%-30%-Zone des Gradienten wurden vorsichtig abgesaugt, das Pellet in 1 ml Gradientenpuffer aufgenommen und in ein 1,5ml-Reaktionsgefäß überführt. Nach einer kurzen Zentrifugation bei 14000 rpm (Micro Star 17R, VWR, Darmstadt, Deutschland) wurde das Pellet in 200 µl LöA-Puffer durch Auf- und Abpipettieren gelöst und, wie in Kapitel 5.3.1 beschrieben, behandelt.

Lysepuffer

100 mM Na-PIPES (pH 6,9), 2 mM MgCl₂, 10% Saccharose, 1x PC, 2 µM Cytochalasin A, 1mM ATP

Pyrophosphatpuffer

100 mM Na-PIPES (pH 6,9), 2 mM MgCl₂, 30% Saccharose, 40 mM tetra-Natrumdiphosphat, 1% Triton X-100, 1x PC, 2 µM Cytochalasin A, 1 mM ATP

Protease-Inhibitor-Cocktail (PC, 1x)

1 mM Pefabloc SC, 25 µg/ml Leupeptin, 10 µg/ml Tosyl-Arginin-Methylester, 10 µg/ml Sojabohnen-Trypsininhibitor, 1 µg/ml Aprotinin, 1 µg/ml Pepstatin, 2 mM Benzamidin, 1 mM ATP

Gradientenpuffer

10 mM Na-PIPES (pH 6,9), 2 mM MgCl₂

5.4 ZELLBIOLOGISCHE METHODEN

5.4.1 Kultivierung und Konservierung von *D. discoideum*-Stämmen

Dictyostelium-Zellen wurden adhärent mit HL5c-Flüssigmedium in T25-Zellkulturflaschen bei Raumtemperatur für maximal vier Wochen kultiviert. Bei Zellen mit einer Resistenz-Kassette wurde Blastocidin S oder G418 zugefügt. Das HL5c-Medium wurde mit Sporen angeimpft. Erreichten die Zellen die stationäre Wachstumsphase, wurden sie im Medium durch Abklopfen resuspendiert, das Medium verworfen und durch frisches Medium ersetzt.

Um transformierte *Dictyostelium*-Stämme zu sichern, wurden Sporen erstellt: dazu wurden die Zellen pelletiert (1350 rpm, 5 min) und zweimal mit Phosphat-Puffer gewaschen. Anschließend wurden sie auf eine Dichte von $2-3 \cdot 10^8$ Zellen/ml eingestellt und 500 µl der Suspension auf Phosphat-Agarplatten ausgebracht, getrocknet und bei Raumtemperatur gelagert. Nach zwei bis drei Tagen hatten sich Sporen gebildet, die in 1 ml Phosphatpuffer aufgenommen und bei -80°C gelagert wurden.

Zur direkten Sicherung wurden Klone auch unmittelbar eingefroren: dazu wurden 900 µl einer dicht gewachsenen Kultur mit 100 µl Pferdeserum und 100 µl DMSO gemischt und anschließend schrittweise eingefroren (2 h bei -20°C , 5 h bei -80°C). Die Langzeitlagerung dieser Zellen erfolgte in flüssigem Stickstoff.

5.4.2 Fixierung von *D. discoideum*-Zellen

Im Laufe dieser Arbeit wurden die Zellen hauptsächlich methanol- und glutaraldehyfixiert. Dicht gewachsene Zellen wurden zur Fixierung im Medium resuspendiert, 1 ml Zellsuspension auf ein Deckglaschen (Typ #1, 0,13-0,16 mm, Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig, Deutschland) gegeben und mindestens 15 Minuten das Absetzen der Zellen abgewartet. Anschließend wurde der Überstand abgesaugt und die Fixierung durchgeführt.

Bei der Methanolfixierung wurde vorsichtig eiskaltes Methanol (-20°C) auf das Deckglaschen appliziert und für drei Minuten bei -20°C inkubiert. Das Methanol wurde entfernt und das Deckglaschen zweimal mit 1x PBS gewaschen.

Bei der Glutaraldehydfixierung wurde das Fixans frisch hergestellt (0,5% Glutaraldehyd, 0,5% Triton X-100 in 1x PHEM-Puffer), vorsichtig auf das Deckglaschen gegeben und für fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde das Deckglaschen zweimal für je fünf Minuten mit 1x Phosphat-

Puffer gewaschen und daraufhin mit 1 mg/ml Borhydrid-Lösung (in 1x Phosphatpuffer) für 10 Minuten inkubiert. Abschließend wurde erneut mit 1x Phosphatpuffer (2x 5 min) und einmal mit 1x PBS gewaschen.

2x PHEM

600 mM Na-PIPES, 25 mM HEPES, 10 mM EGTA, 2 mM MgCl₂

5.4.3 Immunfluoreszenz-Färbung von fixierten *D. discoideum*-Zellen

Proteine in den fixierten Zellen wurden mit unterschiedlichen primären Antikörpern angefärbt. Kulturüberstände wurden unverdünnt eingesetzt und aufgereinigte Antikörper darin verdünnt (Kapitel 5.1.6). Wurde kein Kulturüberstand eingesetzt erfolgte die Verdünnung des primären Antikörpers in Antikörper-Verdünnungspuffer.

Je nach Anwendung wurde der Antikörper in einer feuchten Kammer für mindestens eine Stunde auf dem Deckgläschen inkubiert. Antikörper, die gegen Core-Strukturproteine gerichtet waren, wurden mindestens drei Stunden lang inkubiert. Vor der Markierung des primären Antikörpers mit fluoreszenzmarkiertem, sekundärem Antikörper wurde das Deckgläschen dreimal drei Minuten mit 1x PBS gewaschen. Der sekundäre Antikörper wurde in 1x PBS verdünnt und mindestens eine Stunde auf dem Deckgläschen belassen. Nach erneuten Waschsritten mit 1x PBS wurde DAPI (1mg/ml in 1x PBS) oder Hoechst-33342 (2µg/ml in 1 x PBS) zur DNA-Färbung für 15 Minuten auf das Deckgläschen gegeben. Anschließend wurde erneut gewaschen und das Deckgläschen auf einem Objektträger (Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig, Deutschland) mit Mowiol eingebettet und über Nacht dunkel lagernd ausgehärtet.

Antikörper-Verdünnungspuffer

0,1% BSA, 0,1% Natriumazid in 1 PBS

Mowiol

6 g Glycerin, 2,4 g Mowiol 4-88, 6 ml H₂O, 12 ml PBS

5.5 MIKROSKOPIE

5.5.1 Expansion Microscopy

Die in dieser Arbeit durchgeführte Expansion Microscopy basiert auf bereits publizierten Protokollen (Chozinski et al., 2016; Tillberg et al., 2016). Die Zellen wurden, wie im Kapitel 5.4.2 beschrieben, auf zwei Deckgläschen methanolfixiert. Bei der Expansion Microscopy wurden die eingesetzten Antikörper und Nachweiskonjugate, abweichend von der Verdünnung in Kapitel 5.1.6, doppelt konzentriert eingesetzt und die direkte Markierung mit sekundärem Antikörper beziehungsweise über Streptavidin-AlexaFluor-488 oder Spot-V_HH über Nacht bei 4°C durchgeführt. Ein Deckgläschen diente später als identisch markierte, nicht-expandierte Kontrolle. Das zweite Deckgläschen wurde mit 0,25% Glutaraldehyd in 1x PBS für 10 Minuten postfixiert und so auf die Einlagerung in die Gelmatrix vorbereitet. Nach drei dreiminütigen Waschschritten mit 1x PBS wurde das Deckgläschen in die Gelierkammer überführt und zur Lagerung mit Monomerlösung überschichtet. Bei der Gelierkammer handelte es sich um eine Eigenkonstruktion mit zwei dickeren, rechteckigen Deckgläsern die als Spacer fungieren und auf einen Objektträger so angebracht wurden, dass zwischen sie ein rundes Deckglas passte.

In einem 1,5ml-Reaktionsgefäß wurden auf Eis 188 µl Monomerlösung mit 4 µl H₂O, 4 µl 10% APS und 4 µl 10% TEMED gemischt, die Monomerlösung vom Deckgläschen abgesaugt und der Gelansatz darauf pipettiert. Mit einem weiteren Deckgläschen wurde die Gelierkammer verschlossen und das Gel bei 37°C für eine Stunde auspolymerisiert. Nachdem das Gel fest war, wurde es auf dem Deckgläschen in Form eines Trapezes zugeschnitten, um nach dem Quellprozess die Orientierung erkennen zu können. Alle vier Seiten wurden mit einer Millimeter-Skala vermessen, um den Fehler bei der Messung zu minimieren. Anschließend wurde das zugeschnittene Gel auf dem Deckgläschen in eine 4-Well-Platte überführt und für anderthalb Stunden in 500 µl Verdaupuffer mit Proteinase K (8 U/ml) bei 37°C inkubiert.

Nach dem proteolytischen Verdau wurde das Gel in einer Petrischale in H₂O für anderthalb Stunden expandiert. Dabei wurde nach jeweils 30 Minuten vorsichtig das Wasser gewechselt. Es folgte eine zwanzigminütige Inkubation des gequollenen Gels in Hoechst-33342 (in H₂O) zur DNA-Färbung und zwei kurze Waschschrritte mit H₂O. Vor der Fixierung des Gels auf einem Deckglas zur Mikroskopie wurden wieder die

vier Seiten erneut gemessen, um näherungsweise den Expansionsfaktor zu bestimmen. Das Gel wurde auf eine auf das Deckgläschen passende Größe zugeschnitten und so auf ein mit Poly-L-Lysin beschichtetes Deckgläschen (24x60 mm, High Precision No. 1.5H, 170 ± 5 μm , Carl Roth, Braunschweig, Deutschland) überführt, dass die Seite des Gels, auf der die Zellen eingelagert wurden nach unten orientiert war. Das Gel wurde vorsichtig etwas trocken getupft und mit dem Duplier-Silikon Twinsil® (picodent GmbH, Wipperfürth, Deutschland) umrandet. Der luftdichte Verschluss erfolgte durch Auflegen eines weiteren Deckgläschen auf das aushärtende Twinsil®. Bei 4° C konnten die Proben so zwei bis drei Tage gelagert werden.

Bei der Ultrastructural Expansion Microscopy wurde abweichend zum publizierten Protokoll (Gambarotto et al., 2019; Le Guennec et al., 2020) mit derselben Monomerlösung wie in der Expansion Microscopy gearbeitet. Die Zellen wurden für drei Stunden bei 37°C in 1,4% Formaldehyd/2%Acrylamid in 1x PBS fixiert und anschließend unmarkiert wie beschrieben in die Gelmatrix eingelagert. Nach dem Zuschnitt und der Messung der Kantenlängen wurde das Gel 15 Minuten bei Raumtemperatur und anschließend für 90 Minuten bei 95° C in Denaturierungspuffer im Thermo-Block inkubiert und dann in H₂O expandiert. Nach der Expansion wurde das Gel mittels drei zehnminütiger Waschschriffe in 1x PBS für die Antikörper-Färbung vorbereitet. Das in 1x PBS wieder leicht geschrumpfte Gel wurde zur Antikörperfärbung in eine feuchte Kammer überführt und in primärem Antikörper für zwei Stunden inkubiert. Anschließend wurde das Gel mit 1x PBST dreimal gewaschen und dann mit dem fluoreszenzmarkierte Streptavidin bzw. den sekundären Antikörpern in der feuchten Kammer über Nacht bei 4°C inkubiert. Am Folgetag wurde das Gel dreimal mit 1x PBST gewaschen und in H₂O ein zweites Mal expandiert.

Monomerlösung

2,5% Acrylamid, 0,15% N,N'-Methylenbisacrylamid, 8,625% Natriumacrylat (w/w), 2 M NaCl in 1x PBS (nach Zugabe von TEMED und PBS, im Stock alles 1,06x)

Verdau-Puffer

50 mM TRIS pH 8,0, 1 mM EDTA, 0,5% Triton X-100, 0,8 M Guanidin-HCl

Denaturierungspuffer

200 mM SDS, 200 mM NaCl, 50 mM TRIS

1x PBST

70 mM Na₂HPO₄, 30 mM KH₂PO₄, 0,1% Tween-20; pH 6

5.5.2 Fluoreszenzmikroskopie und Bildprozessierung

Zur Immunfluoreszenzmikroskopie kam ein AxioObserver-System mit LED-Lichtquelle (Colibri7), Plan-Apochromat 100x/1.4 beziehungsweise Plan-Neofluar 40x/1.3-Ölimmersionobjektive und AxioCam506 mono zur Bildaufnahme (Carl Zeiss Mikroskopie GmbH, Jena, Deutschland) zum Einsatz. Der Abstand zwischen den Z-Stapeln betrug in der Regel 0,25 μm . Die aufgenommenen, nicht-expandierten Bilder wurden mittels eigener, gemessener PSF in der „Zen blue“-Software dekonvolviert (Adjustable Deconvolution). Die expandierten Proben am AxioObserver-System wurden mit dem LCI-Plan-Neofluar 63x/1.3 Wasserimmersions-Objektiv aufgenommen und auf die theoretische Dekonvolution zurückgegriffen.

Bei den expandierten Proben kam zusätzlich ein LSM880-System mit Airyscan-Detektor und Plan-Apochromat 40x/1.2 Wasserimmersions-Objektiv (Carl Zeiss Mikroskopie GmbH, Jena, Deutschland) zum Einsatz. Die gezeigten Bilder sind in der „Zen black“-Software Airyscan-prozessiert.

Zur Darstellung in der Arbeit wurde im Bildbearbeitungsprogramm FIJI eine Z-Projektion mit der Einstellung „Maximum Intensity“ durchgeführt. Bei Bildern expandierter Zellen wurde zudem über „Set scale“ der Expansionsfaktor bei der Erstellung des Größenstandards im Bild miteinbezogen.

5.5.3 Lebendzellaufnahmen von *Dictyostelium*

Lebendzellaufnahmen von *Dictyostelium* wurden an einem CellObserver-System (Zeiss Mikroskopie GmbH, Jena, Deutschland) mit CSU-X1-Spinning-Disk-Modul (Yokogawa, Ratingen, Deutschland) und einem LCI Plan-Neofluar 63x/1.3 Wasserimmersionsobjektiv durchgeführt. Zur Bildaufnahme kam eine Evolve EM-CCD (Photometrics, Tucson, AZ, USA) zum Einsatz.

Die Zellen wurden zur Aufnahme in Glasbodenschälchen (FluoroDish™, WPI, Friedberg, Deutschland) überführt und nach dem Absetzen, das HL5c-Medium gegen LoFlo-Medium getauscht, das mit 2 mg/ml Ascorbinsäure versetzt wurde. Nach einem erneuten Medienwechsel wurde teilweise die Agar-Overlay-Technik angewendet (Fukui et al., 1987): Ein dünnes 2%-Agarose-Gelstück wurde über die Zellen gelegt und das Abflachen der Zellen 15-20 Minuten abgewartet. Danach wurden sowohl das Hellfeld als auch das GFP-Signal alle 10 Sekunden aufgenommen (250 Frames \approx 40 Minuten). Der Abstand zwischen den 6 bis 8 aufgenommenen Z-Ebenen betrug 1 μm . Anschließend wurde eine Z-Projektion in der AxioVs40-Software durchgeführt.

5.5.4 Elektronenmikroskopie

Für die Elektronenmikroskopie wurden die Zellen mit 1% Glutaraldehyd/0,5% Triton X-100 in 1x PHEM-Puffer für 30 Minuten auf Deckgläschen fixiert und anschließend dreimal für fünf Minuten mit 50 mM Natrium-Cacodylat-Puffer (pH 7,4) gewaschen. Die Proben wurden mit 1% OsO₄ (in 50 mM Natrium-Cacodylat-Puffer; pH 7,4) für 30 Minuten inkubiert. Daraufhin wurden die Proben in einer Ethanol-Serie und in Aceton dehydriert und in „Agar Low Viscosity“-Medium (Plano GmbH, Wetzlar, Deutschland) eingebettet. Die angefertigten Ultradünnschnitte (80-90 nm) wurden mit Uranylacetat und Bleicitrat kontrastiert und in einem Talos F200C TEM (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA) bei 200 keV analysiert.

LITERATURVERZEICHNIS

- Abbe, E., 1873. Beiträge zur Theorie des Mikroskops und der mikroskopischen Wahrnehmung. Arch. Für Mikrosk. Anat. 9, 413–468.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J., 1990. Basic Local Alignment Search Tool. J. Mol. Biol. 215, 403–410.
- Annesley, S.J., Chen, S., Francione, L.M., Sanislav, O., Chavan, A.J., Farah, C., De Piazza, S.W., Storey, C.L., Ilievska, J., Fernando, S.G., Smith, P.K., Lay, S.T., Fisher, P.R., 2014. *Dictyostelium*, a microbial model for brain disease. Biochim. Biophys. Acta BBA-Gen. Subj. 1840, 1413–1432.
- Batsios, P., Meyer, I., Gräf, R., 2016. Proximity-Dependent Biotin Identification (BioID) in *Dictyostelium* Amoebae, in: Methods in Enzymology. Elsevier, pp. 23–42. <https://doi.org/10.1016/bs.mie.2015.09.007>
- Blau-Wasser, R., Euteneuer, U., Xiong, H., Gassen, B., Schleicher, M., Noegel, A.A., 2009. CP250, a novel acidic coiled coil protein of the *Dictyostelium* centrosome, affects growth, chemotaxis, and the nuclear envelope. Mol. Biol. Cell 20, 4348–4361.
- Bleich, N., 2020. Lokalisation von Nek2, Plk1, Cdk1 und AurK während der Mitose bei *Dictyostelium discoideum*. (Bachelor-Arbeit). Universität Potsdam, Potsdam.
- Cassimeris, L., Gard, D., Tran, P.T., Erickson, H.P., 2001. XMAP215 is a long thin molecule that does not increase microtubule stiffness. J. Cell Sci. 114, 3025–3033.
- Cavanaugh, A.M., Jaspersen, S.L., 2017. Big lessons from little yeast: Budding and fission yeast centrosome structure, duplication, and function. Annu. Rev. Genet. 51, 361–383.
- Cheeseman, I.M., Anderson, S., Jwa, M., Green, E.M., Kang, J., Iii, J.R.Y., Chan, C.S.M., Drubin, D.G., Barnes, G., 2002. Phospho-Regulation of Kinetochore-Microtubule Attachments by the Aurora Kinase Ipl1p. Cell 163–172.
- Chen, F., Tillberg, P.W., Boyden, E.S., 2015. Expansion microscopy. Science 347, 543–547.
- Chinen, T., Yamazaki, K., Hashimoto, K., Fujii, K., Watanabe, K., Takeda, Y., Yamamoto, S., Nozaki, Y., Tsuchiya, Y., Takao, D., Kitagawa, D., 2021. Centriole and PCM cooperatively recruit CEP192 to spindle poles to promote bipolar spindle assembly. J. Cell Biol. 220. <https://doi.org/10.1083/jcb.202006085>
- Chozinski, T.J., Halpern, A.R., Okawa, H., Kim, H.-J., Tremel, G.J., Wong, R.O.L., Vaughan, J.C., 2016. Expansion microscopy with conventional antibodies and fluorescent proteins. Nat. Methods 13, 485–488. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3833>
- Cronan, E.J., 1990. Biotinylation of Proteins in vivo: A posttranslational Modification to label, purify and study proteins. J. Biol. Chem. 265, 10327–10333.
- Daunderer, C., Gräf, R., 2002. Molecular analysis of the cytosolic *Dictyostelium* γ -tubulin complex. Eur. J. Cell Biol. 81, 175–184.
- Dinkel, H., Van Roey, K., Michael, S., Kumar, M., Uyar, B., Altenberg, B., Milchevskaya, V., Schneider, M., Kühn, H., Behrendt, A., Dahl, S.L., Damerell, V.,

-
- Diebel, S., Kalman, S., Klein, S., Knudsen, A.C., Mäder, C., Merrill, S., Staudt, A., Thiel, V., Welti, L., Davey, N.E., Diella, F., Gibson, T.J., 2016. ELM 2016 - data update and new functionality of the eukaryotic linear motif resource. *Nucleic Acids Res.* 44, D294–D300. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1291>
- Eichinger, L., Pachebat, J.A., Glöckner, G., Rajandream, M.-A., Suceg, R., Berriman, M., Song, J., Olsen, R., Szafranski, K., Xu, Q., Tunggal, B., Kummerfeld, S., Madera, M., Konfortov, B.A., Rivero, F., Bankier, A.T., Lehmann, R., Hamlin, N., Davies, R., Gaudet, P., Fey, P., Pilcher, K., Chen, G., Saunders, D., Sodergren, E., Davis, P., Kerhornou, A., Nie, X., Hall, N., Anjard, C., Hemphill, L., Bason, N., Farbrother, P., Desany, B., Just, E., Morio, T., Rost, R., Churcher, C., Cooper, J., Haydock, S., van Driessche, N., Cronin, A., Goodhead, I., Muzny, D., Mourier, T., Pain, A., Lu, M., Harper, D., Lindsay, R., Hauser, H., James, K., Quiles, M., Madan Babu, M., Saito, T., Buchrieser, C., Wardroper, A., Felder, M., Thangavelu, M., Johnson, D., Knights, A., Loulseged, H., Mungall, K., Oliver, K., Price, C., Quail, M.A., Urushihara, H., Hernandez, J., Rabinowitsch, E., Steffen, D., Sanders, M., Ma, J., Kohara, Y., Sharp, S., Simmonds, M., Spiegler, S., Tivey, A., Sugano, S., White, B., Walker, D., Woodward, J., Winckler, T., Tanaka, Y., Shaulsky, G., Schleicher, M., Weinstock, G., Rosenthal, A., Cox, E.C., Chisholm, R.L., Gibbs, R., Loomis, W.F., Platzer, M., Kay, R.R., Williams, J., Dear, P.H., Noegel, A.A., Barrell, B., Kuspa, A., 2005. The genome of the social amoeba *Dictyostelium discoideum*. *Nature* 435, 43–57. <https://doi.org/10.1038/nature03481>
- Faix, J., Kreppel, L., Shaulsky, G., 2004. A rapid and efficient method to generate multiple gene disruptions in *Dictyostelium discoideum* using a single selectable marker and the Cre-loxP system. *Nucleic Acids Res.* 32, e143. <https://doi.org/10.1093/nar/gnh136>
- Francione, L.M., Annesley, S.J., Carilla-Latorre, S., Escalante, R., Fisher, P.R., 2011. The *Dictyostelium* model for mitochondrial disease. *Semin. Cell Dev. Biol.* 22, 120–130. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2010.11.004>
- Fukui, Y., Yumura, S., Yumura, K., 1987. Agar-Overlay Immunofluorescence: High-Resolution Studies of Cytoskeletal Components and Their Changes during Chemotaxis. *Methods Cell Biol.* 28, 347–356.
- Gambarotto, D., Zwettler, F.U., Le Guennec, M., Schmidt-Cernohorska, M., Fortun, D., Borgers, S., Heine, J., Schloetel, J.-G., Reuss, M., Unser, M., Boyden, E.S., Sauer, M., Hamel, V., Guichard, P., 2019. Imaging cellular ultrastructures using expansion microscopy (U-ExM). *Nat. Methods* 16, 71–74. <https://doi.org/10.1038/s41592-018-0238-1>
- Gao, R., Asano, S.M., Boyden, E.S., 2017. Q&A: Expansion microscopy. *BMC Biol.* 15:50. <https://doi.org/10.1186/s12915-017-0393-3>
- Gharib, A., 2021. Optimization of centrosome fluorescent microscopy techniques in *Dictyostelium discoideum* (Master-Arbeit). Universität Potsdam.
- Götzke, H., Kilisch, M., Martínez-Carranza, M., Sograte-Idrissi, S., Rajavel, A., Schlichthaerle, T., Engels, N., Jungmann, R., Stenmark, P., Opazo, F., Frey, S., 2019. The ALFA-tag is a highly versatile tool for nanobody-based bioscience applications. *Nat. Commun.* 10:4403. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-12301-7>

-
- Gräf, R., 2002. DdNek2, the first non-vertebrate homologue of human Nek2, is involved in the formation of microtubule-organizing centers. *J. Cell Sci.* 115, 1919–1929. <https://doi.org/10.1242/jcs.115.9.1919>
- Gräf, R., Batsios, P., Meyer, I., 2015. Evolution of centrosomes and the nuclear lamina: Amoebozoan assets. *Eur. J. Cell Biol.* 94, 249–256. <https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2015.04.004>
- Gräf, R., Dauderer, C., Schliwa, M., 2000. *Dictyostelium* DdCP224 is a microtubule-associated protein and a permanent centrosomal resident involved in centrosome duplication. *J. Cell Sci.* 113, 1747–1758.
- Gräf, R., Dauderer, C., Schliwa, M., 1999. Cell cycle dependent localization of monoclonal antibodies raised against isolated *Dictyostelium* centrosomes. *Biol. Cell* 91, 471–477.
- Gräf, R., Euteneuer, U., Ueda, M., Schliwa, M., 1998. Isolation of nucleation-competent centrosomes from *Dictyostelium discoideum*. *Eur. J. Cell Biol.* 76, 167–175. [https://doi.org/10.1016/S0171-9335\(98\)80031-9](https://doi.org/10.1016/S0171-9335(98)80031-9)
- Gräf, R., Grafe, M., Meyer, I., Mitic, K., Pitzen, V., 2021. The Dictyostelium Centrosome. *Cells* 10, 2657. <https://doi.org/10.3390/cells10102657>
- Grafe, M., Batsios, P., Meyer, I., Lisin, D., Baumann, O., Goldberg, M., Gräf, R., 2019. Supramolecular Structures of the *Dictyostelium* Lamin NE81. *Cells* 8, 162. <https://doi.org/10.3390/cells8020162>
- Gupta, A., Kitagawa, D., 2018. Ultrastructural diversity between centrioles of eukaryotes. *J. Biochem. (Tokyo)* 164, 1–8. <https://doi.org/10.1093/jb/mvy031>
- Harris, L.J., Larson, S.B., Hasel, K.W., McPherson, A., 1997. Refined Structure of an Intact IgG2a Monoclonal Antibody. *Biochemistry* 36, 1581–1597. <https://doi.org/10.1021/bi962514+>
- Hell, S.W., Wichmann, J., 1994. Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy. *Opt. Lett.* 19, 780–781. <https://doi.org/10.1364/OL.19.000780>
- Herick, K., 2018. First Peptide-tag specific Nanobody applied in super resolution microscopy (SRM). ChromoBlog. URL <https://resources.chromotek.com/blog/first-peptide-tag-specific-nanobody-in-super-resolution-microscopy-srm> (accessed 8.23.21).
- Hoetelmans, R.W.M., Prins, F.A., Velde, I.C., van der Meer, J., van de Velde, C.J.H., van Dierendonck, J.H., 2001. Effects of Acetone, Methanol, or Paraformaldehyde on Cellular Structure, Visualized by Reflection Contrast Microscopy and Transmission and Scanning Electron Microscopy: *Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol.* 9, 346–351. <https://doi.org/10.1097/00129039-200112000-00010>
- Iriki, H., Kawata, T., Muramoto, T., 2019. Generation of deletions and precise point mutations in *Dictyostelium discoideum* using the CRISPR nickase. *PLOS ONE* 14, e0224128. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0224128>
- Jaspersen, S.L., Winey, M., 2004. THE BUDDING YEAST SPINDLE POLE BODY: Structure, Duplication, and Function. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 20, 1–28. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.20.022003.114106>
- Joukov, V., 2014. The Cep192-Organized Aurora A-Plk1 Cascade Is Essential for Centrosome Cycle and Bipolar Spindle Assembly. *Mol. Cell* 55, 578–591.

-
- Jumper, J., Evans, R., Pritzel, A., Green, T., Figurnov, M., Ronneberger, O., Tunyasuvunakool, K., Bates, R., Žídek, A., Potapenko, A., Bridgland, A., Meyer, C., Kohl, S.A.A., Ballard, A.J., Cowie, A., Romera-Paredes, B., Nikolov, S., Jain, R., Adler, J., Back, T., Petersen, S., Reiman, D., Clancy, E., Zielinski, M., Steinegger, M., Pacholska, M., Berghammer, T., Bodenstein, S., Silver, D., Vinyals, O., Senior, A.W., Kavukcuoglu, K., Kohli, P., Hassabis, D., 2021. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature* 596, 583–589. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03819-2>
- Jung, G.I., Rhee, K., 2021. Triple deletion of *TP53*, *PCNT*, and *CEP215* promotes centriole amplification in the M phase. *Cell Cycle* 1–18. <https://doi.org/10.1080/15384101.2021.1950386>
- Kim, D.I., Jensen, S.C., Noble, K.A., KC, B., Roux, K.H., Motamedchaboki, K., Roux, K.J., 2016. An improved smaller biotin ligase for BioID proximity labeling. *Mol. Biol. Cell* 27, 1188–1196.
- Kim, D.I., Kc, B., Zhu, W., Motamedchaboki, K., Doye, V., Roux, K.J., 2014. Probing nuclear pore complex architecture with proximity-dependent biotinylation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 111, E2453–E2461. <https://doi.org/10.1073/pnas.1406459111>
- Kim, S., Rhee, K., 2014. Importance of the CEP215-Pericentrin Interaction for Centrosome Maturation during Mitosis. *PLoS ONE* 9, e87016. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0087016>
- Koonce, M., Tikhonenko, I., 2018. Centrosome Positioning in *Dictyostelium*: Moving beyond Microtubule Tip Dynamics. *Cells* 7, 29. <https://doi.org/10.3390/cells7040029>
- Koonce, M.P., 1999. Dynein motor regulation stabilizes interphase microtubule arrays and determines centrosome position. *EMBO J.* 18, 6786–6792. <https://doi.org/10.1093/emboj/18.23.6786>
- Koonce, M.P., Khodjakov, A., 2002. Dynamic microtubules in *Dictyostelium*. *J. Muscle Res. Cell Motil.* 23, 613–619.
- 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. <https://doi.org/10.1091/mbc.e11-07-0595>
- Ku, T., Swaney, J., Park, J.-Y., Albanese, A., Murray, E., Cho, J.H., Park, Y.-G., Mangena, V., Chen, J., Chung, K., 2016. Multiplexed and scalable super-resolution imaging of three-dimensional protein localization in size-adjustable tissues. *Nat. Biotechnol.* 34, 973–981. <https://doi.org/10.1038/nbt.3641>
- Kuhnert, O., 2012. Charakterisierung der neuen centrosomalen Proteine CP148 und CP55 in *Dictyostelium discoideum* (Dissertation). Universität Potsdam, Potsdam.
- Kuhnert, O., Baumann, O., Meyer, I., Gräf, R., 2012a. CP55, a novel key component of centrosomal organization in *Dictyostelium*. *Cell. Mol. Life Sci.* 69, 3651–3664. <https://doi.org/10.1007/s00018-012-1040-3>
- Kuhnert, O., Baumann, O., Meyer, I., Gräf, R., 2012b. Functional characterization of CP148, a novel key component for centrosome integrity in *Dictyostelium*. *Cell. Mol. Life Sci.* 69, 1875–1888. <https://doi.org/10.1007/s00018-011-0904-2>

-
- Kuriyama, R., Fisher, C.R., 2020. A novel mitosis-specific Cep215 domain interacts with Cep192 and phosphorylated Aurora A for organization of spindle poles. *J. Cell Sci.* 133, jcs240267.
- Le Guennec, M., Klena, N., Gambarotto, D., Laporte, M.H., Tassin, A.-M., van den Hoek, H., Erdmann, P.S., Schaffer, M., Kovacic, L., Borgers, S., Goldie, K.N., Stahlberg, H., Bornens, M., Azimzadeh, J., Engel, B.D., Hamel, V., Guichard, P., 2020. A helical inner scaffold provides a structural basis for centriole cohesion. *Sci. Adv.* 6, eaaz4137. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aaz4137>
- Li, H., Chen, Q., Kaller, M., Nellen, W., Graf, R., Lozanne, A.D., 2008. *Dictyostelium* Aurora Kinase Has Properties of both Aurora A and Aurora B Kinases. *Eukaryot. Cell* 7, 894–905.
- Lohmeier, H., 2010. Molekulare und mikroskopische Charakterisierung zweier neuer Centrosomproteine (Diplom-Arbeit). Universität Potsdam.
- Martens, H., Novotny, J., Oberstrass, J., Steck, T.L., Postlethwait, P., Nellen, W., 2002. RNAi in *Dictyostelium*: the role of RNA-directed RNA polymerases and double-stranded RNase. *Mol. Biol. Cell* 13, 445–453.
- Meng, L., Park, J.-E., Kim, T.-S., Lee, E.H., Park, S.-Y., Zhou, M., Bang, J.K., Lee, K.S., 2015. Bimodal Interaction of Mammalian Polo-Like Kinase 1 and a Centrosomal Scaffold, Cep192, in the Regulation of Bipolar Spindle Formation. *Mol. Cell. Biol.* 35, 2626–2640.
- Meyer, I., Peter, T., Batsios, P., Kuhnert, O., Krüger-Genge, A., Camurça, C., Gräf, R., 2017. CP39, CP75 and CP91 are major structural components of the *Dictyostelium* centrosome's core structure. *Eur. J. Cell Biol.* 96, 119–130. <https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2017.01.004>
- Mikhaylova, M., Cloin, B.M.C., Finan, K., van den Berg, R., Teeuw, J., Kijanka, M.M., Sokolowski, M., Katrukha, E.A., Maidorn, M., Opazo, F., Moutel, S., Vantard, M., Perez, F., van Bergen en Henegouwen, P.M.P., Hoogenraad, C.C., Ewers, H., Kapitein, L.C., 2015. Resolving bundled microtubules using anti-tubulin nanobodies. *Nat. Commun.* 6, 7933. <https://doi.org/10.1038/ncomms8933>
- Mistry, J., Chuguransky, S., Williams, L., Qureshi, M., Salazar, G.A., Sonnhammer, E.L.L., Tosatto, S.C.E., Paladin, L., Raj, S., Richardson, L.J., Finn, R.D., Bateman, A., 2021. Pfam: The protein families database in 2021. *Nucleic Acids Res.* 49, D412–D419. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa913>
- Moens, P.B., 1976. Spindle and kinetochore morphology of *Dictyostelium discoideum*. *J. Cell Biol.* 68, 113–122.
- Muramoto, T., Iriki, H., Watanabe, J., Kawata, T., 2019. Recent Advances in CRISPR/Cas9-Mediated Genome Editing in *Dictyostelium*. *Cells* 8, 46. <https://doi.org/10.3390/cells8010046>
- Nakajima, H., Toyoshima-Morimoto, F., Taniguchi, E., Nishida, E., 2003. Identification of a Consensus Motif for Plk (Polo-like Kinase) Phosphorylation Reveals Myt1 as a Plk1 Substrate. *J. Biol. Chem.* 278, 25277–25280. <https://doi.org/10.1074/jbc.C300126200>
- Nakamura, Y., 2000. Codon usage tabulated from international DNA sequence databases: status for the year 2000. *Nucleic Acids Res.* 28, 292–292. <https://doi.org/10.1093/nar/28.1.292>

-
- Nellen, W., Firtel, R.A., 1985. High-copy-number transformants and co-transformation in *Dictyostelium*. *Gene* 39, 155–163. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(85\)90309-9](https://doi.org/10.1016/0378-1119(85)90309-9)
- Notredame, C., Higgins, G.H., Heringa, J., 2000. T-Coffee: A Novel Method for Fast and Accurate Multiple Sequence Alignment. *J. Mol. Biol.* 302, 205–217.
- O'Day, D.H., Budniak, A., 2015. Nucleocytoplasmic protein translocation during mitosis in the social amoebozoan *Dictyostelium discoideum*. *Biol. Rev.* 90, 126–141. <https://doi.org/10.1111/brv.12100>
- Omura, F., Fukui, Y., 1985. *Dictyostelium* MTOC: Structure and linkage to the nucleus. *Protoplasma* 127, 212–221. <https://doi.org/10.1007/BF01276265>
- O'Rourke, B.P., Gomez-Ferreria, M.A., Berk, R.H., Hackl, A.M.U., Nicholas, M.P., O'Rourke, S.C., Pelletier, L., Sharp, D.J., 2014. Cep192 Controls the Balance of Centrosome and Non-Centrosomal Microtubules during Interphase. *PLoS ONE* 9, e101001. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0101001>
- Pang, K.M., Lynes, M.A., Knecht, D.A., 1999. Variables Controlling the Expression Level of Exogenous Genes in *Dictyostelium*. *Plasmid* 41, 187–197. <https://doi.org/10.1006/plas.1999.1391>
- Paschke, P., Knecht, D.A., Silale, A., Traynor, D., Williams, T.D., Thomason, P.A., Insall, R.H., Chubb, J.R., Kay, R.R., Veltman, D.M., 2018. Rapid and efficient genetic engineering of both wild type and axenic strains of *Dictyostelium discoideum*. *PLOS ONE* 13, e0196809. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0196809>
- Pitzen, V., Askarzada, S., Gräf, R., Meyer, I., 2018. CDK5RAP2 Is an Essential Scaffolding Protein of the Corona of the *Dictyostelium* Centrosome. *Cells* 7, 32. <https://doi.org/10.3390/cells7040032>
- Pitzen, V., Sander, S., Baumann, O., Gräf, R., Meyer, I., 2021. Cep192, a Novel Missing Link between the Centrosomal Core and Corona in *Dictyostelium* Amoebae. *Cells* 10, 2384. <https://doi.org/10.3390/cells10092384>
- Ponting, C.P., 2006. A novel domain suggests a ciliary function for ASPM, a brain size determining gene. *Bioinformatics* 22, 1031–1035. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btl022>
- Putzler, S., Meyer, I., Gräf, R., 2016. CP91 is a component of the *Dictyostelium* centrosome involved in centrosome biogenesis. *Eur. J. Cell Biol.* 95, 124–135. <https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2016.03.001>
- Raper, K.B., 1935. *Dictyostelium discoideum*, a new species of slime mold from decaying forest leaves. *J Agr Res* 50, 135–147.
- Rayleigh, 1896. XV. On the theory of optical images, with special reference to the microscope. *Lond. Edinb. Dublin Philos. Mag. J. Sci.* 42, 167–195. <https://doi.org/10.1080/14786449608620902>
- Reinders, Y., Schulz, I., Gräf, R., Sickmann, A., 2006. Identification of Novel Centrosomal Proteins in *Dictyostelium Discoideum* by Comparative Proteomic Approaches. *J. Proteome Res.* 5, 589–598. <https://doi.org/10.1021/pr050350q>
- Ries, J., Kaplan, C., Platonova, E., Eghlidi, H., Ewers, H., 2012. A simple, versatile method for GFP-based super-resolution microscopy via nanobodies. *Nat. Methods* 9, 582–584. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1991>

-
- Roux, K.J., Kim, D.I., Raida, M., Burke, B., 2012. A promiscuous biotin ligase fusion protein identifies proximal and interacting proteins in mammalian cells. *J. Cell Biol.* 196, 801–810. <https://doi.org/10.1083/jcb.201112098>
- Rust, M.J., Bates, M., Zhuang, X., 2006. Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM). *Nat. Methods* 3, 793–796. <https://doi.org/10.1038/nmeth929>
- Samereier, M., Baumann, O., Meyer, I., Gräf, R., 2011. Analysis of *Dictyostelium* TACC reveals differential interactions with CP224 and unusual dynamics of *Dictyostelium* microtubules. *Cell. Mol. Life Sci.* 68, 275–287. <https://doi.org/10.1007/s00018-010-0453-0>
- Sander, S., 2011. Charakterisierung des centrosomalen Proteins Cep192 in *Dictyostelium discoideum* (Bachelor-Arbeit). Universität Potsdam.
- Schaap, P., 2011. Evolutionary crossroads in developmental biology: *Dictyostelium discoideum*. *Development* 138, 387–396. <https://doi.org/10.1242/dev.048934>
- Schulz, I., Baumann, O., Samereier, M., Zoglmeier, C., Gräf, R., 2009a. *Dictyostelium* Sun1 is a dynamic membrane protein of both nuclear membranes and required for centrosomal association with clustered centromeres. *Eur. J. Cell Biol.* 88, 621–638. <https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2009.06.003>
- Schulz, I., Erle, A., Gräf, R., Krüger, A., Lohmeier, H., Putzler, S., Samereier, M., Weidenthaler, S., 2009b. Identification and cell cycle-dependent localization of nine novel, genuine centrosomal components in *Dictyostelium discoideum*. *Cell Motil. Cytoskeleton* 66, 915–928. <https://doi.org/10.1002/cm.20384>
- Schulz, I., Reinders, Y., Sickmann, A., Gräf, R., 2006. An Improved Method for *Dictyostelium* Centrosome Isolation. *Methods Mol. Biol.* 167–175.
- Sekine, R., Kawata, T., Muramoto, T., 2018. CRISPR/Cas9 mediated targeting of multiple genes in *Dictyostelium*. *Sci. Rep.* 8, 8471. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-26756-z>
- Stothard, P., 2000. The Sequence Manipulation Suite: JavaScript Programs for Analyzing and Formatting Protein and DNA Sequences. *Biotechniques* 28, 1102–1104.
- Sukumaran, S.K., Blau-Wasser, R., Rohlf, M., Gallinger, C., Schleicher, M., Noegel, A.A., 2015. The centrosomal component CEP161 of *Dictyostelium discoideum* interacts with the Hippo signaling pathway. *Cell Cycle* 14, 1024–1035. <https://doi.org/10.1080/15384101.2015.1007015>
- Szikora, S., Görög, P., Kozma, C., Mihály, J., 2021. Drosophila Models Rediscovered with Super-Resolution Microscopy. *Cells* 10, 1924. <https://doi.org/10.3390/cells10081924>
- Tagwerker, C., Flick, K., Cui, M., Guerrero, C., Dou, Y., Auer, B., Baldi, P., Huang, L., Kaiser, P., 2006. A Tandem Affinity Tag for Two-step Purification under Fully Denaturing Conditions: Application in Ubiquitin Profiling and Protein Complex Identification Combined with *in vivo* Cross-Linking. *Mol. Cell. Proteomics* 5, 737–748. <https://doi.org/10.1074/mcp.M500368-MCP200>
- Tikhonenko, I., Magidson, V., Gräf, R., Khodjakov, A., Koonce, M.P., 2013. A kinesin-mediated mechanism that couples centrosomes to nuclei. *Cell. Mol. Life Sci.* 70, 1285–1296. <https://doi.org/10.1007/s00018-012-1205-0>

-
- Tillberg, P.W., Chen, F., Piatkevich, K.D., Zhao, Y., Yu, C.-C., English, B.P., Gao, L., Martorell, A., Suk, H.-J., Yoshida, F., DeGennaro, E.M., Roossien, D.H., Gong, G., Seneviratne, U., Tannenbaum, S.R., Desimone, R., Cai, D., Boyden, E.S., 2016. Protein-retention expansion microscopy of cells and tissues labeled using standard fluorescent proteins and antibodies. *Nat. Biotechnol.* 34, 987–992. <https://doi.org/10.1038/nbt.3625>
- Truckenbrodt, S., Maidorn, M., Crzan, D., Wildhagen, H., Kabatas, S., Rizzoli, S.O., 2018. X10 expansion microscopy enables 25-nm resolution on conventional microscopes. *EMBO Rep.* 19, e45836. <https://doi.org/10.15252/embr.201845836>
- 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.
- Virant, D., Traenkle, B., Maier, J., Kaiser, P.D., Bodenhöfer, M., Schmees, C., Vojnovic, I., Pisak-Lukáts, B., Endesfelder, U., Rothbauer, U., 2018. A peptide tag-specific nanobody enables high-quality labeling for dSTORM imaging. *Nat. Commun.* 9, 930. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03191-2>
- 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. <https://doi.org/10.1242/jcs.151753>
- Watts, D.J., Ashworth, J.M., 1970. Growth of myxamoebae of the cellular slime mould *Dictyostelium discoideum* in axenic culture. *Biochem. J.* 119, 171–174.
- Wehland, J., Willingham, M.C., 1983. A rat monoclonal antibody reacting specifically with the tyrosylated form of α -tubulin. II. Effects on cell movement, organization of microtubules, and intermediate filaments, and arrangement of Golgi elements. *J Cell Biol* 97, 1476–1490.
- Weißhart, K., 2014. The Basic Principle Of Airyscanning. URL https://asset-downloads.zeiss.com/catalogs/download/mic/104cc06d-f997-4cc0-b679-b2cf93bfc863/EN_wp_LSM-880_Basic-Principle-Airyscan.pdf (accessed 8.25.21).
- Yi, P., Goshima, G., 2018. Microtubule nucleation and organization without centrosomes. *Curr. Opin. Plant Biol.* 46, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2018.06.004>
- Zhu, F., Lawo, S., Bird, A., Pinchev, D., Ralph, A., Richter, C., Müller-Reichert, T., Kittler, R., Hyman, A.A., Pelletier, L., 2008. The Mammalian SPD-2 Ortholog Cep192 Regulates Centrosome Biogenesis. *Curr. Biol.* 18, 136–141. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2007.12.055>

DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt Dr. Irene Meyer und Prof. Dr. Ralph Gräf für die Möglichkeit, in der AG Zellbiologie dieses spannende Forschungsthema zu bearbeiten, mich selbst weiterzuentwickeln und für ihre Ratschläge, wenn es gerade mal nicht weiterging.

Bei Rat und Tat müssen Dr. Petros Batsios und meine Bürokolleginnen Dr. Marianne Grafe und Kristina Mitic dankend erwähnt werden. Die Erstellung von hilfreichen Skizzen am Whiteboard mit Kaffeetasse im Anschlag hat sehr viel Spaß gemacht.

Für die Unterstützung im Labor danke ich Cindy Marona, Joan Baltzer und Pauline Fleuren.

Sandra Pauluhn war Meisterin darin, mir Arbeit vom Hals zu halten, die nicht unmittelbar mit dem Forschungsinhalt zu tun hatte, aber erledigt werden musste. Danke dafür!

Prof. Dr. Christian Hammann und Prof. Dr. Carsten Beta danke ich für die Bereitschaft zur Begutachtung dieser Arbeit.

Für die Hilfe bei der Elektronenmikroskopie bedanke ich mich bei apl. Prof. Dr. Otto Baumann.

Für die Möglichkeit bei ihnen im Atelier schreiben zu können, bedanke ich mich bei Miriam, Anh und Philipp.

Für das Korrekturlesen bedanke ich mich bei meiner guten Freundin Lilia und meinem guten Freund Max.