

Institut für Biochemie und Biologie

Abteilung Zellbiologie

**Molekulare Charakterisierung von NE81 und CP75, zwei
kernhüllen- und centrosomassozierten Proteinen in *Dictyostelium
discoideum***

-Dissertation-

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

Vorgelegt der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Potsdam

von

Anne Krüger



Juni 2011

Online veröffentlicht auf dem
Publikationsserver der Universität Potsdam:
URL <http://opus.kobv.de/ubp/volltexte/2011/5391/>
URN <urn:nbn:de:kobv:517-opus-53915>
<http://nbn-resolving.de/urn:nbn:de:kobv:517-opus-53915>

Ehrenwörtliche Versicherung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt habe.

Anne Krüger

Potsdam, Juni 2011

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Schulz, I., A. Erle, R. Gräf, A. Krüger, H. Lohmeier, S. Putzler, M. Samereier und S. Weidenthaler (2009). "Identification and cell cycle-dependent localization of nine novel, genuine centrosomal components in Dictyostelium discoideum." Cell Motil Cytoskeleton 66(11): 915-28.

Krüger, A., B. Petros, O. Baumann, E. Luckert, I. Meyer und R. Gräf (2011). "Characterization of NE81, the first lamin-like nucleoskeleton protein in a unicellular organism."(eingereicht)

Zusätzliches Material auf der beigefügten CD:

Abbildung 51: FTI-277 hat keinen Einfluss auf die Lokalisation von NE81 in AX2-Zellen.

Repräsentative Darstellung der Immunfluoreszenzmikroskopie von unbehandelten und FTI-277 behandelten AX2-Zellen.

Dargestellt ist beispielhaft die Inkubation von AX2-Zellen mit dem Farnesyltransferaseinhibitor 277 in einer Konzentration von 60 µg/ml über 96 h. Die Zellen wurden mit Glutaraldehyd fixiert und mit anti Tubulin/anti Ratte AlexaFluor 568 und anti NE81/anti Kaninchen AlexaFluor 488 markiert. Die DNA wurde mit DAPI markiert. Die Überlagerung zeigt anti Tubulin in rot, anti NE81 in grün und die DNA in blau. Balken: 2 µm

Abbildung 52: Zmpste 24-Inhibitoren haben keinen Einfluss auf die Lokalisation von NE81 in AX2-Zellen.

Repräsentative Darstellung der Immunfluoreszenzmikroskopie von unbehandelten und Zmpste24-Inhibitoren behandelten AX2-Zellen.

Dargestellt sind beispielhaft die Zmpste24-Inhibitoren Lopinavir und Ritonavir. Die Zellen wurden mit Glutaraldehyd fixiert und mit anti Tubulin/anti Ratte AlexaFluor 568 und anti NE81/anti Kaninchen AlexaFluor 488 markiert. Die DNA wurde mit DAPI markiert. Die Überlagerung zeigt anti Tubulin in rot, anti NE81 in grün und die DNA in blau. Balken: 2 µm

Film 1: FRAP GFP-NE81 in der Interphase

Film 2: FRAP GFP-NE81 in der frühen Mitose

Film 3: FRAP GFP-NE81 in der späten Mitose

Film 4: Lebendzellaufnahme von GFP-NE81 Δ CLIM Zellen in der Mitose

Film 5: FRAP-GFP-NE81 Δ CLIM in der Interphase

Film 6: Lebendzellaufnahme von GFP-CP75 in der Mitose

Die CD enthält eine digitale Kopie dieser Arbeit.

Inhalt

I.	Zusammenfassung	XIV
II.	Summary.....	XV
1	Einleitung.....	1
1.1	<i>Dictyostelium discoideum</i> als Modellorganismus.....	1
1.2	Die Organisation der Kernhülle in Metazoen	3
1.3	Die Organisation der Kernhülle in <i>Dictyostelium discoideum</i>	5
1.4	Lamine	6
1.5	Die Funktion von Laminen	7
1.6	Der Aufbau von Laminen	8
1.7	Die Prozessierung der Lamine	9
1.8	Laminopathien	11
1.9	Das Centrosom.....	12
1.10	Ziel dieser Arbeit.....	17
2	Material und Methoden	18
2.1	Reagenzien und andere Materialien.....	18
2.1.1	Chemikalien und Reagenzien:	18
2.1.2	Antikörper.....	18
2.1.3	Enzyme	18
2.1.4	Antibiotika	18
2.1.5	Andere Materialien	19
2.1.6	Puffer und Lösungen	19
2.1.7	Vektoren	20
2.1.8	Software.....	20
2.2	Organismen und Zellkultur	20
2.2.1	Bakterienstämme	20
2.2.2	<i>Dictyostelium discoideum</i> Stämme.....	21
2.2.3	Hefestamm.....	21

2.2.4	Kultivierung von <i>E. coli</i> Stämmen	21
2.2.5	Kultivierung von <i>Klebsiella aerogenes</i>	21
2.2.6	Kultivierung des Hefestammes L40	22
2.2.7	Kultivierung von <i>Dictyostelium discoideum</i>	22
2.3	Molekularbiologische Methoden	23
2.3.1	Bestimmung der DNA – Konzentration	23
2.3.2	Agarosegelelektrophorese:	23
2.3.3	DNA Extraktion aus Agarosegelen	23
2.3.4	Präparation von Plasmid DNA aus <i>E. coli</i>	23
2.3.5	Präparation chromosomaler DNA aus <i>Dictyostelium discoideum</i>	23
2.3.6	Isolation polyadenylierter RNA aus <i>Dictyostelium discoideum</i>	24
2.3.7	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	24
2.3.8	Reverse- Transkriptions-PCR (RT-PCR)	24
2.3.9	Spaltung von DNA durch Restriktionsenzyme:	25
2.3.10	Ligation von DNA in Plasmidvektoren:	25
2.3.11	Verwendete Oligonukleotide	25
2.3.12	Herstellung chemisch kompetenter <i>E. coli</i> Zellen:	26
2.3.13	Transformation chemisch kompetenter <i>E. coli</i> Zellen	26
2.3.14	Transformation von <i>Dictyostelium discoideum</i> Zellen	27
2.3.15	"Yeast-Two-Hybrid"-Assay	28
2.3.16	Herstellung von Plasmiden und entsprechenden <i>Dictyostelium</i> Stämmen	30
2.4	Biochemische Methoden	33
2.4.1	Bestimmung der Proteinkonzentration	33
2.4.2	Gewinnung von Gesamtzellextrakten	33
2.4.3	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	34
2.4.4	Coomassie-Blau-Färbung von Proteinen	34
2.4.5	Silberfärbung von SDS Gelen	35
2.4.6	Western Blot Analyse	35

2.4.7	Densitometrische Auswertung von gelelektrophoretisch aufgetrennten Proteinen	36
2.4.8	Aufreinigung von bakteriell exprimierte MBP-Fusionsproteinen.....	36
2.4.9	Generierung polyklonaler Antikörper in Kaninchen	37
2.4.10	Affinitätsreinigung von Antikörpern	38
2.4.11	Isolation von Centrosomen aus <i>Dictyostelium</i>	38
2.4.12	Kernpräparation und Herstellung von Immunogoldpräparaten für die Elektronenmikroskopie.....	40
2.4.13	Kernpräparation und Herstellung von elektronenmikroskopischer Präparaten..	41
2.5	Zellbiologische Methoden	41
2.5.1	Fixierung und indirekte Immunfluoreszenz von <i>Dictyostelium</i> Zellen und Centrosomen.....	41
2.5.2	Weitfeldmikroskopie	42
2.5.3	<i>Fluorescence recovery after photobleaching</i> Experiment (FRAP).....	43
2.5.4	Anwendung von Zmpste24- Inhibitoren auf AX2-Zellen	44
2.5.5	Verwendung des Farnesyltransferaseinhibitors 277 auf AX2-Zellen	44
2.5.6	Testung der Mechanosensitivität von <i>Dictyostelium</i> Zellen.....	44
2.5.7	Untersuchung des Wachstumsverhaltens von <i>Dictyostelium</i> Zellen.....	45
2.5.8	Bestimmung des Durchmessers von <i>Dictyostelium</i> Zellen	45
2.5.9	Untersuchung der Distanz zwischen Kernhülle und dem Chromatin in <i>Dictyostelium</i> Zellen.....	45
3	Ergebnisse.....	46
3.1	Charakterisierung des NE81 in <i>Dictyostelium discoideum</i>	46
3.1.1	Struktur und Sequenzanalyse von NE81	46
3.1.2	Lokalisation des NE81.....	48
3.1.3	Charakterisierung der Überexpression des GFP-NE81 Fusionsprotein	53
3.1.4	Funktionelle Charakterisierung von NE81	62
3.1.5	Analyse von zwei CaaX-Box deletierten NE81 Proteinvarianten.....	65
3.1.6	Analyse der Prozessierung des endogenen NE81.....	76

3.1.7	Untersuchung einer potentiellen CDK1 Phosphorylierungskonsensussequenz in NE81	79
3.2	Untersuchung eines centrosomalen Kandidatenproteins in <i>Dictyostelium discoideum</i>	82
3.2.1	Sequenzanalyse des CP75	83
3.2.2	GFP-CP75 lokalisiert in Interphasezellen am Centrosom.....	84
3.2.3	GFP-CP75 ist an isolierten Centrosomen nachweisbar.....	85
3.2.4	Die centrosomale Lokalisation von GFP-CP75 ist zellzyklusabhängig.....	86
3.2.5	GFP-CP75 zeigt in der Interphase keine Mobilität am Centrosom.....	88
3.2.6	Die Überexpression des GFP-CP75 hat keinen Einfluss auf den Phänotyp der Zelle	89
3.2.7	Der Versuch der Generierung eines polyklonalen CP75 Antikörpers.....	91
3.2.8	CP75 interagiert mit CP39.....	91
4	Diskussion	95
4.1	NE81 in <i>Dictyostelium discoideum</i> - ist es das erste laminähnliche Protein in einem einzelligen Organismus?.....	95
4.1.1	Die Struktur und Lokalisation des NE81 ähnelt Laminen in Metazoen.....	95
4.1.2	Der Einfluss der CaaX-Box auf das Verhalten des NE81	96
4.1.3	NE81 verfügt über eine zellkernstabilisierende Funktion	96
4.1.4	Das zellzyklusabhängige Verhalten des NE81 wird vermutlich durch die CDK1 reguliert	98
4.1.5	NE81 Nullmutanten bekräftigen den laminähnlichen Phänotyp	100
4.1.6	Die NE81 Überexpression legt eine Beteiligung des NE81 an der Membran- und Chromatinorganisation offen.....	101
4.1.7	Überprüfung der Prozessierungsmaschinerie des NE81 in <i>Dictyostelium</i>	101
4.2	Diskussion CP75	104
4.3	Ausblick.....	108
5	Referenzen.....	110
6	Abkürzungen	122

7	Curriculum Vitae	124
8	Das Wichtigste zum Schluss - Danksagung	125

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Der Lebenszyklus von <i>Dictyostelium discoideum</i>	2
Abbildung 2 Übersicht über die strukturelle Organisation der Kernhülle in eukaryotischen Zellen.....	4
Abbildung 3: Abbildung des strukturellen Aufbaus von Laminen.....	8
Abbildung 4: Darstellung der Struktur nukleärer Lamine.....	10
Abbildung 5: Schematische Darstellung eines Säuger-Centrosoms eines Hefe-Spindelpolkörper und eines <i>Dictyostelium</i> -Centrosoms.....	15
Abbildung 6: Der <i>Dictyostelium</i> Centrosomenzyklus.....	16
Abbildung 7: "Yeast-Two-Hybrid" Prinzip.....	29
Abbildung 8: Die Struktur des NE81.....	46
Abbildung 9: Primärsequenz des Kernhüllenproteins NE81.....	47
Abbildung 10: Zellzyklus-abhängige Lokalisation des GFP-NE81.....	49
Abbildung 11: Lokalisation des rekombinaten Fusionsprotein GFP-NE81 an aufgereinigten Centrosomen.....	50
Abbildung 12: Der NE81 Antikörper erkennt spezifisch eine Bande bei ~ 98 kDa.....	51
Abbildung 13: Zellzyklus-abhängige Lokalisation des endogenen NE81.....	52
Abbildung 14: NE81 ist mit der inneren Kernhülle assoziiert.....	53
Abbildung 15: GFP-NE81 Überexpression führt zu deformierten Zellkernen und ungleichmäßig organisiertem Chromatin.....	54
Abbildung 16: Die Expression des GFP-NE81 ist 3,2 fach stärker gegenüber dem endogenen NE81.....	55
Abbildung 17: Die GFP-NE81 Überexpression resultiert in einem erhöhten Abstand zwischen Kernhülle und Chromatin.....	55
Abbildung 18: Die GFP-NE81 Überexpression führt zu einem erhöhten Abstand zwischen Chromatin und Kernhülle.....	56
Abbildung 19: GFP-NE81 Zellen zeigen keine deutlichen Unterschiede bei der Analyse von Zellkern - und Centrosomenanzahl.....	57
Abbildung 20: GFP-NE81 zeigt keine deutliche Mobilität innerhalb der Kernhülle während der Interphase.....	58

Abbildung 21: GFP-NE81 zeigt eine deutliche Mobilität innerhalb der Kernhülle während der Metaphase.....	60
Abbildung 22: GFP-NE81 zeigt keine deutliche Mobilität innerhalb der Kernhülle während der Telophase.....	61
Abbildung 23: Generierung einer NE81-Nullmutante durch homologe Rekombination.....	62
Abbildung 24: Phänotyp des NE81 <i>knock out</i>	63
Abbildung 25: Darstellung verschiedener Kernphänotypen in NE81 defizienten Zellen.	64
Abbildung 26: NE81 Nullmutanten zeigen Unterschiede im Vergleich zu AX2-Wildtypzellen.	65
Abbildung 27: GFP-NE81 Δ CLIM bildet reversible Aggregate innerhalb des Zellkerns.	66
Abbildung 28: GFP-NE81 Δ CLIM wird 4,9 fach stärker exprimiert als das endogene NE81.	67
Abbildung 29: Die GFP-NE81 Δ CLIM Cluster lösen sich zu Beginn der Mitose auf und reichern sich in der Telophase im Bereich der zentralen Spindel und des Chromatins wieder an.	68
Abbildung 30: GFP-NE81 Δ CLIM bildet schwammartige Cluster mittlerer Elektronendichte innerhalb des Zellkerns aus.	68
Abbildung 31: Sun1 lässt sich in den GFP-NE81 Δ CLIM Ansammlungen nicht nachweisen.	69
Abbildung 32: GFP-NE81 Δ CLIM zeigt keine deutliche Mobilität innerhalb der Kernhülle während der Interphase.....	70
Abbildung 33: GFP-NE81 Δ CLIM Zellen zeigen ein verändertes Wachstumsverhalten in Schüttelkultur.....	71
Abbildung 34: GFP-NE81 Δ CLIM Zellen zeigen eine erhöhte Mechanosensitivität.	72
Abbildung 35: GFP-NE81 Δ CLIM Zellen zeigen keine deutlichen Unterschiede bei der Analyse von Kern- und Centrosomenanzahl.	73
Abbildung 36: Darstellung der modifizierten NE81 Δ C-Variante.	74
Abbildung 37: GFP-NE81 Δ C bildet Cluster innerhalb des Zellkerns.....	75
Abbildung 38: ICMT-Nullmutanten zeigen eine veränderte Verteilung des NE81.....	78
Abbildung 39: GFP-NE81 S122A lokalisiert im pericentrosomalen Bereich.....	82
Abbildung 40: Abbildung des amplifizierten NE81 Fragmentes.	82
Abbildung 41: Abbildung der prognostizierten <i>coiled-coil</i> Bereiche im CP75.	84

Abbildung 42: Das rekombinante GFP-CP75 Fusionsprotein lokalisiert punktförmig im Bereich des Centrosoms.	84
Abbildung 43: Der GFP-Antikörper erkennt spezifisch eine Bande bei ~ 130 kDa.	85
Abbildung 44: Das rekombinante GFP-CP75 Fusionsprotein lokalisiert punktförmig an aufgereinigten Centrosomen.	86
Abbildung 45: Zellzyklus-abhängige Lokalisation des GFP- CP75.	87
Abbildung 46: Die Lokalisation des GFP-CP75 erfolgt zellzyklusabhängig.	88
Abbildung 47: GFP-CP75 zeigt keine deutliche Mobilität im Interphasecentrosom.	89
Abbildung 48: GFP-CP75 Zellen zeigen keine bemerkenswerten Unterschiede bei der Analyse von Zellkern- und Centrosomenanzahl.	90
Abbildung 49: Expression des N-Terminus des CP75 als MBP-Fusionsprotein in <i>E .coli</i>	91
Abbildung 50: Beteiligung der LINC-Komplexe an der mechanischen Festigkeit der Zelle. .	97

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Hergestellte Plasmide und korrespondierende Dictyostelium Stämme, die im Rahmen dieser Arbeit generiert wurden	33
Tabelle 2: Zusammensetzung der SDS-Polyacrylamidgele	34
Tabelle 3: Darstellung der verwendeten Protein- und Vektorkombinationen für die Testung der Autoaktivierung der Reportergene.	93
Tabelle 4: Darstellung der Interaktion zwischen dem CP75 und CP39.	94

I. Zusammenfassung

Lamine bilden zusammen mit laminassoziierten Proteinen die nukleäre Lamina. Diese ist notwendig für die mechanische Stabilität von Zellen, die Organisation des Chromatins, der Genexpression, dem Fortgang des Zellzyklus und der Zellmigration.

Die vielfältigen Funktionen der Lamine werden durch die Pathogenese von Laminopathien belegt. Zu diesen Erkrankungen, welche ihre Ursache in Mutationen innerhalb der laminkodierenden Gene, oder der Gene laminassoziiierter bzw. laminprozessierender Proteine haben, zählen unter anderem das „*Hutchinson-Gilford Progerie Syndrom*“, die „*Emery-Dreifuss*“ Muskeldystrophie und die dilatierte Kardiomyopathie. Trotz der fundamentalen Bedeutung der Lamine, wurden diese bisher nur in Metazoen und nicht in einzelligen Organismen detektiert.

Der amöbide Organismus *Dictyostelium discoideum* ist ein haploider Eukaryot, der häufig als Modellorganismus in den verschiedensten Bereichen der Zellbiologie eingesetzt wird.

Mit der Entdeckung von NE81, einem Protein das mit der inneren Kernhülle von *Dictyostelium discoideum* assoziiert ist, wurde erstmals ein Protein identifiziert, das man aufgrund seiner Eigenschaften als laminähnliches Protein in einem niederen Eukaryoten bezeichnen kann. Diese Merkmale umfassen die Existenz lamintypischer Sequenzen, wie die CDK1-Phosphorylierungsstelle, direkt gefolgt von einer zentralen „*Rod*“-Domäne, sowie eine typische NLS und die hoch konservierte CaaX-Box.

Für die Etablierung des NE81 als „*primitives*“ Lamin, wurden im Rahmen dieser Arbeit verschiedene Experimente durchgeführt, die strukturelle und funktionelle Gemeinsamkeiten zu den Laminen in anderen Organismen aufzeigen konnten.

Die Herstellung eines polyklonalen Antikörpers ermöglichte die Verifizierung der subzellulären Lokalisation des NE81 durch Elektronenmikroskopie und gab Einblicke in das Verhalten des endogenen Proteins innerhalb des Zellzyklus. Mit der Generierung von NE81-Nullmutanten konnte demonstriert werden, dass NE81 eine wichtige Rolle bei der nukleären Integrität und der Chromatinorganisation von Zellen spielt. Des Weiteren führte die Expression von zwei CaaX-Box deletierten NE81 - Varianten dazu, den Einfluss des Proteins auf die mechanische Stabilität der Zellen nachweisen zu können. Auch die Bedeutung der hochkonservierten CaaX-Box für die Lokalisation des Proteins wurde durch die erhaltenen Ergebnisse deutlich. Mit der Durchführung von FRAP-Experimente konnte außerdem die strukturgebende Funktion von NE81 innerhalb des Zellkerns bekräftigt werden. Zusätzlich

wurde im Rahmen dieser Arbeit damit begonnen, den Einfluss der Isoprenylcysteinylcarboxylmethyltransferase auf die Lokalisation des Proteins aufzuklären.

Die Entdeckung eines laminähnlichen Proteins in einem einzelligen Organismus, der an der Schwelle zu den Metazoen steht, ist für die evolutionäre Betrachtung der Entwicklung der sozialen Amöbe und für die Erforschung der molekularen Basis von Laminopathien in einem einfachen Modellorganismus sehr interessant. Die Arbeit mit *Dictyostelium discoideum* könnte daher Wege aufzeigen, dass Studium der Laminopathien am Tiermodell drastisch zu reduzieren.

In den letzten Jahren hat die Erforschung unbekannter Bestandteile des Centrosoms in *Dictyostelium discoideum* große Fortschritte gemacht. Eine zu diesem Zwecke von unserer Arbeitsgruppe durchgeführte Proteomstudie, führte zur Identifizierung weiterer, potentiell centrosomaler Kandidatenproteine.

Der zweite Teil dieser Arbeit beschäftigt sich mit der Charakterisierung eines solchen Kandidatenproteins, dem CP75. Es konnte gezeigt werden, dass CP75 einen echten, centrosomalen Bestandteil darstellt, der mikrotubuli-unabhängig mit der *Core* Struktur des Zellorganells assoziiert ist. Weiterhin wurde deutlich, dass die Lokalisation am Centrosom in Abhängigkeit vom Zellzyklus erfolgt und CP75 vermutlich mit CP39, einem weiteren centrosomalen *Core* Protein, interagiert.

II. Summary

Lamins build the nuclear lamina together with lamin-associated proteins. The latter is required for mechanical stabilization of cells, chromatin organization, gene expression, cell cycle progression and cell migration. This became evident by the pathogenesis of laminopathies. Laminopathies are diseases which arise from mutations in genes encoding lamins, lamin-associated-or lamin-processing proteins. Prominent examples are the „*Hutchinson-Gilford progeria syndrome*“, the „*Emery-Dreifuss*“ muscular dystrophy and dilated cardiomyopathy. Despite their universal importance, lamins have only been found in metazoans, but not in unicellular organisms so far.

The amoeboid organism *Dictyostelium discoideum* is a haploid eukaryote widely used in different fields of cell biology. With the discovery of NE81, a protein associated with the inner nuclear membrane of *Dictyostelium discoideum*, for the first time a protein was identified, whose properties justify denomination as a lamin-like protein in a lower eukaryote. This is based on the presence of lamin-typical sequences such as a CDK1 phosphorylation

consensus sequence, followed by a central rod domain, a typical nuclear localization sequence and the highly conserved CaaX box. For the verification of NE81 as a primitive lamin, various different experiments were conducted in the frame of this work, which revealed structural and functional similarities to lamins of other organisms.

Analysis of the behavior of the endogenous protein in cell cycle and the verification of the subcellular localization with electron microscopy was done with the generation of a polyclonal antibody. With a NE81 null mutant, it could be shown, that NE81 plays an important role in nuclear integrity and chromatin organization. The expression of two CaaX-box deleted protein variants confirmed the influence of NE81 on the mechanical stability of cells. These results furthermore underlined the importance of the presence of the highly conserved CaaX-box. FRAP-experiments further emphasized the structural function of NE81 in the nucleus. Furthermore, first steps were undertaken to determine the influence of the Isoprenylcysteinecarboxylmethyltransferase on the localization of NE81.

In the light of evolution the discovery of a lamin-like protein in a unicellular organism is very interesting and could provide a simple experimental system for studies of the molecular basis of laminopathies. Hence, the study on laminopathies in animal models could be reduced dramatically.

The identification of unknown centrosomal components in *Dictyostelium discoideum* has made significant proceedings in the last years. A proteomic approach which was accomplished for this purpose, yielded several potential centrosomal candidate proteins. The second part of this work focuses on the characterization of one of these proteins, CP75. It could be shown that CP75 is a genuine, centrosomal component, which is associated with the centrosomal core structure independently of microtubules. Furthermore, it could be demonstrated, that the localization of CP75 is cell cycle-dependent and that it presumably interacts with the core protein CP39.

1 Einleitung

1.1 *Dictyostelium discoideum* als Modellorganismus

Dictyostelium discoideum ist ein simpler, aber sehr faszinierender eukaryotischer Mikroorganismus, der erstmals im Jahre 1935 durch Raper beschrieben wurde (Raper, 1935).

Die taxonomische Einordnung von *Dictyostelium* Amöben ist bis heute umstritten. Einige ihrer Merkmale wie Chemotaxis, Phagozytose oder die Produktion von Glykogen als Speicherform für Kohlenhydrate gleichen denen der Tiere, während die Produktion von Zellulose charakteristisch für Pflanzen ist. Erst kürzlich konnte anhand von Genomvergleichen gezeigt werden, dass eine Abzweigung vom eukaryotischen Stammbaum nach den Pflanzen, aber noch vor der Auseinanderentwicklung der Tiere und Pilze stattfand (Eichinger *et al.*, 2005).

Der natürliche Lebensraum der 10-20 µm kleinen Amöbe ist der Waldboden. Sie ernährt sich durch Phagozytose von den Bakterien und Hefen in ihrem Lebensraum und ist im vegetativen Zustand ein Einzeller, der sich durch Teilung der Zellen vermehrt (Annesley und Fisher, 2009; Robertson und Grutsch, 1981).

Eine Besonderheit von *Dictyostelium* stellt sein Lebenszyklus dar. Wird die Nahrungsquelle entzogen bzw. kommt es zu einem ungünstigen Verhältnis von Nahrung und der eigenen Zelldichte, verlassen die amöbiden Einzeller ihre vegetative Wachstumsphase. Die Zellen aggregieren als Antwort auf von einzelnen Zellen freigesetzten cAMP-Signalen durch Chemotaxis. Dabei finden sich 10^5 - 10^6 Zellen zusammen, die eine Reihe morphologischer Veränderungen durchlaufen (Gerisch *et al.*, 1975; Katoh *et al.*, 2007; Devreotes, 1989). Zuerst erfolgt die Formation eines vertikalen, konusförmigen „Slug“-Stadiums, welches in der Ausbildung einer multizellulären Struktur, dem Fruchtkörper endet (**Abbildung 1**). Dieser ist von einer extrazellulären Matrix umgeben und besteht aus Stielzellen und Sporen. Fast 1/3 der Zellen opfern sich für die Entstehung des Stiels und sichern somit das Überleben der restlichen Population. Dieses Phänomen führte auch zu der Bezeichnung der „sozialen Amöbe“ (Alvarez-Curto *et al.*, 2007; Fortunato *et al.*, 2003). Der ausgebildete Fruchtkörper mit den enthaltenen Sporen ist in der Lage, widrigen Umweltbedingungen zu widerstehen (Gerisch *et al.*, 1975). Jedoch können die Sporen bei günstigen äußeren Voraussetzungen und einem ausreichenden Nahrungsangebot zu einzelligen Amöben auskeimen. Somit weist *Dictyostelium* einen vegetativen Lebensabschnitt, in dem die Zellen

Einleitung

als amöbide Einzeller leben, als auch einen multizellulären Entwicklungsabschnitt auf (Eichinger *et al.*, 2005).

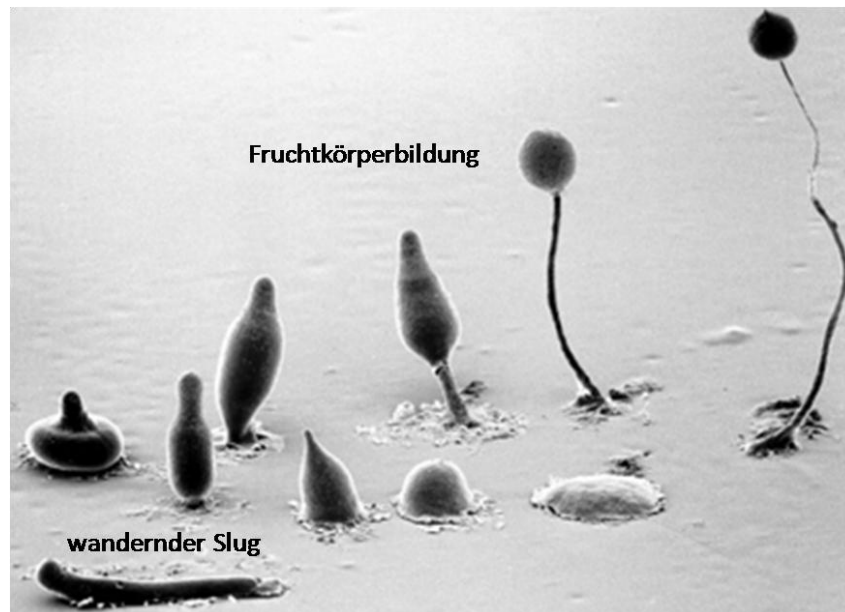


Abbildung 1 Der Lebenszyklus von *Dictyostelium discoideum*.

Elektronenmikroskopische Aufnahmen von M.J. Grimson und R.L.Blanton (Biological Sciences Electron Microscopy Laboratory, Texas Tech University).

Der zelluläre Schleimpilz *Dictyostelium discoideum*, hat in den letzten Jahren mit dem Abschluss des Genomprojekts 2005 (www.dictybase.org) zunehmend an Bedeutung als Modellorganismus in der Zell- und Entwicklungsbiologie gewonnen (Eichinger *et al.*, 2005). Dies resultiert aus einer Vielzahl von Ähnlichkeiten, die dieser Schleimpilz im Vergleich zu anderen höheren eukaryotischen Zellsystemen besitzt und führte zu der Aufnahme als eines von 10 Nicht-Säuger –Modellorganismen durch die *National Institutes of Health* (NIH) in den USA.

Die Kultivierung des Organismus ist einfach, kostensparend und kann auf festen Nährmedien, beziehungsweise in Flüssigmedien adhärent oder als Schüttelkultur erfolgen. Innerhalb von wenigen Tagen kann so eine große Zellmenge kultiviert und für biochemische und molekularbiologische Untersuchungen genutzt werden.

Die Beliebtheit von *Dictyostelium* in vielen Laboren resultiert auch aus einer erfolgreich durchgeführten Etablierung zahlreicher zellbiologischer, biochemischer und molekularbiologischer Techniken. Dazu zählen unter anderem die spezifische Geninaktivierung durch homologe Rekombination, Restriktionsenzym-vermittelte Integration linearer DNA-Fragmente (REMI), die Anwendung der RNAi-Technologie, oder die Expression fluoreszierender Proteine. Dies ist gekoppelt mit einer guten Zugänglichkeit für mikroskopische Methoden (Williams *et al.*, 2006; Kuspa *et al.*, 1995; Kuspa und Loomis, 1992; Koch *et al.*, 2006; Martens *et al.*, 2002; Eichinger *et al.*, 2005).

Einleitung

Das 34 Mb große komplett sequenzierte Genom, einschließlich der in Multikopienzahl vorhandenen 90 kb extrachromosomalen Elemente, wie rRNA-Gene und das mitochondriale Genom, kodieren ungefähr 12500 Proteine. Es ist in sechs Chromosomen organisiert, wobei die Größe der Chromosomen von 3,5- 8,5 Mb variiert (Eichinger *et al.*, 2005). Im parasexuellen Zustand liegen die Chromosomen im haploiden Zustand vor und erleichtern bedeutend die Herstellung und Isolation von Mutanten im Vergleich zu anderen genetisch manipulierbaren Zellsystemen.

Im Rahmen des Genomprojektes konnte eine Vielzahl von Proteinen identifiziert werden, die mit entsprechenden Homologen von Vertebraten eng verwandt sind. Darunter befinden sich 33 Proteine, die beim Menschen mit Krankheiten in Verbindung gebracht werden (Williams *et al.*, 2006). Somit ist dieser Eukaryot ein idealer Modellorganismus, um Fragestellungen zu untersuchen, die bei humanen Erkrankungen eine Rolle spielen. Ein Beispiel für den Nutzen dieser Amöbe, ist die Erforschung der Resistenzen von Tumorzellen gegen Chemotherapeutika. Mit Hilfe verschiedener genetischer Manipulationen am *Dictyostelium* Genom konnten sechs Gene identifiziert werden, die mit einer Cisplatinresistenz von Tumorzellen in Verbindung gebracht werden. Damit wird deutlich, dass die Verwendung des Schleimpilzes bei der Aufdeckung von Arzneimittelresistenzen und bei der Entwicklung von Strategien zur Steigerung des therapeutischen Nutzen von Arzneimitteln sehr bedeutend sein kann (Williams *et al.*, 2006; Niedner *et al.*, 2001).

1.2 Die Organisation der Kernhülle in Metazoen

Die Kernhülle stellt einen hoch geordneten Komplex innerhalb der Zelle dar und trennt das nukleäre Kompartiment mit der Maschinerie für DNA- und RNA-Synthese vom Cytoplasma und den Zellorganellen ab. Sie besteht aus zwei Lipiddoppelschichten, der inneren und äußeren Kernmembran, die über die Kernporenkomplexe miteinander verbunden sind (**Abbildung 2**) (Gruenbaum *et al.*, 2003; Liu, 2009).

Einleitung

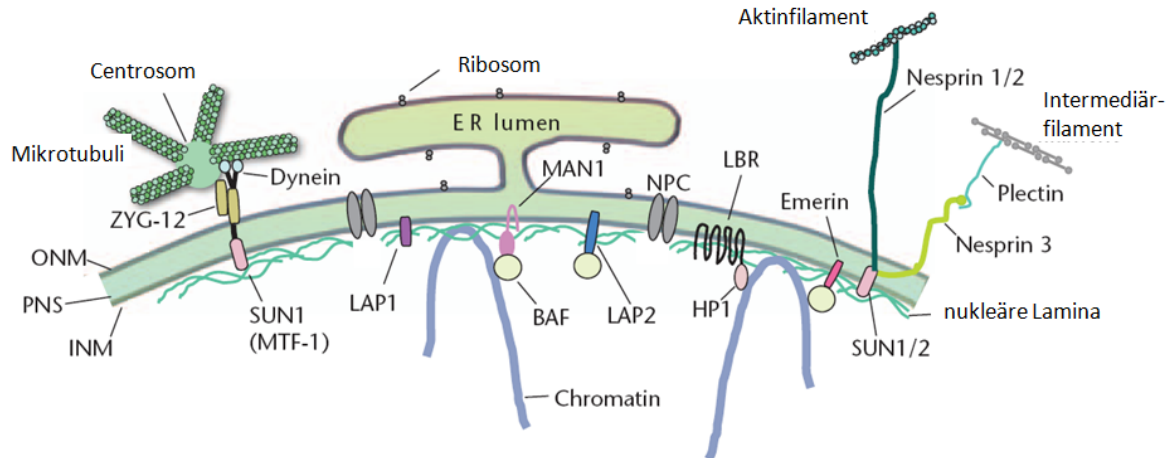


Abbildung 2 Übersicht über die strukturelle Organisation der Kernhülle in eukaryotischen Zellen

Die innere und äußere Membran sind durch einen perinukleären Spalt voneinander getrennt. Die nukleären Lamine sind eng mit dem Chromatin und der nukleoplasmatischen Seite der inneren Kernmembran verbunden. Einige ausgewählte Proteine sind dargestellt. Die LEM-Proteine, LAP1, Emerin und MAN1, binden an BAF (barrier-to-autointegration factor), LBR (Lamin B Rezeptor) bindet an HP1 (Heterochromatin Protein). BAF und HP1 sind DNA-bindende Proteine und verbinden somit die LEM-Proteine und LBR mit dem Chromatin. Die Cytoskelett-assoziierten Nesprine interagieren mit den Proteinen der inneren Kernmembran, Sun1 und Sun2 und stellen somit eine Verbindung zwischen dem Cytoskelett und dem Nucleoskelett her. In *C. elegans* bindet Sun1 an das KASH-Protein Zyg-12, das an das Centrosom bindet und somit eine Verbindung zwischen Centrosom und Zellkern herstellt. Modifiziert nach Liu 2009)

Das Lumen zwischen den beiden Membranen wird als perinukleärer Raum bezeichnet und besitzt eine Dicke von 30-50 nm (Wilson und Foisner, 2010). Während die äußere Membran ein Kontinuum mit der Membran des endoplasmatischen Retikulums darstellt, unterscheidet sich die innere Membran strukturell und funktionell durch die Proteinzusammensetzung. Unterhalb der inneren Kernmembran befindet sich ein filamentöses Netzwerk, das als nukleäre Lamina bezeichnet wird (Aebi *et al.*, 1986).

Die nukleäre Lamina besteht aus spezialisierten Intermediärfilamenten, den Laminen und assoziierten Proteinen und stellt einen essentiellen Bestandteil von Metazoenzellen dar (Ralle *et al.*, 2004; Harborth *et al.*, 2001). Neben den nukleären Intermediärfilamenten existieren auch cytoplasmatische Intermediärfilamente, die sich durch wichtige Strukturelemente von den nukleären Intermediärfilamenten unterscheiden. Zu den Merkmalen die bei den cytoplasmatischen Intermediärfilamenten nicht vorhanden sind, zählen die Kernlokalisationssequenz (NLS) und ein hoch konserviertes Strukturmotiv, die sogenannte CaaX-Box, die als Objekt mehrfacher posttranslationaler Modifikationen dient (Loewinger und McKeon, 1988; Chelsky *et al.*, 1987; Chelsky *et al.*, 1989; Beck *et al.*, 1988; Beck *et al.*, 1990; Wolda und Glomset, 1988; Farnsworth *et al.*, 1989; Vorburgen *et al.*, 1989; Kitten und Nigg, 1991)

Die nukleäre Lamina und das Cytoskelett sind über den sogenannten „LINC-Komplex“ (*linker of nucleoskeleton and cytoskeleton*) miteinander verbunden (Stewart-Hutchinson *et al.*, 2008).

Die Hauptbestandteile dieses Komplexes bilden die KASH-Domäne Proteine und die Sun-Domäne Proteine, die in die äußere bzw. die innere Kernmembran eingebettet sind und über den perinuklären Raum eine Verbindung zwischen der Lamina und dem Cytoskelett herstellen (Dahl *et al.*, 2008; Stewart-Hutchinson *et al.*, 2008; Östlund *et al.*, 2009). Die Proteine der Sun Familie sind von der Hefe bis zum Menschen konserviert und werden charakterisiert durch eine Sun Domäne, die zuerst in *S. pombe* und *C. elegans*, Sad1 und Unc-84, identifiziert wurde (Wilson und Foisner, 2010). Sun Proteine zählen zu den Typ II Transmembranproteinen der Kernhülle, d.h. der C-Terminus ist in Richtung des perinukleären Raums orientiert. Sun1 und Sun2 stellen die am besten untersuchten Proteine der Sun Familie dar und sind bekannt dafür, Komplexe mit KASH-Domäne Proteine zu bilden. Diese zeichnen sich durch eine KASH-Domäne (Klarsicht/Anc-1/Syne-1 Homologie) im C-terminalen Bereich aus. Die meisten KASH-Domäne Proteine gehören zu den Nesprinen, die ihrerseits direkt oder indirekt mit den Bestandteilen des Cytoskelett Kontakt aufnehmen (Razafsky und Hodzic, 2009). Andere KASH-Domäne Proteine wie Zyg-12 sind direkt mit dem Centrosom assoziiert und stellen in Embryos von *C. elegans* eine Verbindung zwischen Kernhülle und Centrosom her (Minn *et al.*, 2009)

Die LINC-Komplexe übernehmen eine Funktion bei der Positionierung des Zellkerns, der Chromosomenbewegungen und der mechanischen Kraftübertragung vom Cytoskelett auf den Zellkern.

1.3 Die Organisation der Kernhülle in *Dictyostelium discoideum*

Bis heute ist wenig bekannt über den strukturellen und molekularen Aufbau der Kernhülle von *Dictyostelium discoideum*. Sun1, Interaptin und Nup43, ein Protein der Kernporenkomplexe, sind die einzigen bis heute bekannten Proteine die mit dem Kern der sozialen Amöbe assoziiert sind (Schulz *et al.*, 2009; Xiong *et al.*, 2008). Das aktinbindende Interaptin ist ein Protein der äußeren Kernhülle und besitzt eine mögliche, schwach konservierte KASH-Domäne, interagiert jedoch nicht mit der Sun-Domäne von Sun1. Sun1 ist bei *Dictyostelium* ein elementarer Proteinbestandteil beider Kernmembranen und vermittelt eine permanente Verbindung zwischen dem Zellkern und dem Centrosom (Schulz *et al.*, 2009).

Wie in anderen einzelligen Organismen auch, konnten bisher keine Intermediärfilamente und somit auch keine Lamine detektiert werden (Melcer *et al.*, 2007).

Einleitung

Die Mitose erfolgt, wie bei den meisten Einzellern, geschlossen, d.h. die Kernhülle bleibt im Gegensatz zu den meisten mehrzelligen Organismen während der Zellteilung intakt (Moens, 1976).

Dictyostelium wächst unter optimalen Bedingungen als einzellige Amöbe. Bei veränderten äußeren Umweltbedingungen ist dieser Organismus jedoch in der Lage, multizelluläre Strukturen auszubilden. Vom evolutionären Standpunkt aus betrachtet, befindet sich die soziale Amöbe daher zwischen den Protisten, die keine Lamina besitzen, und den mehrzelligen Organismen, die eine nukleäre Lamina ausbilden (Kessin, 2001). Im Gegensatz zu vielen Protisten und Pilzen besitzen *Dictyostelium* Amöben keine spezifischen Strukturen, um die mechanische Belastbarkeit der Membranen zu erhöhen, wie zum Beispiel durch das Vorhandensein von Pellikula und Chitin-basierten Zellwänden. Trotzdem sind diese Organismen in der Lage widrigen äußeren Umweltbedingungen zu widerstehen. In diesem Zusammenhang konnte kürzlich eine wichtige Rolle der nukleären Lamina und der SUN/KASH Komplexe in embryonalen Fibroblasten gezeigt werden (Stewart-Hutchinson *et al.*, 2008). Daher ist zu erwarten, dass auch einzellige Organismen Proteine benötigen, welche die Funktion von Laminen übernehmen, wie zum Beispiel die mechanische Stabilisierung des Nukleus, die Regulation der Chromatinorganisation und der DNA-Synthese (Andres und Gonzalez, 2009).

1.4 Lamine

Lamine werden den Intermediärfilamenten vom Typ V zugeordnet und zählen neben Aktinfilamenten und Mikrotubuli zu den wichtigsten strukturellen Elementen in mehrzelligen Organismen (McKeon, 1987; Goldman *et al.*, 1986). In Pflanzen, Pilzen und Protozoen sind bis heute keine Intermediärfilamente gefunden worden (Herrmann *et al.*, 2009). Pflanzen und Pilze benötigen überdies auch kein cytolisches Netzwerk an Intermediärfilamenten zur Stabilisierung der Zellen, da sie eine massive Zellwand besitzen (Wang und Stamenovic, 2000).

Die Existenz von Laminen bereits in primitiven Mehrzellern wie *Hydra* (Cnidaria), die keine cytosolischen Intermediärfilamente exprimieren, führte zu der Annahme, dass Lamine als Vorläufer der Intermediärfilamente zu sehen sind (Melcer *et al.*, 2007).

Der Vergleich von Sequenzhomologien, Expressionsmustern, strukturellen Merkmalen, biochemischen und dynamischen Eigenschaften führte zu der Einteilung in A- und B-Typ-Lamine, die jeweils ein Molekulargewicht von 60-80 kDa besitzen (Benavente und Krohne, 1986; McKeon, 1987). Die Lamine A und C stellen die Hauptvertreter der A-Typ Lamine dar.

Sie werden von einem gemeinsamen Gen kodiert (LMNA-Gen), durchlaufen aber alternative Spleißprozesse (Lammerding *et al.*, 2005). Bei den B-Typ Laminen unterscheidet man ebenfalls mehrere Varianten, wobei B1 und B2 die häufigsten Vertreter darstellen. Diese werden im Gegensatz zu den A-Typ Laminen von separaten Genen kodiert (LMNB1, LMNB2) (Lammerding *et al.*, 2004; Vorburget *et al.*, 1989).

Die meisten Vertebraten exprimieren typischerweise vier Lamin Isoformen (A, B, B1, B2). Die Ausnahme bildet hierbei *Xenopus* mit drei B-Typ Lamingenen (Melcer *et al.*, 2007). Bei den Invertebraten wie *Hydra* und *C. elegans* wird häufig nur eine Lamin Isoform exprimiert, die zu den B-Typ Laminen zählt. Eine Besonderheit stellt hierbei *Drosophila* dar, die neben B-Typ Laminen auch A-Typ Lamine exprimieren.

Die Expression der Lamine innerhalb des Zellkerns ist sehr unterschiedlich. So werden die Lamine vom Typ B in allen Zellen exprimiert und sind notwendig für das Überleben der Zellen. Dies konnte durch eine verminderte Expression der B-Typ Lamine mit Hilfe von RNAi gezeigt werden, die in Mäusen und *C. elegans* letal war (Vergnes *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2000). Im Gegensatz dazu werden die Lamine vom Typ A nur in differenzierten Zellen exprimiert und sind für das Überleben der Zelle nicht essentiell (Lammerding *et al.*, 2005; Melcer *et al.*, 2007; Gerace und Blobel, 1980)

1.5 Die Funktion von Laminen

Lamine übernehmen in der Zelle eine Vielzahl von Funktionen, die sich mit der hohen Anzahl von Bindungsaktivitäten erklären lassen (**Abbildung 2**). Aufgrund dieser Tatsache wurde der Begriff der Lamina-assoziierten Polypeptide (LAP) definiert. Die Lamina-assoziierten Polypeptide bezeichnen eine Gruppe von Proteinen, die zusammen mit Laminen aus dem Zellkern co-fraktioniert werden können (Senior und Gerace, 1988; Foisner und Gerace, 1993). Infolgedessen können Lamine direkt oder indirekt durch die Wechselwirkung mit dem nukleären Matrixprotein BAF (*barrier to autointegration factor*), oder durch die Interaktion mit anderen Proteinen, Kontakt zum Chromatin aufnehmen, bzw. mit Transkriptionsfaktoren und Histonen interagieren (Stierle *et al.*, 2003). Damit haben sie einen wichtigen Einfluss auf die Chromatinorganisation und Genexpression bzw. stellen ein elementares Grundgerüst für andere Proteine dar, die an der DNA-Regulation, der Reaktion auf Schädigungen der DNA, der Gentranskription, des Fortschreitens des Zellzyklus und an der Zellmigration beteiligt sind (Andres und Gonzalez, 2009).

Des Weiteren zählen zu den zahlreichen Bindungspartnern Proteine der Kernporenkomplexe und der inneren Kernmembran, wie zum Beispiel Emerin, oder Proteine die eine Sun Domäne

besitzen. Diese wiederum interagieren mit Mitgliedern in der äußeren Kernmembran, die eine KASH-Domäne besitzen. Daraus resultiert eine wichtige Funktion der Lamine bei der Organisation der Kernporenkomplexe und bei der Aufrechterhaltung der Struktur und der mechanischen Festigkeit des Zellkerns (Shimi *et al.*, 2008; Lammerding *et al.*, 2004; Lammerding *et al.*, 2006; Dechat *et al.*, 2010; Schulze *et al.*, 2009). Das Multikomponentensystem das aus den zahlreichen Proteininteraktionen entsteht, spielt bei der strukturellen und dynamischen Integrität der Zelle eine entscheidende Rolle (Herrmann *et al.*, 2007; Schulze *et al.*, 2009).

1.6 Der Aufbau von Laminen

Wie alle Intermediärfilamente bestehen Lamine aus einer zentralen, α -helikalen „Rod“-Domäne mit einer Sequenzlänge von ca. 350-360 Aminosäuren, flankiert von einer kurzen, globulären aminoterminalen Kopfdomäne und einer langen, carboxyterminalen Schwanzdomäne, die stark in der Länge und Sequenz variiert (**Abbildung 3**) (Parry *et al.*, 1986; Hanukoglu und Fuchs, 1982; Hanukoglu und Fuchs, 1983; Steinert und Roop, 1988; Fuchs und Weber, 1994).

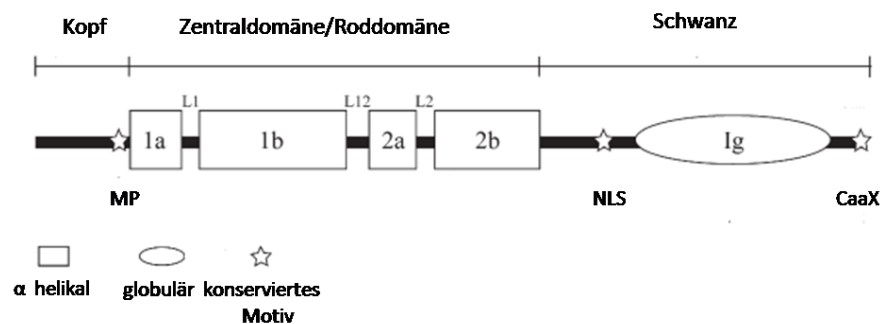


Abbildung 3: Abbildung des strukturellen Aufbaus von Laminen

Die Position der Kopf-, Zentral- und Schwanzdomäne sind über dem Schema dargestellt. Die Zentraldomäne besteht aus vier *coiled-coil* Bereichen (1a, 1b, 2a, 2b) die durch drei Linkersequenzen (L1, L12, L2) voneinander separiert werden. Weiterhin ist die Position der mitotischen Phosphorylierung von Laminen durch die CDK1-Kinase (MP), die NLS (Kernlokalisationssequenz) und die CaaX-Box dargestellt. Modifiziert nach Melcer *et al.* 2007

Die zentrale „Rod“-Domäne (Zentraldomäne) setzt sich aus vier subhelikalen Strukturen zusammen (1a, 1b, 2a und 2b). Diese lassen eine Regelmäßigkeit in der Aminosäureanordnung erkennen. Sieben Aminosäuren (Heptade) bilden eine sich wiederholende Grundeinheit der Form (a-b-c-d-e-f-g)n, in der zu 75 % jede erste (a) und vierte (d) Position von einer hydrophoben Aminosäure besetzt wird (Hanukoglu und Fuchs, 1982; Steinert und Roop, 1988). Diese Anordnung von Aminosäuren wird auch als *coiled-coil* Struktur bezeichnet und befähigt die nukleären Lamine Dimere und somit höhere Strukturen

auszubilden (Schulze *et al.*, 2009; Stuurman *et al.*, 1999). Des Weiteren ist auch die aminoternale Kopfdomäne an der Zusammenlagerung von Laminen beteiligt.

Die vier *coiled-coil* Strukturen in der Zentraldomäne werden durch drei kurze Linkersegmente, L1, L12 und L2 voneinander separiert (Melcer *et al.*, 2007; Parry *et al.*, 1986). Der Zentraldomäne geht eine mitotische Phosphorylierungsstelle voran, die für die Dissassemblierung des Laminskeletts während der Mitose notwendig sind (Nigg, 1992; Peter *et al.*, 1991; Heald und McKeon, 1990). Diese Dissassemblierung der Lamine ist ein Schlüsselereignis für den Zusammenbruch der Kernhülle höherer Zellen beim Eintritt in die Mitose (Foisner, 2003). Nach ihrer Phosphorylierung gehen die A-Typ Lamine in den gelösten Zustand über, während die B-Typ Lamine in der Mitose mit der Kernmembran assoziiert bleiben (McKeon, 1987)

Neben der angesprochenen Phosphorylierungsstelle vor dem Beginn der α -helikalen Zentraldomäne, existieren noch potenzielle Phosphorylierungsstellen, die sich direkt hinter der Zentraldomäne im globulären Proteinbereich befinden (Nigg, 1992; Peter *et al.*, 1991; Heald und McKeon, 1990).

Im Bereich der Schwanzdomäne befindet sich im Gegensatz zu cytoplasmatischen Intermediärfilamenten ein hoch konserviertes Strukturmotiv, die Immunoglobulin Faltungsstelle (*Ig fold*), die eine wichtige Funktion bei der Protein-Protein Interaktion und bei der Interaktion mit der DNA spielt. Ausnahmen bilden hierbei Tunicaten wie *Ciona intestinalis*, bzw. *C. elegans*, bei der sie nur verkürzt auftritt (Riemer *et al.*, 2000). Außerdem finden sich im C-terminalen Bereich ein Kernlokalisierungssignal (NLS) und eine CaaX-Box (C:Cystein, a:aliphatische Aminosäure, X: Methionin, Serin). Während die NLS bei der Lokalisation der Lamine im Kerninneren von Bedeutung ist, stellt die CaaX-Box ein hoch konserviertes Sequenzelement dar (Zastrow *et al.*, 2006; Schulze *et al.*, 2009; Loewinger und McKeon, 1988)Liu, 2009). Dieses ist bei den A- und B- Laminen zu finden. Das CaaX-Motiv triggert eine Reihe posttranslatinaler Modifikationen, die dem C-Terminus der nukleären Lamine eine gewisse Hydrophobizität verleiht und damit die Assoziation der Lamine mit der inneren Kernmembran ermöglicht (Hofemeister *et al.*, 2000; Maske *et al.*, 2003; Gruenbaum *et al.*, 2003; McKeon, 1987; Loewinger und McKeon, 1988; Vorbürger *et al.*, 1989; Holtz *et al.*, 1989).

1.7 Die Prozessierung der Lamine

Alle Lamine werden als Prolamine translatiert und benötigen zum reifen und funktionstüchtigen Lamin verschiedene Modifikationen (Rusinol und Sinensky, 2006; Davies

Einleitung

et al., 2009). Das entscheidende Prozessierungssignal für die posttranslationalen Veränderungen ist die CaaX-Box im carboxyterminalen Bereich der Lamine. Die Prozessierung läuft nach einem streng geordneten Schema ab, wobei nicht bei allen Schritten klar ist, ob die enzymatischen Vorgänge am endoplasmatischen Retikulum (ER), oder innerhalb des Kerns stattfinden (**Abbildung 4**).

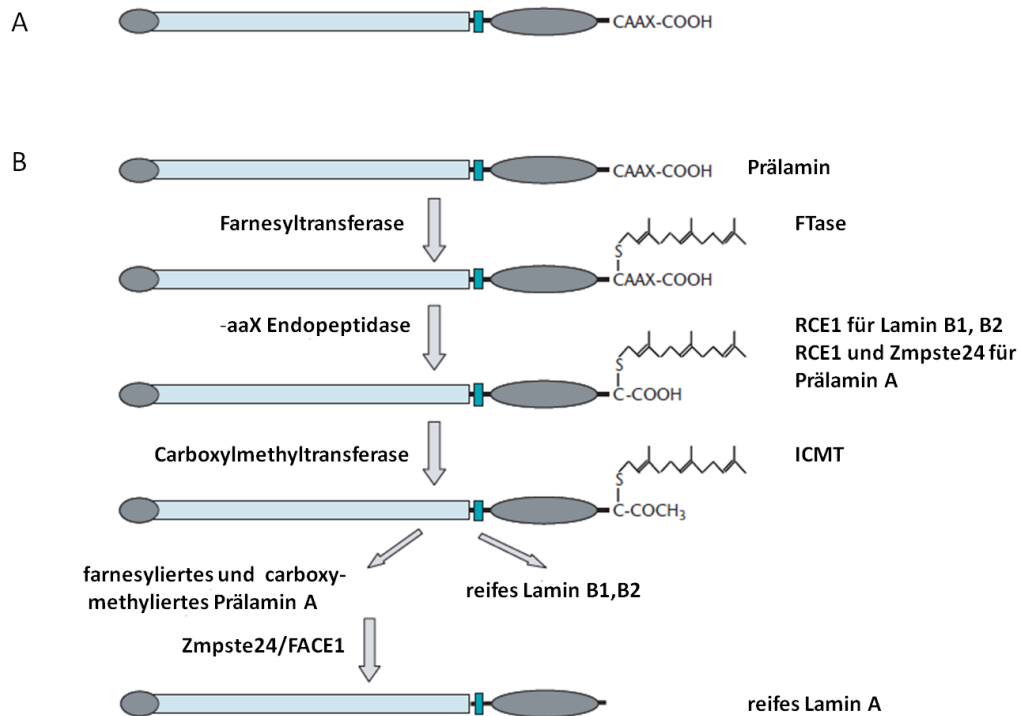


Abbildung 4: Darstellung der Struktur nukleärer Lamine.

A: Prälamine besitzen eine Kopf-, Zentral- („Rod“) und Schwanzdomäne, einschließlich einer NLS (Kernlokalisationssequenz), einer Ig-Faltungsstelle und eines C-terminalen CaaX-Motives.

B: Posttranslationale Modifizierung des Prälamins A, B1, B2. Modifiziert nach Liu, 2009.

Zu Beginn erfolgt die Farnesylierung des Cysteinrestes im Bereich der CaaX-Box durch eine Farnesyltransferase (Farnsworth *et al.*, 1989; Lutz *et al.*, 1992; Zhang und Casey, 1996). Farnesyltransferasen zählen den Proteinprenyltransferasen und werden in Säugern und niederen Eukaryoten gefunden. Das Enzym liegt als Heterodimer, das aus einer α - und einer β - Untereinheit besteht, vor. Die α - Untereinheit kann alternativ für die Funktion der Geranylgeranyltransferase verwendet werden, die ähnlich wie die Farnesyltransferase der Anheftung von Lipidankern an CaaX-Motiv enthaltende Proteine dient.

Der Lipidmodifikation folgen eine Reihe weiterer Prozessierungsschritte. Dazu zählt die Entfernung der drei randständigen Aminosäuren (-aaX) durch eine CaaX-Prenylprotease (Beck *et al.*, 1990). Diese Endopeptidase zählt zur Familie der Zinkmetalloproteasen. Im Menschen konnten bereits zwei Vertreter identifiziert werden: Rce2 (*Ras-converting enzyme*) und Zmpste24 (*Zinc metalloprotease related to the STE24 homolog in Yeast*), auch bekannt

als FACE1 (*farnesylated –proteins converting enzyme*) (Boyartchuk *et al.*, 1997; Corrigan *et al.*, 2005). Nach der Abspaltung der randständigen Aminosäuren findet die Methylierung des C-terminalen Cysteins durch die Isoprenylcysteinocarboxylmethyltransferase (ICMT) statt (Winter-Vann und Casey, 2005). Im Unterschied zu den Laminen vom Typ A ist die Prozessierung der Lamine vom B-Typ hiermit abgeschlossen. Man spricht dann von einem reifen Lamin. Die A-Lamine durchlaufen noch einen zusätzlichen Schritt, um in die endgültige Laminform überführt zu werden. Mit Hilfe der Endopeptidase Zmpste24/FACE1 erfolgt eine zusätzliche Abspaltung von 15 Aminosäuren am carboxyterminalen Ende des Proteins (Corrigan *et al.*, 2005). Dadurch entstehen funktionstüchtige A-Typ Lamine ohne farnesylierte und methylierte Modifikationen. C-Typ Lamine enthalten aufgrund einer kürzeren Proteinsequenz keine CaaX-Box, so dass die posttranslationalen Modifikationen entfallen.

1.8 Laminopathien

Störungen dieser Prozessierungsschritte aufgrund von Defekten in Proteinen, die an der posttranslationalen Modifikation der nukleären Lamina beteiligt sind, oder aufgrund von Mutationen in den Lamingenen selbst, führen zu Laminopathien. Diese sind seltene, humane degenerative Erkrankungen mit einem weiten Spektrum von klinischen Phänotypen. Bei den laminkodierenden Genen ist das Gen der A-Typ Lamine (LMNA) bevorzugt betroffen, da Mutationen in den B-Typ Laminen meist nicht mit dem Leben vereinbar sind. Die erste und bis heute einzige krankhafte Veränderung im LMNB-Gen wurde 2006 für das „*Barraquer Syndrom*“ beschrieben (Hegele *et al.*, 2006).

Laminopathien können gewebsspezifische Erkrankungen, oder multiple systemische Erkrankungen hervorrufen. Weiterhin sind sie auch an allgemeinen Erkrankungen wie z.B. Krebs beteiligt (Foster *et al.*). Die Einteilung der Laminopathien erfolgt anhand des betreffenden Gewebes in vier Gruppen. Die erste Gruppe umfasst die Erkrankungen der muskulären Dystrophien, die durch einen Schwund der Muskulatur charakterisiert sind. Dazu zählen beispielsweise die „*Emery-Dreifuss*“ muskuläre Dystrophie und die erweiterte Kardiomyopathie. Die zweite Gruppe beinhaltet die Lipiddystrophien, die sich durch eine abnormale Verteilung des Fettgewebes auszeichnen und auch mit metabolischen Störungen, wie Diabetes mellitus assoziiert sein können. Dazu zählt beispielsweise das „*Barraquer-Simons*“ *Syndrom*, das auch als progressive Lipiddystrophie bezeichnet wird. Die nächste Gruppe umfasst die systemischen Laminopathien, bei denen die assoziierten Symptome und Effekte eine Vielzahl von Geweben betreffen und Merkmale einer frühzeitigen Alterung enthalten. Zu diesen Laminopathien zählen das „*Hutchinson-Gilford Progerie Syndrom*“ und

das „*Werner Syndrom*“. Die vierte Gruppe dieser Erkrankungen umfasst die Laminopathien, die Symptome verschiedener Erkrankungen miteinander kombinieren z.B. Merkmale einer Lipiddystrophie kombiniert mit Veränderungen der kardialen und Skelettmuskulatur (Worman *et al.*, 2010).

Es gibt zwei mögliche Erklärungen für das Auftreten der vielfältigen, laminspezifischen Phänotypen in den Geweben. Die strukturelle Hypothese besagt, dass Veränderungen in den Laminen zu einer erhöhten Fragilität des Zellkerns und einer gestörten Verbindung zwischen Nukleo- und Cytoskelett führen. Dies resultiert in einer Zellschädigung in mechanisch gestresstem Gewebe, wie zum Beispiel in den Muskeln.

Die genregulatorische Hypothese besagt, dass Lamine an eine Vielzahl von regulierenden Proteinen binden, die einen Einfluss auf die Transkription haben. So wurde unter anderem beobachtet, dass in Lamin A/C-defizienten embryonalen Mäusefibroblasten die einem erhöhten mechanischen Stress ausgesetzt waren, die Expression von Genen reduziert war, die durch den Transkriptionsfaktor NF κ B reguliert werden (Lammerding *et al.*, 2004).

Zusätzlich nehmen Lamine durch direkte bzw. indirekte Beeinflussung der Chromatinorganisation Einfluss auf die Genexpression.

Neben der Interaktion mit sich selbst und dem Chromatin modulieren sie auch die Funktion zahlreicher anderer Proteine. Dazu zählen Proteine der Kernmembran (z.B. Emerin, Nesprin), Proteine der Kernporenkomplexe (Nup153, Nup53), Transkriptionsfaktoren (z.B. SREBP1, pRb), nukleoplasmatische Proteinen (BAF, LAP2 α) und Proteine, die mit Signaltransduktionswegen assoziiert sind (PKC α) (Zaremba-Czogalla *et al.*, 2010). Diese vielfältigen Interaktionen tragen dazu bei, dass die Ausprägung der Laminopathien so vielfältig erscheint.

Die Untersuchung der Pathogenese der Laminopathien erfolgt heutzutage mit Hilfe von Biopsiematerial das von Erkrankten entnommen wurde und anhand von Tiermodellen. Die Tatsache, dass die Charakterisierung der Laminopathien im Tiermodell teilweise mit sehr drastischen Phänotypen verbunden ist und diese die Existenz und Lebenserwartung der Tiere stark beeinträchtigen, erschwert das Studium dieser Krankheiten deutlich.

1.9 Das Centrosom

Das Centrosom ist ein nicht membranöses, Zellkern-assoziiertes Organell und stellt, mit Ausnahme von Pflanzen, den größten Proteinkomplex in der Zelle dar. Es besitzt eine Größe von 0,5-1 μ m und ist das Mikrotubuli-organisierende Zentrum (MTOC) in Pflanzen, Tieren und niederen Eukaryoten (Gräf *et al.*, 2004; Schulz *et al.*, 2009). Das MTOC ist bedeutend für

Einleitung

alle Mikrotubuli-abhängigen Prozesse, wie die Aufrechterhaltung der Zellarchitektur, den Organellentransport und die gerichtete Zellmigration (Schnackenberg und Palazzo, 1999). Seit dem späten 19. Jahrhundert wird dem Centrosom auch eine wichtige Aufgabe bei der Mitose und der Formation der mitotischen Spindel zuerkannt, da es nach seiner Verdopplung die beiden Spindelpole bildet (Boveri, 1887). Der Aufbau der bipolaren Spindel im Rahmen einer Mitose ist die Voraussetzung, für die korrekte Separation der Chromosomen und die Cytokinese. Schon Theodor Boveri postulierte, dass sowohl numerische als auch strukturelle Veränderungen von Centrosomen zur Missegration von Chromosomen führen (Boveri, 1987). Demzufolge ist es sehr wichtig, dass die Verdopplung des Centrosoms genau einmal pro Zellzyklus von statten geht.

Störungen der Centrosomenduplikation können dramatische Folgen haben. So kann die Anwesenheit überzähliger Centrosomen zur Ausbildung einer multipolaren Spindel führen, die wiederum zu einer ungleichmäßigen Verteilung des genetischen Materials auf die Tochterzellen beiträgt. Andererseits kann eine fehlende Centrosomenduplikation die Entstehung eines polyploiden Chromosomensatzes begünstigen (Brinkley, 2001; Hinchcliffe und Sluder, 2001). Die Veränderung des Chromosomensatzes, gekoppelt mit der genetischen Instabilität und einer abnormen Zahl an Centrosomen ist bei den meisten soliden Tumoren zu finden (Nigg, 2006; Salisbury *et al.*, 1999). Daran wird deutlich, was eine Dysregulation der Centrosomenduplikation bewirken kann (Lingle *et al.*, 1998; Pihan *et al.*, 1998). Da die Anzahl der Centrosomen in einer Zelle von elementarer Bedeutung ist, unterliegt die Verdopplung der Centrosomen einer strengen Kontrolle (Sluder *et al.*, 1986; Gard *et al.*, 1990). Der Centrosomenzyklus gewährleistet die Verdopplung der Centrosomen, die mit der S-Phase synchronisiert ist (Lange, 2002). Er gliedert sich in vier morphologische Prozesse:

- (1) Auflösung der orthogonalen Verbindung zwischen dem Centriolenpaar, wobei diese noch locker miteinander verbunden bleiben (*disengagement*),
- (2) Verdopplung der Centriolen,
- (3) Trennung der lockeren Verbindung zwischen den beiden Muttercentriolen,
- (4) Trennung der beiden Centrosomen (Hinchcliffe und Sluder, 2001; Nigg, 2007).

Am Ende einer Mitose ist jeder Zellkern der meisten Tier- und Pilzzellen mit einem Centrosom assoziiert (Hinchcliffe und Sluder 2001, Mazia 1987).

Inzwischen konnte demonstriert werden, dass die Ausbildung einer bipolaren Spindel auch in acentrosomalen Zellen möglich ist und somit Centrosomen-unabhängig erfolgen kann (Hinchcliffe und Sluder, 2001; Rieder *et al.*, 2001). Versuche an BSC-1 Nierenepithelzellen der grünen Meerkatze zeigten jedoch, dass ein Fehlen von Centrosomen zu einem Defekt bei

Einleitung

der Cytokinese und einem Nichteintritt in die Mitose führt. Dies resultiert aus einer Blockade des Zellzyklus in G1 (Rieder *et al.*, 2001; Piel *et al.*, 2001; Maniotis und Schliwa, 1991). Die Notwendigkeit von Centrosomen für die Cytokinese, konnte in zahlreichen Organismen, einschließlich *Dictyostelium* bestätigt werden (Gräf *et al.*, 2003).

Wenngleich die Funktion der Centrosomen in den verschiedenen Organismen gleich ist, unterscheidet sich der Aufbau des Organells deutlich voneinander (**Abbildung 5**).

Das Centrosom in Säugerzellen setzt sich aus einem Centriolenpaar, das aus einer Anordnung kurzer, tubulinhaltiger Mikrotubuli besteht, zusammen. Diese sind umgeben von einer pericentriolären Matrix, die Mikrotubuli-nukleierende Komplexe enthält. Dem gegenüber stehen die acentriolären Centrosomen der Hefen, die als „*spindle pole body*“ (SPB) bezeichnet werden. Diese setzen sich aus einer dreilagigen Plaquestruktur, die permanent in die Kernhülle eingebettet ist, zusammen. Die nukleären Mikrotubuli gehen dabei von der inneren Lage des SPB aus, während die cytoplasmatischen Mikrotubuli von der äußeren der drei Lagen ausgehen (Dauderer *et al.*, 1999; Winsor und Schiebel, 1997).

Das Centrosom von *Dictyostelium* unterscheidet sich deutlich vom Centrosom in Säugerzellen bzw. den Spindelpolkörpern in Hefen. Ähnlich wie bei den Hefen enthält das Organell keine Centriolen. Es setzt sich aus einer schachtelförmigen, dreilagigen Zentralstruktur (*Core*) zusammen, deren Proteinzusammensetzung bis vor fast kurzem völlig unbekannt war. Nur DdNek2, eine NIMA-verwandte Serin/Threonin Kinase, die bei der Formation der MTOC's involviert ist, konnte der Zentralstruktur zugeordnet werden (Gräf, 2002). Die *Core* Struktur der sozialen Amöbe ist ähnlich wie bei Säugercentrosomen, von einer lockeren Proteinschicht umgeben, die als Corona bezeichnet wird (Roos *et al.*, 1975; Moens, 1976). Diese beinhaltet elektronendichte Knötchen, die unter anderem γ -Tubulin enthalten und die Mikrotubuli-Nukleationskomplexe repräsentieren. Im Gegensatz zur dreilagigen Zentralstruktur, ist die Zusammensetzung zum Teil bekannt. So enthält die Corona unter anderem Proteine die an der Mikrotubulidynamik beteiligt sind, wie DdCP224 und DdEB1 (Gräf *et al.*, 2003; Rehberg und Gräf, 2002).

Im Vergleich zu den Spindelpolkörpern in Hefen, ist das Centrosom von *Dictyostelium* nicht in die Kernhülle eingebettet, sondern über eine fibröse Struktur mit dem Zellkern verbunden (Byers und Goetsch, 1975; Gräf *et al.*, 2004)

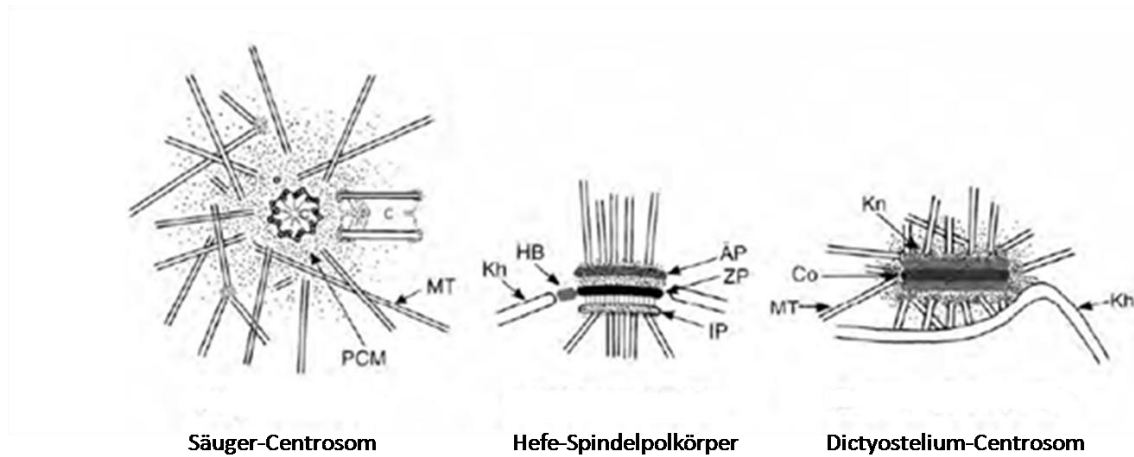


Abbildung 5: Schematische Darstellung eines Säuger-Centrosoms eines Hefe-Spindelpolkörpers und eines *Dictyostelium*-Centrosoms.

Abkürzungen: C:Centriol; PCM: pericentrioläre Matrix; MT: Mikrotubuli; Kh: Kernhülle; HB: „Half Bridge“, ÄP: äußerer Plaque; ZP: zentraler Plaque; IP: innerer Plaque; Co: Corona; Kn: Knötchen. Modifiziert nach Dauderer *et al.* (1999).

Die Duplikation des Centrosoms in *Dictyostelium* ist im Gegensatz zu Säugerzellen und den Hefespindelpolkörpern nicht mit der DNA-Synthese synchronisiert. Die Verdopplung, die erst in der Mitose stattfindet, beginnt mit einer Vergrößerung der zentralen *Core* Struktur und dem Auflösen der Corona, was die Depolymerisation aller Mikrotubuli bewirkt. Die innerste Lage der *Core* Struktur verschwindet und die äußeren Lagen der ursprünglichen Zentralstruktur weichen auseinander und inserieren in die Kernhülle. Sie sind dabei von der Innenfläche ausgehend, mit den Mikrotubuli der mitotischen Spindel verbunden. Während der Mitose durchlaufen die beiden ursprünglich äußeren Lagen der *Core* Struktur einen Faltungsprozess der dazu führt, dass die Innenflächen nach außen gerichtet sind und ein neues, astrales Mikrotubulicytosklett organisiert werden kann. Es erfolgt die Ausbildung der mittleren Schicht und die Entstehung eines neues Centrosoms (**Abbildung 6**) (Gräf *et al.*, 2004; Ueda *et al.*, 1999).

Einleitung

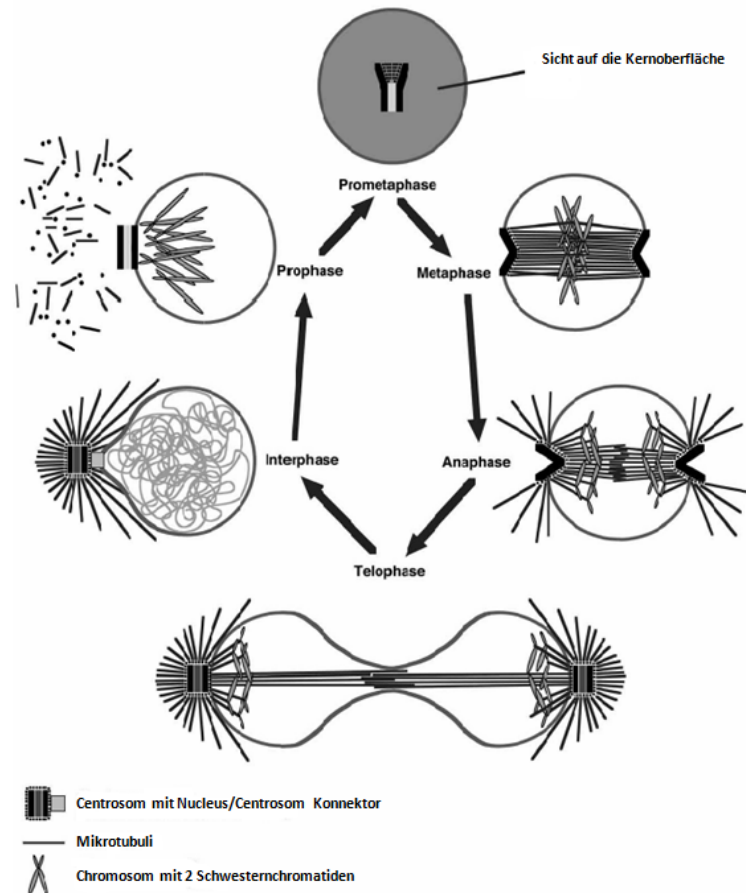


Abbildung 6: Der *Dictyostelium* Centrosomenzyklus.

Darstellung von Zellkernen, Chromosomen und Centrosomen mit assoziierten Mikrotubuli im schematischen Querschnitt. Das Stadium der Prometaphase zeigt den Blick auf die Kernoberfläche. Modifiziert nach Gräf, Schulz 2004.

Die Erforschung und Analyse centrosomaler Proteine stellte lange Zeit ein großes Problem dar, da eukaryotische Zellen nur ein Centrosom pro Zelle besitzen. Somit ist die Menge an Proteinen und das korrespondierende mRNA Level sehr gering (Gräf *et al.*, 2004). Weiterhin sind die kodierenden Sequenzen für centrosomale Proteine in cDNA Bibliotheken deutlich unterrepräsentiert. Somit wird die Massenspektrometrie-basierte Analyse centrosomaler Komponenten deutlich erschwert.

Im Jahre 2003, konnte Andersen *et al.* im Rahmen einer Proteomstudie eine beachtliche Anzahl neuer, centrosomaler Proteine in humanen Lymphoblastenzellen (KE-37) identifizieren (Andersen *et al.*, 2003). Ausgehend von dieser Arbeit wird die Zusammensetzung des Säugercentrosom mit rund 120 Proteinen angegeben, von denen 70 bekannt sind.

Mit der Fertigstellung des Genomprojektes in *Dictyostelium* und der Etablierung eines verbesserten Protokolls zur Aufreinigung von Centrosomen, wurde ein ähnlicher Versuch für die Analyse des Centrosoms in *Dictyostelium* unternommen (Eichinger *et al.*, 2005; Reinders

et al., 2006). Dieser war sehr erfolgreich und führte zusammen mit anderen Arbeiten dazu, dass bis heute rund 28 Proteine des *Dictyostelium* Centrosoms identifiziert werden konnten. Darunter auch die Proteine CP39, CP55 und CP91, die der unerforschten *Core* Struktur des Organells zugeordnet werden können (Kalt und Schliwa, 1993; Gräf *et al.*, 2004; Reinders *et al.*, 2006; Schulz *et al.*, 2009).

Neben echten, centrosomalen Bestandteilen, wurden auch zahlreiche Kandidatenproteine identifiziert. Eines dieser Proteine war das CP75, das im Rahmen dieser Arbeit genauer untersucht wurde.

1.10 Ziel dieser Arbeit

Lamine übernehmen eine Vielzahl von Funktionen innerhalb der Zelle. Veränderungen innerhalb der Lamine können verheerende Auswirkungen auf den menschlichen Organismus haben und Krankheiten verursachen, die als Laminopathien bezeichnet werden. Die Untersuchung der Grundlagen in einem Modellorganismus wie *Dictyostelium discoideum*, ist eine Möglichkeit, die Basis der Laminopathien auf molekularer Ebene besser zu erforschen.

Lamine wurden bis heute in allen untersuchten mehrzelligen Organismen gefunden, ausgehend von *Hydra vulgaris*, dem primitivsten Mehrzeller bis zum Menschen. In einzelligen Organismen konnten sie bisher nicht identifiziert werden. Die Entdeckung und Charakterisierung eines laminähnlichen Proteins in einem Organismus, der an der Grenze zur Multizellularität steht, ist auch im Licht der Evolution von Bedeutung.

Mit dem Protein NE81 in *Dictyostelium* wurde im Rahmen einer centrosomalen Proteomanalyse ein kernhüllenassoziiertes Protein gefunden, das aufgrund seiner Sequenzeigenschaften im Verdacht stand, ein laminähnliches Protein in niederen Eukaryoten zu repräsentieren (Reinders *et al.*, 2006). Für eine Verifizierung der Laminhypothese, sollte im Rahmen dieser Arbeit eine grundlegende Charakterisierung dieses Proteins, in Bezug auf die Funktionalität und den Einfluss regulatorischer Sequenzabschnitte auf die Lokalisation und das Verhalten dieses Proteins in *Dictyostelium* Zellen durchgeführt werden.

Der zweite Teil dieser Arbeit beschäftigte sich mit Charakterisierung eines unbekanntes *Dictyostelium* Proteins, das ebenfalls im Rahmen der centrosomalen Proteomanalyse identifiziert und als potentielle centrosomale Komponente eingestuft wurde (Reinders *et al.*, 2006). Zur Bestätigung des Proteins als centrosomalen Bestandteil, sollte dieses als GFP-Volllängenfusionsprotein exprimiert und mikroskopisch untersucht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Reagenzien und andere Materialien

2.1.1 Chemikalien und Reagenzien:

Wenn nicht anders ausgewiesen, wurden Chemikalien und Reagenzien käuflich bei Carl Roth (Karlsruhe), Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), Biomol (Hamburg) und AppliChem GmbH (Darmstadt) erworben und hatten den Reinheitsgrad „p.a.“. Lösungen wurden mit bidestilliertem Wasser angesetzt.

2.1.2 Antikörper

Primäre Antikörper

anti CP224, mAk, 2/165	(Gräf <i>et al.</i> , 1999)
anti GFP, mAk 264-236-1	Chemicon (Billerica, MA, USA)
anti Sun1, Kaninchen Antiserum	(Schulz <i>et al.</i> , 2009)
anti Tubulin, mAk YL1/2	Chemicon (Billerica, MA, USA)
anti NE81, Kaninchen Antiserum	Biomers (Berlin)

Sekundäre Antikörper

Ziege anti Maus Alexa Fluor 568	Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
Ziege anti Kaninchen Alexa Fluor 488 and 568	Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
Ziege anti Ratte Alexa Fluor 568	Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
Ziege anti Ratte Cy5 Konjugat	Dianova (Hamburg)
Ziege anti Maus Meerrettich Peroxidase Konjugate	Dianova (Hamburg)
Ziege anti Kaninchen Meerrettich Peroxidase Konjugate	Dianova (Hamburg)

2.1.3 Enzyme

Einige Enzyme werden im Zusammenhang mit der jeweiligen Methode beschrieben.

Phusion Polymerase	New England Biolabs (Ipswich, MA, USA)
(Proteinase K	Carl Roth (Karlsruhe)
DNase-1 (RNase free)	Sigma (St. Louis, MO, USA)
andere DNA Restriktionsenzyme	New England Biolabs; (Ipswich, MA, USA), Fermentas (Burlington, Canada)

2.1.4 Antibiotika

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

2.1.5 Andere Materialien

Roti-NC Nitrocellulose Membran	Carl Roth (Karlsruhe)
Protein G sepharose 4 fast flow	GE Healthcare (Uppsala, Sweden)
NHS-activated sepharose 4 fast flow	GE Healthcare (Uppsala, Sweden)
Snake skin dialysis membrane, cut-off 10,000 kDa	Pierce (Rockford, IL, USA)
Amylose resin E8021S	New England Biolabs (Ipswich, MA, USA)
Filtropur S plus, für sterile Filtration	Sarstedt (Nümbrecht)
Polycarbonatfilter, Porengröße Ø 5µm	Whatman (Maidstone, UK)
Polycarbonatfilter Ø 12 µm	Whatman (Maidstone, UK)

2.1.6 Puffer und Lösungen

Spezielle Puffer werden im Zusammenhang mit der jeweiligen Methode beschrieben.

Antikörperverdünnungspuffer

0.02 % NaN₃ in 0.1 % BSA Lösung

Harnstoffhaltiger Probenpuffer für SDS-PAGE

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

Mowiol

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

PBS

70 mM Na₂HPO₄; 30 mM KH₂PO₄; 137 mM NaCl; 2.6 mM KCl; pH 7.4

50x PC (Protease Inhibitor Cocktail)

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

SDS Laufpuffer

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

Phosphatpuffer / Soerensen Puffer (Malchow 1972)

14.6 mM KH₂PO₄; 2 mM Na₂PO₄; pH 6.0

TAE Laufpuffer (für Agarosegelelektrophorese)

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

6x TAE (Ladepuffer für Agarosegelelektrophorese)

240 mM Tris; 6 mM EDTA; 0.6 % Essigsäure; 1 % SDS; 30 % Glycerol; 0.025 % Bromphenolblau pH 8.3

TBS

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

TBST

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

TE Puffer

10 mM Tris; 1 mM EDTA; pH 8.0

2.1.7 Vektoren

p1ABsr8	(Gräf <i>et al.</i> , 2000)
<i>cherry</i> -H2B (Histon 2B)	freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Annette Müller-Taubenberger (Universität München)
pIS76	(Schulz <i>et al.</i> , 2009)
pIS77	(Schulz <i>et al.</i> , 2009)
pLPBLP	(Faix <i>et al.</i> , 2004)
pMALc2	New England Biolabs (Ipswich, MA, USA)
pAD-Gal4-2.1	freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Ingo Dreyer (Universität Potsdam)
pLex A-N	freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Ingo Dreyer (Universität Potsdam)

2.1.8 Software

Microsoft Office 2007, Endnote X Bld 2114, ApE Plasmid Editor v.1.10.4, MacBiophotonics *ImageJ* v.1.42l, Carl Zeiss Axiovision 4.8, Carl Zeiss ZEN 2009, Adobe Photoshop CS3 Extended v10.0, Varian Cary Win UV simple reads 2.0, Biorad Quantity One 4.0.3.

2.2 Organismen und Zellkultur

2.2.1 Bakterienstämme

Der *Escherichia coli* Stamm *TOP10* (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) wurde für die Klonierung verwendet, *Escherichia coli* DH5 α und *Rosetta* (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) wurden für die bakterielle Proteinexpression verwendet. *Klebsiella aerogenes* (Williams & Newell 1976) wurde für die nicht-axenische Kultivierung von *Dictyostelium* Zellen verwendet.

2.2.2 *Dictyostelium discoideum* Stämme

Der *D. discoideum* Stamm AX2-214, ein axenisch wachsendes Derivat vom isolierten NC-1, wurde in dieser Arbeit als Wildtypstamm benutzt und als AX2 bezeichnet (Raper, 1935). Alle Mutantenstämme die im Rahmen dieser Arbeit genutzt wurden, entstanden durch die Transformation von AX2-Zellen. *Dictyostelium* Stämme die im Rahmen dieser Arbeit generiert wurden sind aufgelistet in **Tabelle 1**.

Genutzte Stämme die nicht innerhalb dieser Arbeit generiert wurden:

icmA- (Chen *et al.*, 2007)

2.2.3 Hefestamm

Der in dieser Arbeit verwendete Hefestamm L40, wurde freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Ingo Dreyer (Universität Potsdam).

2.2.4 Kultivierung von *E. coli* Stämmen

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

LB Medium

10 g/l Trypton; 5 g/l Hefeextrakt; 10 g/l NaCl; pH 7.0

LB Agar Platten

LB-Medium versetzt mit 1.5 % Agar

Einfriermedium

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

2.2.5 Kultivierung von *Klebsiella aerogenes*

Klebsiella Zellen wurden auf SM-Platten angezogen bei 37 °C, oder bei 21 °C zur Co-Kultivierung mit *Dictyostelium*.

SM-Agar Platten

10 g/l Pepton (Oxoid); 1 g/l Hefeextrakt (Oxoid); 10 g/l Glucose; 20 g/l Bacto Agar; 1.6 g/l K₂HPO₄; 2.2 g/l KH₂PO₄; 1 g/l MgSO₄; pH 6.5

2.2.6 Kultivierung des Hefestammes L40

Die verwendeten Hefezellen wurden gebrauchsfertig zur Verfügung gestellt durch Dr. Ingo Dreyer (Universität Potsdam).

2.2.7 Kultivierung von *Dictyostelium discoideum*

Dictyostelium Zellen wurden axenisch wachsend in HL5c Medium in Schüttelkultur bei 150 rpm auf einem Certomat R Schüttler (Sartorius, Göttingen), oder als adhärente Kultur in Zellkulturflaschen kultiviert. Für die Selektion von Mutanten wurde optional Blastizidin S (4 µg/ml) und/oder G418 (10 µg/ml) zugefügt. In Flüssigkultur wurden *Dictyostelium* Zellen maximal bis zu einer Dichte von 4×10^6 Zellen/ml kultiviert, um schädigende Einflüsse auf die Zellen zu reduzieren. Alternativ erfolgte die Anzucht von *Dictyostelium* Zellen auf einem *Klebsiella* Bakterienrasen unter Verwendung von SM Agar Platten. Diese Methode wurde hauptsächlich verwendet, um schlecht wachsende *Dictyostelium* Stämme am Leben zu erhalten.

Dictyostelium Sporen die durch Hungern der Zellen gebildet werden, können eingefroren und für einige Jahre gelagert werden. Damit das möglich ist, wurden axenisch wachsende *Dictyostelium* Zellen geerntet und mit Phosphatpuffer gewaschen, um überschüssige Medienreste zu entfernen. Nach dem Resuspendieren der Zellen in Phosphatpuffer, wurden ~500 µl der Zellsuspension mit einer Dichte von $2 - 3 \times 10^8$ Zellen/ml auf Phosphatagarplatten ausplattiert. Nach der Reifung der Fruchtkörper wurden die Sporen mit 4 ml sterilem Phosphatpuffer pro Platte geerntet und bei -70 °C gelagert. Für die Anzucht axenisch wachsender *Dictyostelium* Kulturen von eingefrorenen Sporen, wurden 100 µl der Sporen bei Raumtemperatur aufgetaut und in 5 ml HL5c Medium resuspendiert.

HL5cMmedium

5 g/l Hefeextrakt (Difco); 2.5 g/l Bacto Trypton (Difco); 2.5 g/l Casein Pepton (Merck); 5 g/l Proteose Pepton (Oxoid); 10 g/l Glucose; 1.2 g/l KH₂PO₄; 0.35 g/l Na₂HPO₄; pH 6.5

Phosphatagarplatten

14.6 mM KH₂PO₄; 2 mM Na₂PO₄; 15 g/l Bacto Agar; pH 6.0

2.3 Molekularbiologische Methoden

2.3.1 Bestimmung der DNA - Konzentration

Die DNA Konzentration der vorher verdünnten Probe, wurde durch Messung der Extinktion $E_{260\text{nm}}$ in einem Cary 50 Spektrometer (Varian, Darmstadt) bestimmt. Die Extinktion von 1 entspricht bei doppelsträngiger DNA ungefähr einer Konzentration von 50 $\mu\text{g/ml}$ (Sambrook, J., Russel, D. W., Irwin, N. and Janssen, K. A. (2001). "Molecular cloning: A laboratory manual 3rd edition." Cold spring harbor laboratory press.)

2.3.2 Agarosegelelektrophorese:

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten bezüglich ihrer Größe, erfolgte in Gelen mit einem Agarosegehalt von 1% in TAE-Puffer. Die zu trennende DNA wurde vor der Beladung des Gels mit 1/6 Volumen des 6 fach konzentrierten Ladepuffers versetzt. Die Trennung erfolgte bei 5 V/cm. Zur anschließenden Detektion der DNA wurde das Agarosegel für 25 min in TAE-Puffer mit 1 $\mu\text{g/ml}$ Ethidiumbromid gefärbt. Die DNA wurde mit UV-Licht der Wellenlänge 254 nm sichtbar gemacht und mit dem Gel Doc 2000 System (BioRad, Hercules, CA) dokumentiert. Zur Beurteilung der DNA-Größe wurde ein entsprechender Marker (1 kb Ladder, Fermentas, Burlington, Canada) auf das Gel aufgetragen.

2.3.3 DNA Extraktion aus Agarosegelen

Die entsprechenden DNA-Fragmente wurden durch Illumination mit dem ECX-20-M-UV-Illuminator (PeqLab, Erlangen) sichtbar gemacht und mit Hilfe eines Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten. Die Aufreinigung der Fragmente erfolgte mit dem Nucleospin-Extract II Kit (Macherey & Nagel, Düren) nach den Angaben des Herstellers.

2.3.4 Präparation von Plasmid DNA aus *E. coli*

Die Präparation von Plasmid DNA aus 3 - 5 ml *E. coli* Übernachtskultur, erfolgte mit dem Plasmid-Mini Spin Isolation Kit (Applichem, Darmstadt). Für die Aufreinigung von bis zu 100 ml Übernachtskultur wurde das Nucleobond PC 100 Kit (Macherey and Nagel, Düren) verwendet. Die aufgereinigte DNA wurde in ddH₂O oder in 10 mM Tris pH 7.5 gelöst

2.3.5 Präparation chromosomaler DNA aus *Dictyostelium discoideum*

Die Präparation genomischer DNA, die anschließend für den Einsatz in PCR Reaktionen geeignet war, wurde laut Protokoll durchgeführt (Charette und Cosson, 2004). Dies erfolgte, indem *Dictyostelium* Zellen geerntet, mit Phosphatpuffer gewaschen und anschließend zentrifugiert wurden. Das Pellet wurde in LyB Puffer resuspendiert, dem pro 25 μl 20 μg

Proteinase K zugesetzt wurden. Der Mix wurde anschließend 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Inaktivierung der Proteinase K, wurde das Lysat 5 min bei 95 °C erhitzt und anschließend eben so lange bei 14000 rpm (Hettich Universal 32R, 1653 Rotor) zentrifugiert, um Zelltrümmer zu entfernen. Pro PCR-Reaktion wurden 1-2 µl des Überstandes eingesetzt.

LyB Puffer

50 mM KCL; 10 mM TRIS ph 8,3; 2,5 mM MgCL₂; 0,45 % NP 40; 0,45 % TWEEN 20

2.3.6 Isolation polyadenylierter RNA aus *Dictyostelium discoideum*

Polyadenylierte RNA (mRNA) die als Ausgangsmaterial für RT-PCR Reaktionen eingesetzt wird, wurde nach Herstellerangaben unter der Verwendung des Total RNA isolation spin-kit[®] (Appllichem, Darmstadt) präpariert. Die Ausbeute betrug 7 - 8 µg mRNA pro 1 x 10⁷ Zellen. Die isolierte RNA wurde in DEPC-behandeltem H₂O gelöst und anschließend in RT-PCR Reaktionen eingesetzt bzw. gelagert. Für die Lagerung erfolgte die Zugabe von mit 1/10 Volumen 2 M K-Acetat ph 5,5 und 2,33 Volumen 100 % Ethanol. Die RNA wurde durch 15 minütige Zentrifugation bei 14000 rpm (Hettich Universal 32R, 1653 Rotor) pelletiert und bei -70 °C gelagert.

2.3.7 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Amplifikation von DNA-Fragmenten durch die Polymerase-Kettenreaktion, erfolgte mit Hilfe der thermostabilen Phusion Polymerase (Finnzyme, Vantaa, Finnland). Der Reaktionsansatz von 25 µl enthielt folgende Bestandteile: 5 µl 5x Phusion HF Puffer, 0,8 mM dNTP (0,2 mM pro Nucleotid), 25 µM 5'-und 3'Primer und 0,5 U Phusion Polymerase. Die MgCl₂ Konzentration variierte in Abhängigkeit von den jeweiligen Bedingungen. Als Template wurden cDNA, Plasmid DNA oder genomische DNA eingesetzt. Zur Amplifikation von DNA wurden generell 35 Vervielfältigungszyklen (initiale Denaturierung bei 98°C 30 sec, Denaturierung bei 98 °C 10 sec, Hybridisierung bei 48-67 °C in Abhängigkeit von der Zusammensetzung der Oligonukleotide für 30 sec nach der Berechnung $T_m = 4^{\circ}\text{C} (\text{Anzahl G/C im Oligonukleotid}) + 2^{\circ}\text{C} (\text{Anzahl von A/T im Oligonukleotid})$, Elongation bei 72 °C 15-30 sec/kb, finale Elongation bei 72 °C 5 min) durchlaufen.

2.3.8 Reverse- Transkriptions-PCR (RT-PCR)

RT-PCR Reaktionen wurden verwendet, zur Generierung und Vervielfältigung unspezifischer cDNA Fragmente mit oligo-dT Primern, die anschließend als Template für die PCR eingesetzt wurden. Die RT-PCR wurde nach Angaben des Herstellers mit dem Protoscript First Strand cDNA Synthesis Kit (NEB, Ipswich, MA, USA) durchgeführt. Die Reaktionen

fanden in einem Eppendorf Thermomixer comfort statt, unter Verwendung von 1 µg RNA pro Reaktion. 2,5 µl der Reversen-Transkriptions-Reaktion wurden als Template für die folgende Amplifikation durch PCR eingesetzt.

2.3.9 Spaltung von DNA durch Restriktionsenzyme:

Die Restriktion von DNA wurde mit dem vom Hersteller empfohlenen Puffersystemen und jeweiligen Temperaturbedingungen durchgeführt. Für die Spaltung der DNA wurden 1 - 5 Enzymeinheiten pro µg DNA eingesetzt, bei einer Reaktionszeit zwischen 2 - 12 h. Das Reaktionsvolumen betrug 40 µl. Die Kontrolle der DNA-Spaltung erfolgte anschließend mit Hilfe von Agarosegelen.

2.3.10 Ligation von DNA in Plasmidvektoren:

Die Ligation von aufgereinigten DNA-Fragmenten erfolgte mit der T4-DNA Ligase (NEB, Ipswich, MA, USA). Das Gesamtvolumen betrug 10 µl in dem vom Hersteller empfohlenen Puffersystem. Die Reaktion wurde für 2 - 12 h bei Raumtemperatur bzw. bei 16 °C durchgeführt. Das molare Verhältnis von Vektor:Fragment für die Ligation überstehender Ende betrug 2:1.

2.3.11 Verwendete Oligonukleotide

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

Name Sequenz (forward/reverse)	5'->3'
VP3-1Sal(f)	TAAATTGTCGACTAATGGATATGTCAAAAAAGAAAAGTAAAC
VP3-2Bam(r)	TTTGGATCCTTACATAATCAAACAATTTGATTTACC
RNE81Bam-CLIM(r)	GCGCGGATCCTTAATTTGATTTACCAGCTGAAGAAGG
RNE81Bam+NLS(r)	GCGCGGATCCTTAAAGTTTGTCTCTTTCTCTTACG
PSTNE81 KO F(f)	CAACTGCAGCGATCCAGAAATTCCTTG
NE81KOSalF(f)	AAAAAAGTCGACCTACTCTCAATAGGGTGTGAAG
5'HindrevNE81KO(r)	TTAAAGCTTCGTGGGAGGGTATTTGTGCTG
FNE81S122A(f)	CACAAATAGGTACACCATTAGCACCAAATAG
RNE81S122A(r)	GTTGAGCTGCTCTATTTGGTGCTAATGGTG
VP1-1 Sal(f)	TAAATTGTCGACTAATGATTTCAAATATACAGAAACAAAATC
CP75for Eco(f)	AAAGAATTCATGATTTCAAATATACAGAAAC
VP1-2 Bam(r)	TTTGGATCCTTAAAATATATCATTCTTGTTTTAAAAGGAG
CP75 rev Sal(r)	GATACGCGTCGACTTAAAATATATCATTCTTGTTTTAAAAGG
RevNtermVP1Bam(r)	AAAGGATCCTTATCTAAAAGTAACAGTTTTCTTTATGC

Zusätzliche Primer die aus anderen Quellen zur Verfügung gestellt wurden

Bsr forw (f)	CTCATTCCTCACTCAAATATACCCGAAATTA
GFP605 (f)	ACCTGTCCACACAATCTGCC
Myc rev (r)	CTTCTTCTGATAATAATTTTTGTTCTA

2.3.12 Herstellung chemisch kompetenter *E. coli* Zellen:

Die Einzelkolonie einer LB-Platten Übernachtskultur von *E. coli* (*Top 10*, *Rosetta*, *DH5 α*) wurde in 5 ml Ψ b-Medium transferiert und wuchs dort bei 37 °C bis zu einer OD₆₀₀ = 0,3. Diese Kultur wurde anschließend zum Animpfen von 100 ml vorgewärmtem Ψ b-Medium verwendet. Die Zellen wuchsen bis zu einer OD₆₀₀ = 0,5, wurden für 5 min auf Eis gekühlt, 5 min bei 3000 g (Hettich Rotana 460R, 5624 Rotor) zentrifugiert und in 40 ml eiskaltem TfbI-Puffer resuspendiert. Danach erfolgte eine erneute Zentrifugation, eine Aufnahme der Zellen in 4 ml TfbII-Puffer, 15 min Inkubation auf Eis und abschließend ein Einfrieren der 200 μ l Proben in flüssigem Stickstoff. Die Lagerung der kompetenten Zellen erfolgte bei -70 °C.

Ψ b-Medium

20 g/l Trypton; 5 g/l Hefeextrakt; 5 g/l MgSO₄ (wasserfrei); pH 7.6 eingestellt mit KOH

TfbI

30 mM Kaliumacetat; 100 mM Rubidiumchlorid (RbCl); 10 mM CaCl₂; 15 % Glycerol; pH 6 eingestellt mit 0.2 M Essigsäure und Zusatz von 50 mM of MnCl₂; finaler pH eingestellt auf 5.8

TfbII

10 mM MOPS; 75 mM CaCl₂; 10 mM Rubidiumchlorid (RbCl); 15 % Glycerol; pH 6.5 eingestellt mit KOH

2.3.13 Transformation chemisch kompetenter *E. coli* Zellen

Für die Transformation chemisch kompetenter *E. coli* Zellen wurden diese langsam aufgetaut und anschließend für 10 min auf Eis gelagert. Nach der Zugabe des 10 μ l Ligationsansatzes, wurde das Gemisch für weitere 45 min auf Eis gelagert. Anschließend erfolgte ein Hitzeschock für 90 sec bei 42 °C und die Lagerung auf Eis für 1-2 min. Nach der Zugabe von vier Volumenteilen LB-Medium, wurde das Gemisch aus chemisch kompetenten Zellen und ligiertem Plasmid für 60 min bei 37 °C unter Verwendung eines Thermomixer comfort

(Eppendorf, Hamburg). geschüttelt. Die Selektion der Transformanten erfolgte durch Ausplattieren auf antibiotikahaltigen LB-Agarplatten.

2.3.14 Transformation von *Dictyostelium discoideum* Zellen

Alle Schritte während der Transformation wurden mit eiskalten Puffern bzw. auf Eis durchgeführt, falls nicht anders benannt.

Dictyostelium Zellen wurden bis zu einer Dichte von $2 - 3 \times 10^6$ Zellen/ml kultiviert, geerntet, einmal in kaltem Soerensen Puffer und zweimal in kaltem Elektroporationspuffer gewaschen. Die Zellen wurden mit einer Endkonzentration von 1×10^8 Zellen/ml in kaltem Elektroporationspuffer resuspendiert, mit 15 - 30 μg Plasmid DNA vermischt und in eine vorgekühlte sterile Elektroporationsküvette transferiert (Abstand zwischen den Elektroden: 4 mm) (Peqlab, Erlangen). In der Elektroporationsapparatur (Gene Pulser, Biorad ,Hercules, CA, USA) wurden die Zellen bei einer Kondensatorkapazität von 3 μF , einer Spannung von 1,2 kV ausgesetzt. Danach erfolgte der Transfer der Zellen in eine sterile Zellkulturflasche und die Inkubation für 10 min bei Raumtemperatur. Nach Zugabe einer $\text{Mg}_2\text{Cl}/\text{CaCl}_2$ Lösung (Endkonzentration je 1 mM) wurden die Zellen für weitere 15 min bei Raumtemperatur leicht geschwenkt. Für die Transformation Blastizidin resistenter Zellen wurden diese in 25 ml HL-5c Medium, supplementiert mit Penicillin und Streptomycin, aufgenommen und auf eine 24-Loch-Zellkulturplatte verteilt. Nach einer Erholungsperiode von 24 h wurde durch Zugabe des Blastizidins in einer Konzentration von 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ein Selektionsdruck ausgeübt. Die Zellen wurden für 8-14 Tage bei 21°C inkubiert, bis Kolonien resistenter Zellen auftraten.

Zur Generation G418-resistenter *Dictyostelium* Zellen, wurden diese nach Beendigung der einzelnen Transformationsschritte in eine Zellkulturflasche transferiert. 24 h nach der Elektroporation wurden die Zellen geerntet, mehrfach mit Phosphatpuffer gewaschen und anschließend in einer Bakteriensuspension, bestehend aus *Klebsiella aerogenes* supplementiert mit 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ G418, resuspendiert. Für die Gewinnung der Klebsiellen, wurden diese bei 37 °C über Nacht auf einer SM-Platte kultiviert. Für das Ernten der Klebsiellen wurde 5 ml steriler Phosphatpuffer verwendet.

500 μl Suspension, bestehend aus Klebsiellen und transformierten *Dictyostelium* Zellen wurden auf Phosphatagarplatten ausplattiert, denen 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ G418 zugesetzt wurde. Die Phosphatagarplatten wurden bei Raumtemperatur 10-14 Tage bis zum ersten Auftreten von Fraßplaques gelagert. Diese wurden dann mit einer sterilen Pipette in Flüssigmedium mit 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ G418 überführt.

Für die Generierung von Blastizidin/G418-Doppelmutanten wurde zuerst ein Stamm hergestellt, der das Konstrukt mit der Blastizidinresistenz trug. In diesen Stamm wurde anschließend das G418 Konstrukt transformiert.

Die Transformanden wurden dann mit einer sterilen Pipette resuspendiert und ein Tropfen der Zellsuspension auf einen Objektträger gegeben. Die Zellen wurden durch Immunfluoreszenzmikroskopie auf die Expression des transformierten Markers (**Abschnitt 2.5.1**) hin untersucht. Falls die gewünschten Zellen gefunden worden waren, wurden verschiedene Konzentrationen der verbliebenen Zellen zusammen mit einer dichten Suspension *Klebsiella aerogenes* Zellen auf SM Agarplatten ausgebracht. Nach zwei bis drei tägiger Inkubation bei 21 °C erschienen Fraßhöfe. Mit einem sterilen Zahnstocher wurden einzelne Kolonien in 24-Lochplatten mit HL-5c Medium mit Blastizidin S (4 µg/ml) bzw. G418 (10 µg/ml) und einer Penicillin/Streptomycin Lösung (Sigma) überführt.

Elektroporationspuffer

50 mM Saccharose; 10 mM KH₂PO₄; pH 6.1

2.3.15 "Yeast-Two-Hybrid"-Assay

Der "Yeast-Two-Hybrid"- Assay basiert auf der Tatsache, dass viele eukaryotische Transkriptionsfaktoren aus zwei Untereinheiten bestehen. Zum einen aus der DNA-Bindungsdomäne (DNA-BD), die es dem Transkriptionsfaktor ermöglicht, stromaufwärts der Promotorregion eines bestimmten Reportergenes spezifisch an die DNA zu binden, zum anderen aus der Aktivierungsdomäne (AD), die mit der RNA-Polymerase interagiert, einen Komplex bildet und auf diese Weise die Transkription stimuliert.

In den Experimenten die nachfolgend beschrieben werden, wurde die DNA-Bindedomäne des bakteriellen LexA Proteins verwendet, das durch die Bindung an den LexA-Operator normalerweise als Repressor der SOS-Gene in *E. coli* fungiert und die Aktivierungsdomäne des GAL4 Proteins. Innerhalb dieser Arbeit wurden zwei verschiedene Vektoren eingesetzt, pLexA-N, pAD-Gal4-2.1 (zur Verfügung gestellt von Dr. Ingo Dreyer, Universität Potsdam), um eine Fusion der Domänen mit Proteinen zu generieren, die potentiell miteinander interagieren können. Diese Plasmide zeichneten sich dadurch aus, dass sie neben dem jeweiligen Köder- bzw. Beuteprotein zusätzlich Tryptophan (*Trp1*, pLexA-N,) und Leucin (*LEU2*, pAD-Gal4-2.1) kodierten, da der verwendete Hefestamm L40 (zur Verfügung gestellt von Dr. Ingo Dreyer, Universität Potsdam) bezüglich dieser beiden Aminosäuren auxotroph war. Die rekombinanten Hybridproteine wurden nach der erfolgreichen Transformation in den Hefezellen coexprimiert. Bei einer Interaktion zwischen einem DNA-BD fusionierten

Köderprotein und einem DNA-AD –Beutefusionsprotein entsteht ein neuer Transkriptionsaktivator, der einer Bindeaffinität für den LexA-Operator besitzt und die Reportergene aktiviert (**Abbildung 7**)

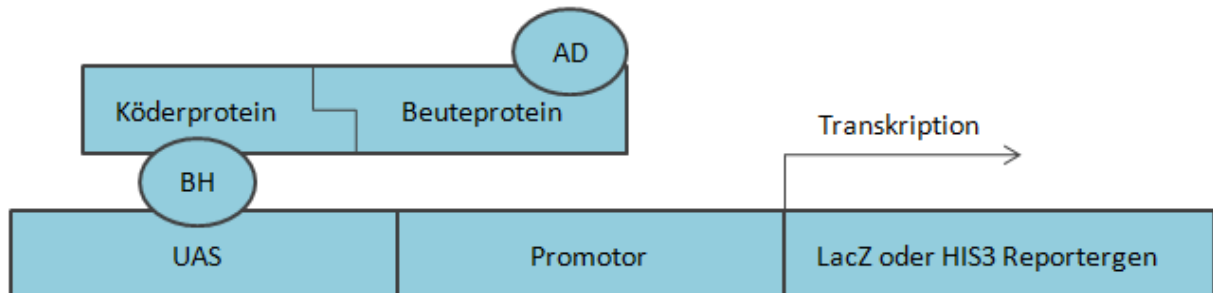


Abbildung 7: "Yeast-Two-Hybrid" Prinzip

Die funktionalen Domänen eines Transkriptionsfaktors sind auf zwei Fusionsproteine verteilt. Die Funktion des Faktors, die in einer Aktivierung der Transkription resultiert, wird wiederhergestellt wenn die Fusionsproteine über die zusätzlichen Proteinanteile miteinander interagieren.

Diese ist dann phänotypisch sichtbar. Im Falle einer fehlenden Interaktion zwischen beiden Hybridproteinen erfolgt keine Transkription der Reportergene.

Das LexA-System verwendet unter der Kontrolle des LexA-Operators zwei verschiedene Reportergene (*LacZ*, *HIS3*) in den verwendeten L40 Hefezellen. Diese werden erst im Falle einer Interaktion der Proteine, die durch Transformation der beiden Plasmide in die Zelle eingeschleust wurden, aktiviert. Die Initiierung der Transkription wird sichtbar durch eine Blaufärbung der Hefekolonien, die aus der Expression des Reportergens *LacZ* resultiert. Dieses kodiert das Enzym β -Galactosidase, das die Umwandlung des farblosen XGal, das dem Medium zugesetzt wurde (0,08 mg/ml), zum blauen Farbstoff Brom-4-chlorindigo katalysiert. Das *HIS3*-Reporterkonstrukt bietet den Vorteil, dass die ansonsten auxotrophen Hefen auch auf Histidin-defizientem Medium wachsen können.

Transformation kompetenter Hefezellen

Die kompetenten L40 Hefezellen wurden gebrauchsfertig zur Verfügung gestellt durch Dr. Ingo Dreyer. Die Transformation dieser Zellen mit den generierten Vektorkonstrukten, erfolgte nach einem Standardprotokoll (Frozen-EZ Yeast TransformationIITM, Zymo Research). Vor dem eigentlichen Interaktionsversuch wurde ein Kontrolltest durchgeführt. Bei diesem wird das Gen mit der DNA-Bindedomäne, zusammen mit der leeren Aktivierungsdomäne in die Hefen transformiert und umgekehrt. Dieser Versuch dient der Absicherung, dass das Protein allein keine Aktivierung der Transkription auslösen kann. Um diesen Versuch durchzuführen, erfolgte die Transformation der Hefen mit jeweils 1 μ g der entsprechenden DNA.

Anschließend wurden die transformierten Hefen auf SD- Minimalmedium (-Leucin, - Tryptophan) ausplattiert und für drei Tage bei 30 °C inkubiert. Danach erfolgte das Picken und die Resuspension von drei unterschiedlich großen Hefekolonien in Aqua dest, die dann auf X-Gal haltigem SD-Minimalmedium (-Leucin, - Tryptophan, - Histidin) ausplattiert wurden. Die erneute Inkubation bei 30 °C fand für 3-5 Tage statt.

Im Anschluss wurde der eigentliche Interaktionsversuch wie vorher beschrieben, durchgeführt. Statt der Leervektoren erfolgte die Transformation der L40 Hefezellen mit den Vektorkonstrukten pLexA-N, pAD-Gal4-2.1 und den kodierten, potentiellen Proteininteraktoren.

Es wurden die vorgeschriebenen Minimal und Mangelmedien (sogenannte Dropout Materialien) der Firma BD Clontech GmBh, Heidelberg verwendet. Für die Dropout- Medien wurden 10 x Stammlösungen und für die Minimalmedien 5 x konzentrierte Lösungen eingesetzt.

2.3.16 Herstellung von Plasmiden und entsprechenden *Dictyostelium* Stämmen

Falls nicht anders erwähnt, erfolgte die Amplifikation der kodierenden Sequenzen durch einzelne PCR-Reaktionen. Als Template diente cDNA (**Abschnitt 2.3.8**), Plasmid DNA (**Abschnitt 2.3.4**) oder genomische DNA (**Abschnitt 2.3.5**). Die erhaltenen PCR-Produkte wurden aufgereinigt, mit den jeweiligen Restriktionsendonukleasen geschnitten (**Abschnitt 2.3.9**), erneut aufgereinigt und in den dazu gehörigen Vektor ligiert. Die Überprüfung der Sequenz erfolgte durch Sequenzierung (GATC Biotech, Konstanz). Die verwendeten Primer und Vektoren für jedes Konstrukt sind aufgeführt in **Tabelle 31**. Die Primersequenzen sind in **Abschnitt 2.3.11** aufgelistet.

Vektorkonstrukte für die N-terminale GFP-Fusion

PCR Produkte, flankiert von den Sall und BamHI Restriktionsstellen, wurden generiert und in den ähnlich behandelten pIS76 oder pIS 77 Vektor (Schulz *et al.*, 2009) ligiert.

Konstruktion des N-terminalen GFP-NE81 Volllängenkonstruktes

Das GFP-NE81 Volllängenkonstrukt wurde generiert, wie beschrieben für die N-terminale GFP-Fusion. Das GFP-NE81 Volllängenkonstrukt umfasste die Basen 1 – 2151. Dies entsprach den Aminosäuren 1 – 716. Die Ligation erfolgte in den pIS 76 Vektor.

Klonierung des MBP-NE81 Volllängenkonstruktes

Für die Expression des MBP-NE81 Fusionsprotein in *DH5α E. coli* Zellen, wurde ein MBP-NE81 Volllängenkonstrukt kloniert. Dafür wurde die kodierende DNA aus dem vorher

generierten GFP-NE81 Konstrukt mit den entsprechenden Restriktionsenzymen SalI und BamHI geschnitten. Das erhaltene DNA-Fragment wurde aufgereinigt und in den ähnlich behandelten pMALc2 Vektor (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) ligiert.

Konstruktion des GFP-NE81 Δ CLIM Konstruktes

GFP-NE81 Δ CLIM wurde generiert wie beschrieben für die N-terminale GFP-Fusion und umfasste die Basen 1 – 2139 der kodierenden NE81 Sequenz. Dies entsprach den Aminosäuren 1 - 712. Die Ligation erfolgte in den pIS 77.

Klonierung des GFP-NE81 Δ C Konstruktes

GFP-NE81 Δ C wurde generiert wie beschrieben für die N-terminale GFP-Fusion und umfasste die Basen 1 – 1578 der kodierenden NE81 Sequenz. Dies entsprach den Aminosäuren 1 – 512. Die Ligation erfolgte in den pIS 77.

Konstruktion des NE81 *knock out* Konstruktes

Die Herstellung des NE81 *knock out* Konstrukts erfolgte unter Verwendung des pLPBLP Vektors (Faix *et al.*, 2004). Die beiden komplementären Sequenzen wurden erhalten durch PCR Reaktionen mit den entsprechenden Primern. Als Template fand genomische und kodierende Plasmid DNA Anwendung.

Das 820 bp umfassende Fragment aus dem 5' Bereich der UTR-Region des NE81, wurde in den HindIII und SalI geschnittenen pLPBLP vor die Blastizidinkassette ligiert. Anschließend wurde das 679 bp umfassende DNA Fragment aus dem 3' Bereich der kodierenden Region des NE81, nach der Restriktion mit PSTI/BamHI hinter die Blastizidinkassette eingefügt. Die generierten *knock out* Konstrukte wurden nach der Inkubation mit PVUII aufgereinigt und anschließend in *Dictyostelium* Zellen transformiert. Die Überprüfung der Mutanten erfolgte mittels NE81 Antikörper.

Klonierung des GFP-NE81S122A Konstruktes

Das PCR-Produkt mit einer Größe von 2151 bp wurde in vier unabhängigen PCR-Reaktionen generiert. Die ersten beiden Fragmente wurden mit den Primerkombinationen VP3-1Sal(f) / RNE81S122A(r) und VP3-1Bam(r) / FNE81S122A hergestellt. Nach der Aufreinigung der PCR-Fragmente wurden diese in einem Verhältnis von 1:1 miteinander vermischt. Anschließend wurde dieser Mix, bestehend aus zwei unterschiedlichen PCR-Fragmenten, die jeweils die eingesetzte Punktmutation enthielten, miteinander hybridisiert. Danach erfolgte die Zugabe der finalen Primer VP3-1Sal(f) / VP3-1Bam(r) und das vollständige PCR-Fragment mit der zusätzlich eingefügten Punktmutation wurde synthetisiert. Das erhaltene

PCR-Fragment wurde mit den entsprechenden Restriktionsenzymen geschnitten, wie beschrieben für die N-terminale GFP-Fusion und in den ähnlich behandelten pIS 77 ligiert.

Konstruktion des N-terminalen GFP-CP75 Vollängenkonstruktes

GFP-CP75 Vollänge wurde generiert wie beschrieben für die N-terminale GFP-Fusion und umfasste die Basen 1 – 1959. Dies entsprach den Aminosäuren 1 – 652. Die Ligation erfolgte in den pIS 76.

Klonierung des MBP-CP75 Konstruktes

Für die Expression des N-Terminus des CP75 in *Rosetta* mit einer MBP-Proteinmarkierung, wurde ein PCR Produkt mit einer Größe von 936 bp generiert. Dies entsprach den Aminosäuren 1 – 312. Als Template wurde das vorher generierte GFP-CP75 Vollängenkonstrukt verwendet.

Das PCR-Fragment wurde mit den Restriktionsenzymen SalI und BamHI geschnitten, aufgereinigt und anschließend in den ähnlich behandelten pMALc2 Vektor (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) ligiert.

Vektorkonstrukte und *Dictyostelium* Mutanten die im Rahmen dieser Arbeit hergestellt wurden, sind dargestellt in **Tabelle 1**.

Generierte Vektorkonstrukte die nicht zur Transformation von *Dictyostelium* verwendet wurden, liegen als *E. coli* Stämme vor.

Material und Methoden

Konstrukt	Labor-bezeichnung	Klonierungsvektor	Restriktionschnittstellen	verwendete Primer	existierende <i>Dictyostelium</i> Mutante	Doppelmutante mit <i>cherry</i> Histon2B
GFP-NE81 Volllänge	pRG 45	pIS 76	Sall BamHI	VP3-1Sal VP3-2 Bam	ja	nein
MBP-NE81 Volllänge	pIS 281	pMALc2	Sall BamHI	VP3-1Sal VP3-1Bam	nein	nein
GFP-NE81 Δ CLIM	pAK35	pIS 77	Sall BamHI	VP3-1Sal RNE81 Bam-CLIM	ja	ja
GFP-NE81 Δ C2	pAK37	pIS 77	Sall BamHI	VP3-1Sal RNE81Bam +NLS	ja	nein
NE81 <i>knock out</i> Konstrukt	pAK 43	pLPBLP	Sall, HindIII PSTI, BamH1	NE81KOSall 5' Hindrev NE81 KO PSTNE81KOF VP3-2Bam	ja	nein
GFP-CP75 Volllänge	pRG 43	pIS 76	Sall BamHI	VP1-1Sal VP1-2 Bam	ja	ja
MBP-N-Term CP75	pAK21	pMALc2	Sall BamHI	VP1-1Sal RevN- termVP1Bam	nein	nein
GFP-NE81S122A	pAK58	pIS 77	Sall BamHI	VP3-1Sal(f) VP3-2 Bam FNE81S122A RNE81S122A(r)	ja	nein

Tabelle 1: Plasmide und korrespondierende *Dictyostelium* Stämme, die im Rahmen dieser Arbeit generiert wurden

Herstellung der CP75 "Yeast-Two-Hybrid"-Konstrukte

Für die Herstellung der "Yeast-Two-Hybrid"-Konstrukte wurde die entsprechenden PCR Reaktion auf dem vorher generierten GFP-CP75 Volllängenkonstrukt durchgeführt. Das erhaltene PCR Fragment wurde in die "Yeast-Two-Hybrid"-Vektoren pLex A-N und pAD-Gal4-2.1. ligiert (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Ingo Dreyer, Universität Potsdam).

2.4 Biochemische Methoden

2.4.1 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Protein Konzentration einer Probe wurde durch Messung der Extinktion E_{280} in einem Cary 50 Spektrometer (Varian, Darmstadt) bestimmt. Bei diesen Messungen entsprach ein Messwert von 1 einer ungefähren Proteinkonzentration von 0,7 mg/ ml.

2.4.2 Gewinnung von Gesamtzellextrakten

Für die Herstellung von Gesamtzellextrakten wurden axenisch wachsende *Dictyostelium discoideum* Zellen bei einer Zelldichte von $3 - 5 \times 10^6$ Zellen/ml geerntet, zentrifugiert, in einem Volumen Harnstoffpuffer aufgenommen und 3 min bei 70 °C gekocht. Anschließend

konnte der Gesamtzellextrakt für die *SDS-Page* zur Auftrennung von Proteinen verwendet werden.

2.4.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Proteine wurden wie bei (Bollag *et al.*, 1996) beschrieben, auf diskontinuierlichen 12,5 % igen SDS-Polyacrylamid Gelen aufgetrennt. Die Gele wurden aus frischen Stammlösungen gefertigt. Die Elektrophorese wurde in Biorad Mini System Gelkammern (Biorad, Hercules, CA, USA) bei 15 mA pro Gel für 15 min und anschließend bei 30 mA pro Gel für 45 - 60 min durchgeführt.

Die Proteinproben und der molekulare Gewichtsstandard (Sigma, St. Louis, MO, USA) wurden mit einem Volumen Harnstoff Probenpuffer versetzt und 3 min bei 70 °C gekocht.

Als Standard wurde ein Proteingemisch definierter Molekülmasse verwendet: HMW: 205, 116, 97, 66, 45, 29 kDa

Tabelle 2: Zusammensetzung der SDS-Polyacrylamidgele

Stammlösung	3% Sammelgel	12,5% Trenngel
3% Acrylamid	0,683 ml	3,9 ml
2% Bisacrylamid	0,5 ml	0,93 ml
Trenngelpuffer (2M Tris/HCL, ph 8,7; 0,4% SDS)	-	2,5 ml
Sammelgelpuffer (0,25M Tris/HCL, ph 6,8; 0,4% SDS)	1 ml	-
Aqua dest	1,78 ml	1,8 ml
10% APS	35 µl	45 ml
TEMED	7 µl	9 µl

Trenngelpuffer

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

Sammelgelpuffer

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

2.4.4 Coomassie-Blau-Färbung von Proteinen

SDS-PAGE-Gele wurden 1 h in der Coomassie-Färbelösung gefärbt. Nicht gebundener Farbstoff wurde durch Inkubation in einer Entfärbelösung ausgewaschen.

Coomassie R250 Färbelösung

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

Entfärbelösung

25 % Isopropylalkohol; 10% Essigsäure

2.4.5 Silberfärbung von SDS Gelen

Die SDS Gele wurden 30 min in einer Fixierungslösung inkubiert und anschließend für weitere 30 min in eine Sensibilisierungslösung transferiert. Nach dreimaligem Waschen mit ddH₂O für jeweils 5 min, wurden die SDS Gele für 20 min in eine Silberlösung überführt. Anschließend wurde das SDS Gel erneut dreimal mit ddH₂O gewaschen. Danach erfolgte die Inkubation der Gele mit der Entwicklerlösung. Das Abstoppen der Entwicklungsreaktion nach dem Erreichen der maximalen Anfärbung der Proteinbanden, erfolgte mit 0.04 M EDTA.

Fixierungslösung

40 % Ethanol; 10 % Essigsäure

Sensibilisierungslösung

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

Silberlösung

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

Entwicklerlösung

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

2.4.6 Western Blot Analyse

Nach der Auftrennung der Proteine mittels *SDS-Page* wurden diese auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Dazu wurde eine „*semi-dry*“ Elektrophorese Apparatur (Peqlab, Erlangen) und ein Puffersystem nach (Kyhse-Anderson, 1984), modifiziert durch die Zugabe von 20 % Methanol, verwendet. Der Proteintransfer wurde bei 1 mA/cm² durchgeführt. Anschließend wurde die Membran mit Ponceau S Solution angefärbt und der Proteingrößenstandard markiert. Die Membran wurde durch die Inkubation mit 5 % Magermilchpulver in TBST abgesättigt. Die Inkubation mit dem primären Antikörper erfolgte in TBST, supplementiert mit 1,5 % Magermilch für 1,5 h bei Raumtemperatur. Der *Blot* wurde anschließend mit TBST gewaschen (3x5 min) und 1 h mit dem sekundären Antikörper

(1:10000 Verdünnung in TBST, anti-Maus-, anti-Kaninchen-Meerrettichperoxidase-Konjugat) inkubiert. Die Membran wurde mit TBST (2x5 min) und mit TBS (1x10 min) gewaschen und nach den Herstellerangaben mit den Chemikalien des ECL-Kits (AppliChem, Darmstadt) inkubiert. Anschließend wurde die in eine Frischhaltefolie eingewickelte Membran in der Dunkelkammer in eine Röntgenfilmhalterapparatur (Kisker, Steinfurt) überführt und für 0,5 – 30 min einem Röntgenfilm (Fuji Super RX, Fujifilm, Tokyo) in Kontakt gebracht. Dann wurde der Film mit der Entwicklerlösung (T32, Calbe Chemie, Calbe), Wasser und der Fixierlösung (Superfix, Tetanal, Norderstedt) inkubiert

Blotpuffer 1

300 mM Tris; 20 % Methanol

Blotpuffer 2

30 mM Tris; 20 % Methanol

Blotpuffer 3

30 mM Tris; 20 % Methanol; 40 mM ϵ -Aminocaproic säure

Ponceau S Lösung

0.1 % Ponceau S; 5 % Essigsäure

2.4.7 Densitometrische Auswertung von gelelektrophoretisch aufgetrennten Proteinen

Die quantitative Auswertung von gelelektrophoretisch aufgetrennten Proteinen, erfolgte mit dem Bildverarbeitungsprogramm *ImageJ* (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>). Es wurde das hintergrundkorrigierte Produkt aus Fläche und Tonwert in einer 8 Bit Graustufenskala gemessen.

2.4.8 Aufreinigung von bakteriell exprimierte MBP-Fusionsproteinen

Die MBP-Fusionsproteine dieser Arbeit wurden exprimiert mit den *E. coli* Stämmen *Rosetta* und *DH5 α* . Dafür wurde 1 l der entsprechenden *E. coli* Kultur mit ampicillinhaltigen LB-Medium und 10 mM Glukose bei 37 °C bis zu einer OD₆₀₀ 0,7 - 1,0 kultiviert. Nach der Induktion der MBP-Proteinexpression durch den Zusatz von 0,3 M IPTG wurden die Zellen für weitere 4 - 6 h bei 21 °C geschüttelt. Die Zellen wurden durch Zentrifugation bei 4000 rpm (Hettich Rotanta 460R, 5645 Rotor) geerntet. Die erhaltenen Pellets wurden in 10 ml TE-Puffer resuspendiert und bei -20 °C eingefroren. Um Proteindegradationen zu vermeiden,

wurden alle nachfolgenden Schritte auf Eis bzw. mit gekühlten Gerätschaften und Puffern durchgeführt.

Nach dem Auftauen der Zellen wurden diese durch sonifizieren mit einem UP50H Sonicator (Dr. Hielscher GmbH, Teltow) lysiert. Die unlösliche Fraktion wurde dann durch Zentrifugation bei 20000 rpm (Beckman Avanti JE Centrifuge, JA-25.50 Rotor) pelletiert. Der Überstand wurde mit 100 mM NaCl supplementiert und vorsichtig auf eine Säule mit 1ml Amyloseharz (NEB, Ipswich, MA, USA) aufgetragen. Die Flussrate wurde auf 1 Tropfen /10 Sekunden eingestellt. Das Amyloseharz mit dem gebundenen Protein wurde dreimal mit 10 ml Säulenpuffer gewaschen und anschließend durch den Zusatz von 10 mM Maltose zum regulären Säulenpuffer, eluiert. Alternativ wurde der NHS Kopplungspuffer verwendet, bei einer Aufreinigung des MBP-Fusionsproteins für die Antikörperreinigung.

Die Messung der Proteinkonzentration erfolgte wie beschrieben in **Abschnitt 2.4.1**. Die Reinheit der Proteinaufreinigung wurde anschließend per *SDS-Page* untersucht.

Säulenpuffer

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

NHS Kopplungspuffer

0.2 M NaHCO₃; 0.5 M NaCl; pH 8.3

2.4.9 Generierung polyklonaler Antikörper in Kaninchen

Für die Immunisierung von zwei Kaninchen wurden die MBP Fusionsproteine (NE81-Volllänge, CP75-N-Terminus), nach der Aufreinigung durch die Amylose-Affinitätschromatographie und der Ankonzentrierung in Centricon-Säulen YM-50 ((Millipore, Billerica, MA, USA) auf 1mg/ml, verwendet. Die Immunisierung der Tiere wurde durch die Firma Biogenes GmbH (Berlin) nach einem Standardprotokoll durchgeführt. Pro Tier erfolgten 4- 5 Applikationen des Antigens. Die generierten Seren trafen nach 30 und 60 Tagen ein und wurden durch Immunfluoreszenz und *Western Blot* auf Spezifität getestet. Die Immunisierung der Kaninchen für die Generierung des CP75 Antikörpers lieferte kein Produkt.

Die Seren die nach der Immunisierung mit dem MBP-NE81 beider Kaninchen generiert wurden, lieferten spezifische Nachweise des NE81-Proteins. Das Serum des 4066 wurde für die Affinitätsreinigung (**Abschnitt 2.4.10**) ausgewählt.

2.4.10 Affinitätsreinigung von Antikörpern

0,5 mg des in NHS-Kopplungspuffer gelösten MBP-Fusionsprotein (MBP-NE81) wurde mit einem Centricon YM-50 (Millipore, Billerica, MA, USA) auf ein 1 - 2 ml Volumen konzentriert.

1 ml NHS-aktivierter Sepharose, gewaschen mit 1 mM eiskalter HCL, wurde mit dem ankonzentrierten MBP-Fusionsproteins supplementiert und über Nacht bei 21 °C in Bewegung gehalten. Für die Vorbereitung der NHS-Sepharose auf die Antikörperelution, wurde diese alternierend mit Puffer A und Puffer B gewaschen. Die Inkubationszeiten betragen für Puffer A 15 min, gefolgt von zweimaliger Inkubation für 60 min, während Puffer B zum Spülen der Sepharosesäule verwendet wurde. Anschließend wurde die Proteinsäule mehrmals mit TBS gespült. Für die Aufreinigung der Antikörper wurden die Seren 1:10 in TBS verdünnt und anschließend auf die Sepharosesäule mit dem kovalent gebundenen Antigen gegeben. Die Säule wurde gründlich mit TBS gewaschen. Danach wurden die spezifischen Antikörper mit 100 mM Glycin, pH 2,7 eluiert und sofort mit 1M Tris/HCL, pH 9,5 neutralisiert. Die erhaltenen Antikörperfraktionen wurden durch Immunoblots auf ihre Spezifität getestet und die Konzentration wurde getestet wie in **Abschnitt 2.4.1** beschrieben.

Puffer A

1M Tris/Cl; 0.5 M NaCl; pH 8.5

Puffer B

0.1 M Natriumacetat; 0.5 M NaCl; pH 4.0

2.4.11 Isolation von Centrosomen aus *Dictyostelium*

Zur Vermeidung von Proteindegradation, wurden alle nachfolgenden Schritte des Aufreinigungsprozesses auf Eis durchgeführt. Zusätzlich wurden ausschließlich eiskalte Puffer und gekühlte Zentrifugen/Rotoren verwendet. Die erhaltenen Centrosomen dienten als Probe für die *SDS-Page*, oder wurden in Immunfluoreszenzexperimenten eingesetzt. Die Isolation wurde nach einem modifizierten Protokoll durchgeführt (Gräf *et al.*, 1998). Ungefähr 1×10^9 Zellen mit einer maximalen Dichte von 4×10^6 Zellen/ml wurden geerntet und zweimal mit je 30 ml Phosphatpuffer gewaschen. Das darauf folgende erneute Waschen mit Phosphatpuffer, erfolgte mit supplementiertem Cytochalasin A (2 μ m). Die Zellen wurden anschließend in 10 ml Lysepuffer aufgenommen und durch einen Vortex (Vortex Genie 2) mit maximaler Intensität resuspendiert und lysiert. Das erhaltene Lysat wurde dann durch einen Nucleopore Filter (Whatman, Maidstone, UK), mit einer Porengröße von 5 μ m, gepresst und

Material und Methoden

anschließend 10 min lang bei 4000 rpm (Hettich Rotanta, 5624 Rotor) zentrifugiert. Dieser Zentrifugationsvorgang diente der Pelletierung von Zellkernen und assoziierten Centrosomen. Der erhaltene Überstand wurde verworfen und das Pellet in 10 ml Pyrophosphatpuffer mit Hilfe eines Vortex resuspendiert. Es erfolgte eine erneute Zentrifugation bei 4000 rpm. Der entstandene Überstand wurde mit 2 mg Heparin supplementiert und 5 min lang auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die Lösung, die einen 30 % igen Saccharosegehalt aufwies, auf einen Saccharosegradienten geladen. Dieser setzte sich zusammen aus 1 ml 80 % iger und 1 ml 50 % iger Saccharoselösung und wurde in Beckman SW-40 Gefäßen errichtet. Der Gradient wurde 1 h bei 40000 g (21000 rpm, Beckman Optima L-100K Ultrazentrifuge, SW40 Rotor) zentrifugiert und danach sofort auf Eis gestellt. Mit Hilfe einer Peristaltikpumpe und einer Glasskapillare (Flussrate \sim 200 μ l pro min) wurden 500 μ l der 80 % Saccharosefraktion vom Boden des SW-40 Gefäßes entfernt und verworfen. Dann wurde erneut 1 ml Saccharoselösung vom Boden des Gefäßes abgesaugt und aufgefangen. Diese Fraktion stellte die Grenzschicht zwischen der 50 %-igen und 80 %-igen Saccharoseschicht dar und enthielt die aufgereinigten Centrosomen. Für die Verwendung der Centrosomen in Immunfluoreszenzexperimenten, wurden 10 – 30 μ l der Centrosomenfraktion in 1 ml eiskaltem Phosphatpuffer verdünnt und durch Zentrifugation bei 4500 rpm (Hettich Rotanta, 5624 Rotor) auf Deckgläschen sedimentiert. Die Fixierung und Anfärbung der Centrosomen mit Methanol wurde wie in **Abschnitt 2.5.1** für ganze Zellen beschrieben, durchgeführt. Dabei wurde. Für die Aufreinigung von GFP-haltigen Centrosomen war es wichtig, kein DTT oder andere reduzierende Agenzien zu verwenden. Die Verwendung der Centrosomen für die SDS Page erfolgte durch Zusatz von 1 Volumem 6 x konzentriertem, harnstoffhaltigem Probenpuffer und 3 minütiges Erhitzen auf 70 °C.

Lysepuffer

100 mM Na-PIPES, pH 6.9; 2 mM MgCl₂; 10 % (w/v) Saccharose; frisch dazu geben: 1 \times Proteaseinhibitor Cocktail; 0.25 % Triton X-100; 1 mM DTT; 2 μ M Cytochalasin A

Pyrophosphatpuffer

100 mM Na-PIPES, pH 6.9; 2 mM MgCl₂; 30 % (w/v) Saccharose;
Frisch dazu geben: 1 x Proteaseinhibitor Cocktail; 40 mM Tetra-Natriumpyrophosphat, 1 % Triton X-100; 1 mM DTT; 2 μ M Cytochalasin A

Saccharoselösungen die für den Saccharosegradienten verwendet wurden

10 mM Na-PIPES, pH 6.9; 2 mM MgCl₂; Saccharose (50 % or 80 %);

frisch dazu geben: 1 x Proteaseinhibitor Cocktail; 0.1 % Triton X-100; 2 mM DTT

1x Proteaseinhibitor Cocktail

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

2.4.12 Kernpräparation und Herstellung von Immunogoldpräparaten für die Elektronenmikroskopie

Die Elektronenmikroskopie von isolierten Zellkern/Centrosomkomplexen wurde durchgeführt wie kürzlich beschrieben (Schulz *et al.*, 2009).

Dictyostelium discoideum Zellen wurden in dem entsprechenden Selektionsmedium bis zu einer Dichte von 4×10^6 Zellen/ml kultiviert. Die anschließend durchgeführten Schritte zur Kernisolation wurden auf Eis bzw. bei 4 °C durchgeführt, um Abbauprozesse zu minimieren. Die Zellen wurden nachfolgend geerntet und bei ca. 400 g (ca. 2000 rpm) sedimentiert. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit Phosphatpuffer gewaschen, wobei das dritte Waschen mit einem Zusatz von 2 µM Cytochalasin A erfolgte, um die Depolymerisation von Aktin zu beschleunigen. Danach wurde das erhaltene Zellpellet in 30 ml Lysepuffer resuspendiert. Die Lyse der Zellen erfolgte durch nachfolgendes ein minütiges Vortexen und Filtration durch einen 5 µm Polykarbonat Filter (Nuclepore Track-Etch Membrane; Schleicher & Schuell). Zur weiteren Aufreinigung der Kerne, wurden je 10 ml des Lysates auf einen Saccharosegradienten (1 ml 50 % Saccharose, 2 ml 30 % Saccharose; beide Puffer supplementiert mit 1 x PC, 2 mM BA, 1 mM DTT, 2µM Cytochalasin A, 1 mM Na-ATP) geladen und 10 min bei 3700 g (4600 rpm) im Ausschwingrotor zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurden die Kerne an der 30 % / 50 %-Saccharosegrenze mit einer Pasteurpipette quantitativ abgesaugt. Für jede Probe wurden ungefähr 2×10^7 Kerne in 1 ml Gradientenpuffer resuspendiert und bei 2800g (400 rpm) im Ausschwingrotor auf 12-mm Deckgläschen in 24-Lochplatten zentrifugiert. Nach dem Absaugen der Überstände wurden die Zellkerne mit 0,5 % Glutaraldehyd und 50 % PHEM-Puffer 3 min fixiert. Es erfolgte mehrmaliges Waschen mit Phosphatpuffer und eine 10 minütige Inkubation mit 0,1 % Natriumborhydrat gelöst in Phosphatpuffer. Nach einem erneuten Waschschrift wurden die fixierten Kernpräparate 30 min mit 0,5 % BSA gelöst in PBS inkubiert, um unspezifischer Bindungen abzusättigen. Anschließend erfolgte die einstündige Inkubation mit dem polyklonalen NE81-Antikörper bei einer Verdünnung von 1:500. Nach dreimaligen Waschen mit PBS und der Inkubation mit dem Nanogold-konjugierten Fab-anti Kaninchen Antikörper

für 1 h, erfolgte die 15 minütige Postfixierung mit 2 % Glutaraldehyd gelöst in PBS. Dies diente zur Vorbeugung des Ablösens des sekundären Antikörpers. Nach dreimaligem Waschen der Kernpräparate mit PBS und H₂O erfolgte die Intensivierung der Signale für 45 min bei Raumtemperatur durch den Gebrauch eines kommerziellen Silber Verstärkungskit (R-Gent SE-EM; Aurion Wageningen, Niederlande). Nach dem Waschen (4x5 min) in H₂O und der Goldtönung, wurden die Proben für 15 min osmotisiert in 0,5 % OsO₄ gelöst in 0,1M Phosphatpuffer (ph 7,0) und dann mit H₂O abgespült (Laube *et al.*, 1996). Die darauf folgende Dehydrierung der Präparate fand in einer graduierten Serie von Ethanol statt. Anschließend wurden die Proben mit Einbettungsmedium versiegelt. Nach der Herstellung von ultradünnen Schnitten wurden diese mit Uranyl-Acetat (5 min) und Lead-Citrat (2 min) angefärbt (durchgeführt durch Prof. Dr. Otto Baumann). Die Untersuchung der Schnitte erfolgte mit einem Philips CM 100 Elektronenmikroskop und wurde ausgeführt durch Prof. Dr. Otto Baumann (Universität Potsdam, Abteilung Zoophysiologie).

Gradientenpuffer

10 mM Na-PiPES; pH 6,9, 2mM MgCl₂

2.4.13 Kernpräparation und Herstellung von elektronenmikroskopischer Präparaten

Die Präparation von Zellkernen aus *Dictyostelium Zellen* (AX2, GFP-NE81ΔCLIM) und die anschließende Fixierung und Aufbereitung dieser für die Elektronenmikroskopie, erfolgte wie beschrieben in **Abschnitt 2.4.12**. Die Markierung mit einem Antikörper erfolgte bei diesen Präparaten nicht. Die Untersuchung der Schnitte erfolgte mit einem Philips CM 100 Elektronenmikroskop und wurde ausgeführt durch Prof. Dr. Otto Baumann (Universität von Potsdam, Abteilung Zoophysiologie).

2.5 Zellbiologische Methoden

2.5.1 Fixierung und indirekte Immunfluoreszenz von *Dictyostelium* Zellen und Centrosomen

Die Zellen wurden aus adhärenter oder aus Schüttelkultur geerntet und mit Phosphatpuffer auf eine Dichte von $1 - 5 \times 10^5$ Zellen/ml verdünnt. Die Suspension wurde auf Deckgläschen tranferiert und verblieb dort für mindestens 15 min. Anschließend erfolgte das Absaugen der Flüssigkeit und die Fixierung der Zellen. Das Aufbereiten der Centrosomen für die Fixierung wurde beschrieben in **Abschnitt 2.4.11**.

Glutaraldehydfixierung

50 % PHEM Puffer mit frisch supplementiertem 0,5 % Glutaraldehyd und 0,5 % Triton X-100, wurde 5 min lang bei Raumtemperatur mit den abgesetzten Zellen inkubiert. Die Zellen wurden dann dreimal für 5 min mit Phosphatpuffer gewaschen. Anschließend wurde den Zellen 1 mg/ml frisch gelöstes Borhydrat (in Phosphatpuffer) 10 min lang zugesetzt. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und für die Immunfärbung verwendet.

Methanolfixierung

100 % Methanol (-20 °C) wurde 2 - 3 min bei – 20 °C mit den Zellen inkubiert. Die Zellen wurden dann mit PBS gewaschen und für die Immunfärbung verwendet.

Die fixierten Proben wurden in eine feuchte Kammer überführt, um ein Austrocknen der Präparate zu reduzieren. Die Immunfärbung mit ein bis zwei primären Antikörpern wurde 1 h lang bei Raumtemperatur durchgeführt. Der Grad der Verdünnung war abhängig vom verwendeten Antikörper. Die Präparate wurden dann dreimal 5 min lang mit PBS gewaschen, um ungebundene Antikörper zu entfernen. Der Sekundärantikörper wurde in einer Verdünnung von 1:1000 1 h lang mit den fixierten Zellen inkubiert. Die primären und sekundären Antikörper die in dieser Arbeit verwendet wurden, sind in **Abschnitt 2.1.2** aufgelistet. DNA wurde durch die Zugabe von DAPI (1 mg/ml) für 20 min angefärbt. Die Präparate wurden dreimal je 5 min mit PBS gewaschen, auf einen Objektträger transferiert und mit Mowiol eingebettet.

PHEM Puffer (Schliwa und van Blerkom, 1981)

60 mM PIPES; 25 mM HEPES; 10 mM EGTA; 2 mM MgCl₂; pH 6.9

2.5.2 Weitfeldmikroskopie

Mikroskopische Immunfluoreszenzpräparate wurden analysiert mit einem Zeiss Axiovert 200M Cellobserver HS System (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Jena). Ein DG-4 Sutter (Sutter instruments, Novato, CA, USA) fungierte als Lichtquelle und war ausgestattet mit einem ASI Piezo Tisch (Applied Scientific Instruments, Eugene, OR, USA). Für alle Applikationen an fixierten und lebenden Zellen wurde eine Zeiss AxioCam MRm Rev 3 CCD Kamera verwendet. Die Aufnahme fixierter Zellen erfolgte mit Zeiss 100x/1.4 PlanApo Linsen. Lebendzellaufnahmen wurden ausschließlich mit 63x/1.3 LCI Plan-Neofluar Linsen durchgeführt. Alle Bildstapel die von Immunfluoreszenzpräparationen aufgenommen wurden (optimaler Fokusabstand 0,25 µm), wurden mit einer schnellen, iterativen Methode dekonvulviert und als "Maximum-Intensity"-Projektionen dargestellt.

Bei der Aufnahme lebender Zellen wurden fünf Bilder pro Stapel mit einem Abstand von 0,25 μm pro Fokusebene aufgenommen. Die schnelle, iterative Filtermethode wurde für die Dekonvolution des erhaltenen Filmes verwendet. Die Vorbereitung der Zellen erfolgte, indem diese mit einer Dichte von $2 - 3 \times 10^5$ in speziellen Zellkulturschalen (World Precision Instruments, Sarasota, FL, USA) für mindestens 15 min inkubiert wurden. Dies sollte ein Absetzen der Zellen ermöglichen. Anschließend wurde das Medium abgesaugt und durch LoFlo Medium (Formedium, Hunstanton, UK) supplementiert mit 2 mg/ml Vitamin C (finale Konzentration) ersetzt. Dieses verblieb für 2- 12 h auf den Zellen. Diese konnten dann für die Lebendzellaufnahmen verwendet werden. Für die Auswertung wurde die Software Axiovision 4.8. verwendet.

2.5.3 Fluorescence recovery after photobleaching Experiment (FRAP)

Alle FRAP-Anwendungen wurden unter Verwendung von GFP als fluoreszierendem Protein durchgeführt. Die Experimente wurden ausgeführt an einem ZeissLSM710 Laser Scanning Konfokalmikroskop, ausgestattet mit einem EC PlanNeofluar 1.3/40er und 63er Objektiv, wie beschrieben in (Samereier *et al.*, 2010). Die Verwendung des 40er Objektivs erfolgte bei der Aufnahme der GFP-NE81 Zellen in der frühen bzw. späten Mitose und bei den GFP-NE81 Δ CLIM Zellen. Das 63er Objektiv kam bei der Aufnahme der GFP-NE81 Zellen in der Interphase und bei den GFP-CP75 Zellen zum Einsatz.

Hierzu wurden lebende Zellen in einem Beobachtungsschälchen mit Glasboden (Fluorodish, WPI Berlin, Germany) gegeben und mit einer dünnen Agarschicht bedeckt (Fukui *et al.*, 1987).

Die Bildaufnahme bestand aus sechs z-Stapeln pro Minute, mit einer Aufnahmezeit von fünf Bildern/Sekunde und einem Abstand der Fokusebenen von 0,8 μm .

Der Bleichvorgang einer manuell definierten Region (ROI), die weniger als 10 % der Zellfläche beinhaltete, erfolgte mit Hilfe eines 488 nm Argon-Lasers in 40 Iterationen, bei Höchstgeschwindigkeit und maximaler Laserintensität. Als Referenz für den Bleichvorgang durch die Bildaufnahme, wurde die Fluoreszenzintensität einer vergleichbaren Region in ungebleichten Zellen gemessen. Die Hintergrundfluoreszenz, ausgelöst durch das verwendete Zellkulturmedium, wurde auf null gesetzt. Ein wichtiger Punkt war, dass ROI und Referenz ROI (CO) während der Bildaufnahme ständig innerhalb des aufgenommenen Ausschnitts verblieben. Für einen statistischen Vergleich der FRAP Daten war es wichtig, dass die Zeitintervalle der unterschiedlichen Bildserien identisch waren. Für die Auswertung der FRAP-Daten wurden "Maximum-Intensity"-Projektionen mit *ImageJ* erstellt. Für jeden Zeitpunkt wurde die mittlere Fluoreszenzintensität von 4x4 Pixel (0,13 μm^2) innerhalb der

ROI, der Referenz ROI und des Hintergrundes (BG) bestimmt. Zur Vereinfachung wurde angenommen, dass der Ausbleichprozess durch die Bildaufnahme linear war.

Die Steigung der Regressionsgeraden, kalkuliert aus den CO Werten (m_{ab}), konnte somit genutzt werden, um die Werte der ROI Intensitäten für jeden Zeitpunkt zu korrigieren. Dabei ist es wichtig zu erwähnen, dass (m_{ab}) in der Regel einen negativen Wert annimmt. Die Korrektur des aufnahmebedingten Bleichvorganges wurde folgendermaßen durchgeführt:

$$\frac{ROI(t) - BG}{ROI(t=0) - BG} \times (1 - t \times m_{ab}) = \text{FRAP (normalisiert, korrigiert)}$$

Die korrigierten und normalisierten Werte der korrespondierenden Experimente wurden kombiniert und die Standardabweichung wurde berechnet. *ImageJ* wurde benutzt zur Berechnung der mittleren Intensitäten, die anderen Kalkulationen wurden durchgeführt mit Microsoft Excel 2007.

2.5.4 Anwendung von Zmpste24- Inhibitoren auf AX2-Zellen

Für die Untersuchung des Effekts von Zmpste24- Inhibitoren auf AX2-Zellen, wurden verschiedene Substanzen (Lopinavir, Ritonavir, Tipranavir; Substanzen bezogen vom *National Institutes of Health AIDS Research and Reference Reagent Programm*: www.aidsreagent.org/Index.cfm) mit AX2-Zellen inkubiert. Dies erfolgte, indem die Substanzen vor der Anwendung als 20 mM Stocklösungen in DMSO vorbereitet wurden. Danach wurde die Inkubation von 2×10^3 Zellen/ml mit 0, 20, 40 und 80 $\mu\text{M/ml}$ der jeweiligen Substanz in HL5c-Medium durchgeführt. Die Inkubationszeiten betragen 3 – 19 Tage. Anschließend erfolgte eine Fixierung der Zellen mit Glutaraldehyd (**Abschnitt 2.5.1**).

2.5.5 Verwendung des Farnesyltransferaseinhibitors 277 auf AX2-Zellen

Um den Effekt des Farnesyltransferaseinhibitors 277 (Merck, Darmstadt) auf AX2-Zellen zu untersuchen, wurden diese in HL5c-Medium kultiviert und für 19 h – 120 h mit dem FTI-277 in unterschiedlichen Konzentrationen (10 – 80 $\mu\text{g/ml}$) inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen mit Glutaraldehyd fixiert (**Abschnitt 2.5.1**).

2.5.6 Testung der Mechanosensitivität von *Dictyostelium* Zellen

Die Messung der mechanischen Belastung von AX2- und GFP-NE81 Δ CLIM Zellen erfolgte, indem diese einen Polykarbonatfilter mit einem Durchmesser von 25 mm und einer Porengröße von 12 nm passierten. Die Filtration erfolgte mit Hilfe einer Pumpe, Harvard Apparatus, PHD, 2000 *Infuse/Withdraw pump device* (Harvard Apparatus, Holliston, MA,

USA). Die Flussrate betrug dabei zwischen null und 29 ml/min. Die Zellen des erhaltenen Filtrats wurden analysiert, indem sie mit Hilfe einer verbesserten Neubauer Kammer ausgezählt wurden.

2.5.7 Untersuchung des Wachstumsverhaltens von *Dictyostelium* Zellen

Die Analyse des Wachstumsverhaltens von *Dictyostelium* Zellen wurde durchgeführt, indem jeweils drei Erlenmeyerkolben mit 3×10^5 Zellen/ml AX2- und GFP-NE81 Δ CLIM-Zellen angeimpft wurden. Die Kolben wurden anschließend auf einem Schüttler mit 150 rpm/min bei Raumtemperatur in Bewegung gehalten. Die Zählung der Zellen in einer verbesserten Neubauer Kammer fand statt, indem nach 8,5 – 15- 24- 39 und 45,5 h jeweils 10 μ l Zellsuspension entnommen und die Zellzahl bestimmt wurde.

2.5.8 Bestimmung des Durchmessers von *Dictyostelium* Zellen

Die Untersuchung der Zellgröße von AX2- und GFP-NE81 Δ CLIM Zellen erfolgte, indem der Durchmesser der Zellen mit dem Längenmessungswerkzeug der Axiovision Software 4.8 bestimmt wurde.

2.5.9 Untersuchung der Distanz zwischen Kernhülle und dem Chromatin in *Dictyostelium* Zellen

Die Bestimmung des Abstandes zwischen der Kernhülle und dem Chromatin in *Dictyostelium* Zellen, erfolgte mit dem Längenmessungswerkzeug der Axiovision Software 4.8.

3 Ergebnisse

3.1 Charakterisierung des NE81 in *Dictyostelium discoideum*

Im Rahmen der Identifizierung neuer, centrosomaler Proteine, wurden Proteine entdeckt, die als Centrosom-assoziierte Proteine bezeichnet werden (Schulz *et al.*, 2009). Eines dieser Proteine wird durch das Gen *DDB_G0289429* kodiert. Erste Versuche mit einem GFP-NE81 Fusionsprotein zeigten eine Lokalisation im Bereich der Kernhülle (**Abbildung 10**). Aufgrund seines Molekulargewichtes wurde das Protein als NE81 (*Nuclear Envelope*, 81 kDa) bezeichnet.

3.1.1 Struktur und Sequenzanalyse von NE81

Das Kernhüllenprotein NE81 besteht aus 716 Aminosäuren und ist bei den anderen sequenzierten Schleimpilzen, *Dictyostelium purpureum*, *Dictyostelium fasciculatum* und *Polyphondylium pallidum* konserviert. Die Ähnlichkeit der Aminosäuresequenz beläuft sich hierbei zwischen 36 % (*P. pallidum*) und 57 % (*D. purpureum*) (Sequenzdaten wurden freundlicherweise von Dr.G.Glöckner, IGB, Berlin zur Verfügung gestellt).

Die Sequenzanalyse mit Hilfe verschiedener Programme Coils (http://www.ch.embnet.org/software/COILS_form.html), Pfam (<http://pfam.sanger.ac.uk>) und SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de>) lässt auf eine Struktur vergleichbar mit der von nukleären Laminen schließen (**Abbildung 8**).

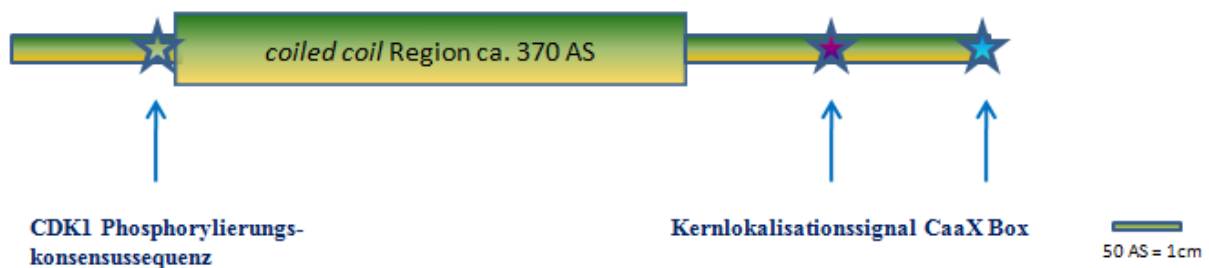


Abbildung 8: Die Struktur des NE81.

NE81 setzt sich aus einer Kopf-, Zentral- und Schwanzdomäne zusammen. Die Struktur des NE81 weist lamintypische Signaturen, wie eine CDK1-Phosphorylierungskonsensussequenz, eine potentielle *coiled-coil* Domäne, ein Kernlokalisierungssignal und eine CaaX-Box auf

Es wird vorausgesagt, dass NE81 eine zentrale, *coiled-coil* Domäne besitzt, die eine Länge von 370 Aminosäuren aufweist (**Abbildung 9**, grüne Markierung). Somit hat sie eine vergleichbare Länge mit den *coiled-coil* Bereiche von nukleären Laminen (350-360 Aminosäuren, Conway und Parry 1988, Fuchs und Weber 1994). Im Falle des NE81 wird weiterhin prognostiziert, dass der zentrale *coiled-coil* Bereich aus drei bis vier α -helikalen Domänen besteht, die durch kurze Linkerbereiche voneinander abgetrennt werden. Innerhalb

Ergebnisse

der *coiled-coil*-Domäne weisen die drei Linkerbereiche jedoch nicht das Verteilungsmuster von Intermediärfilamenten auf.

Der zentrale *coiled-coil* Bereich des NE81 wird von einer Kopf- und einer Schwanzdomäne flankiert. Die Kopfdomäne enthält eine für Lamine typische CDK1 Phosphorylierungskonsensussequenz, SPNR (der Konsensus ist: S/T-P-X-R/K, **Abbildung 9**, rote Markierung), deren Phosphorylierung unter anderem eine Depolymerisation der Lamine bewirkt. Der *coiled-coil* Region folgt eine potentielle Kernlokalisationssequenz (RKRKRSK, **Abbildung 9**, lila Markierung) und die NE81 Sequenz endet am C-Terminus mit der für Lamine typischen CaaX-Box (**Abbildung 9**, gelbe Markierung), mit der Aminosäuresequenz CLIM (Cystein-Leucin-Isoleucin-Methionin).

70	80	90	100	110	120	
EITTTTSTST	TTNNNNITTT	STSSQQSNGT	LSSSSSPTIQ	SIPTTPISKY	IPSLSQIGTP	
130	140	150	160	170	180	
LSPNR	AAQRI	REKDELSLIH	NRLKSALKKL	ESAETELEKK	NQEYEELDQK	HTATIKQLKQ
190	200	210	220	230	240	
RSDQVEKQLI	EEQNQNSDLT	SNRNILENEL	KSKESVWKKE	KDEILLKFQE	SINKLNQENS	
250	260	270	280	290	300	
LAOSQLKSEI	VSKEYEIDGL	KSEINRLKDD	LQYRIREGEE	KSRKLENEY	NRFKGKEEY	
310	320	330	340	350	360	
NQLIVSKDEE	IKKYKFEKE	KEKSSNAMNK	KENELNNLIQ	AHERQIEDMR	DSINREWELK	
370	380	390	400	410	420	
AAQMMEEHHA	RTIHLQQAVD	SFNEEKERIK	SOMETLNGQI	EDINIKNNEY	EDRIKEMNVL	
430	440	450	460	470	480	
LSQKDNSIGE	LGVEIEESKK	KMRKQADLK	SKDGQIALLO	IEINTKDNKC	NTLQETETRL	
490	500	510	520	530	540	
KSELYSITNQ	IDPEIPLDE	INSLKELVKG	FEKTVDIRKR	KRSKLQHEFN	AAANQDQNGM	
550	560	570	580	590	600	
TIEEQSSTST	TTTTSATGSS	SSTSHLDNID	SSKLPTGPEQ	SELFNPDTVS	FSLVDSNQEF	
610	620	630	640	650	660	
IKLSVHGDM	NGLSISKWRL	IVVKPDGSKS	GFSFPDGIQP	FKGIKSVTVW	TGRPRPQGTP	
670	680	690	700	710		
TENEFYWART	ELWTSPVEGT	IVKLVSPSEE	TTVTLPADG	IYQKPSSAGK	SNCLIM	

Abbildung 9: Die Primärsequenz des Kernhüllenproteins NE81.
Die Abbildung zeigt einen Überblick vom NE81 mit der Position der funktionellen Elemente, die in der Proteinsequenz markiert sind: rot: mutmaßliche CDK1-Phosphorylierungsstelle; grün: vorhergesagte *coiled-coil* Domäne; lila: Kernlokalisierungssignal; gelb: CaaX-Box für die Isoprenylierung des Proteins

Die lamintypische Ig-Faltungstelle im C-terminalen Bereich, die unter anderem für die Interaktion mit der DNA bzw. anderen Proteinen zuständig ist, ist bei *Dictyostelium*

discoideum nicht vorhanden. Das Fehlen dieser konservierten Sequenz tritt auch bei den Laminen von Tunicaten wie *Ciona intestinalis* auf (Riemer *et al.*, 2000).

3.1.2 Lokalisation des NE81

3.1.2.1 Lokalisation des GFP-NE81 Fusionsprotein in Zellen und an aufgereinigten Centrosomen

Im Rahmen einer initialen Charakterisierung des NE81 im Hinblick auf eine potentielle Ähnlichkeit zu Laminen, erfolgte zuerst die Herstellung eines rekombinanten, N-terminalen GFP-Fusionsproteins. Die anschließende Expression in *Dictyostelium* und die Analyse von fixierten Zellen mittels Fluoreszenzmikroskopie, zeigte eine Lokalisation des Proteins im Bereich der Kernhülle. Wenige Tage nach der Transformation war die Expression des Proteins sehr stark und zeigte einen prägnanten Phänotyp. Eine ausführliche Beschreibung erfolgt in **Abschnitt 3.1.3.1**. Die nachfolgenden Ergebnisse beziehen sich ausschließlich auf die Lokalisation des GFP-NE81 in *Dictyostelium* Zellen, die nach einigen Passagen der Zellkultur eine abgeschwächte Expression aufwiesen.

Das Fusionsprotein war in der Kernhülle von Interphasezellen gleichmäßig verteilt und auch im Laufe der Mitose durchgehend mit der Kernmembran assoziiert (**Abbildung 10**).

Ergebnisse

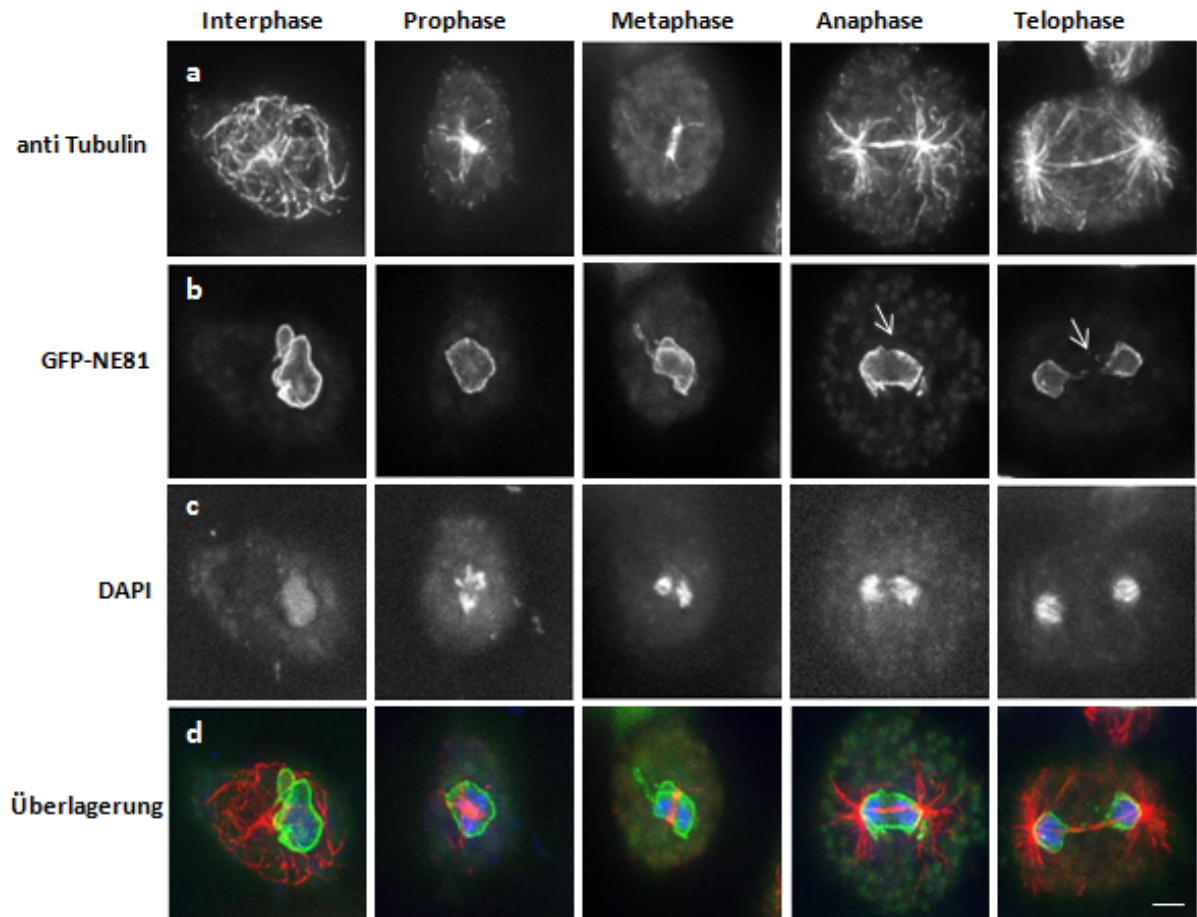


Abbildung 10: Zellzyklus-abhängige Lokalisation des GFP-NE81.

Immunfluoreszenzmikroskopie von GFP-NE81 Zellen mit Glutaraldehyd fixiert und mit anti-Tubulin/anti-Ratte AlexaFluor 568 markiert. Die Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt. Abbildung der Interphase und der verschiedenen Mitosestadien. Die grauen Abbildungen (a-c) zeigen die einzelne Darstellung des verwendeten Antikörpers, das GFP-Fusionsprotein, die DNA Markierung durch DAPI. Die Überlagerung (d) zeigt anti Tubulin in rot, GFP-NE81 in grün, DAPI in blau. Die Pfeile markieren den reduzierten NE81- Gehalt in Bereichen der Kernhülle. Balken: 2 μ m

Allerdings deutet die Verteilung der GFP-Fluoreszenzintensität auf eine verminderte Konzentration des GFP-NE81, im Bereich der Konstriktionszone während der Karyokinese hin (**Abbildung 10**, siehe Pfeil). Diese Verteilungsänderung des Proteins in Abhängigkeit vom Zellzyklus, deutet auf eine Regulation des GFP-NE81 hin.

GFP-NE81 konnte auch an aufgereinigten, fixierten Centrosomen nachgewiesen werden, die mit einem centrosomalen Marker markiert wurden (**Abbildung 11**).

Ergebnisse



Abbildung 11: Lokalisation des rekombinanten Fusionsprotein GFP-NE81 an aufgereinigten Centrosomen. Die isolierten Centrosomen wurden mit Methanol fixiert und mit anti DdCP224/anti Maus-AlexaFluor 568 als centrosomalen Marker markiert. Balken: 1 μm

Dies lässt sich damit begründen, dass zwischen dem Centrosom und der Kernhülle eine feste Verbindung vorliegt, die unter anderem durch Sun1, ein Protein beider Kernmembranen, zu Stande kommt (Schulz *et al.*, 2009). Im Rahmen der Centrosomenaufreinigung wird der Zellkern fragmentiert. Dabei können Teile der Kernhülle herausgerissen werden, welche anschließend an aufgereinigten Centrosomen sichtbar sind.

Das GFP-NE81 Signal befand sich stets an der Außenseite der Centrosomen und war unterschiedlich stark ausgeprägt. Dies lässt sich mit den verschiedenen großen Membranbestandteilen erklären, die durch die Methode der Centrosomenaufreinigung aus der Kernhülle isoliert werden.

3.1.2.2 Lokalisation des endogenen NE81

Für die Analyse der Lokalisation und des Mitoseverhaltens des endogenen NE81 in *Dictyostelium* Zellen durch indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie, war es notwendig, einen polyklonalen Antikörper zu generieren. Dies geschah durch die Expression und affinitätschromatografische Aufreinigung eines MBP-NE81 Fusionsproteins in *E. coli*, das anschließend zur Immunisierung von zwei Kaninchen verwendet wurde (**Abbildung 12 A**). Es konnten zwei funktionsfähige Antikörper hergestellt werden, die beide die gleiche Spezifität aufwiesen.

Mit Hilfe des NE81 Antikörpers konnte das endogene NE81 mittels *Western Blot* Analyse auf einem AX2-Kernextrakt nachgewiesen werden (**Abbildung 12 B**).

Ergebnisse

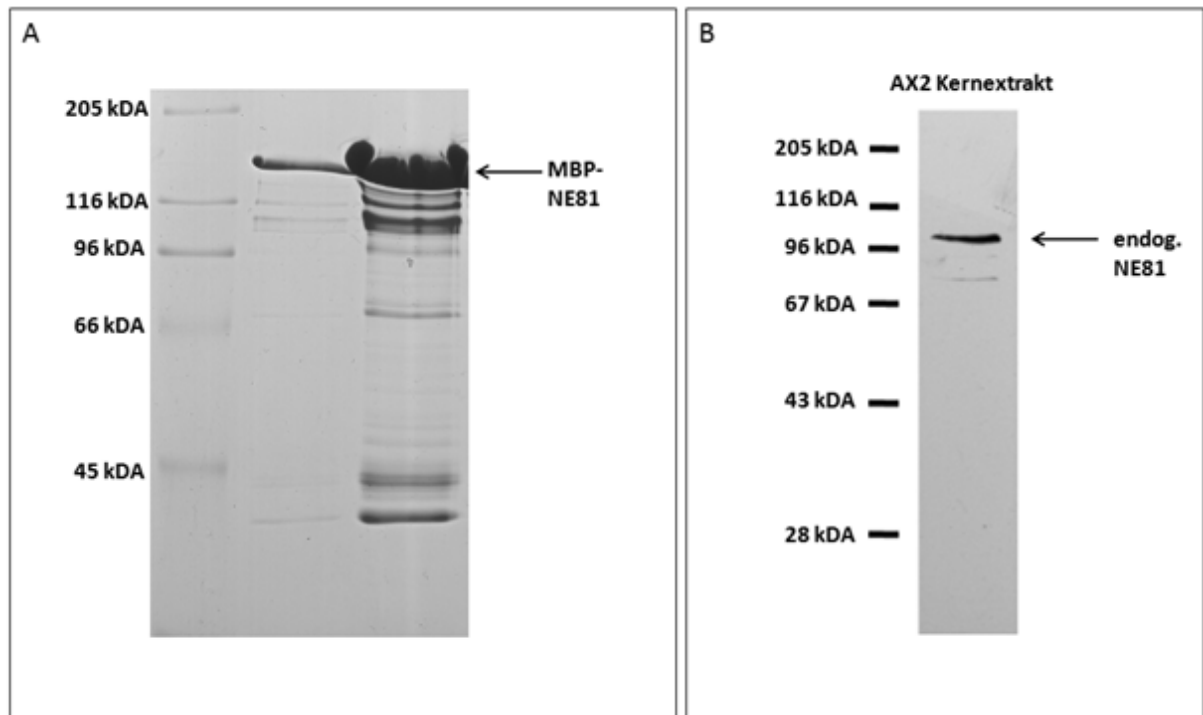


Abbildung 12: Der NE81 Antikörper erkennt spezifisch eine Bande bei ~ 98 kDa

A: Expression des MBP-NE81 als Volllängenprotein. MBP-NE81 wurde aufgereinigt, auf ein SDS-Gel übertragen und mit Coomassie angefärbt. Die starke Bande bei ~ 130 kDa korrespondiert mit dem MBP-NE81. Die Molekulargewichte sind auf der linken Seite dargestellt. **B:** Endogenes NE81 markiert mit dem aufgereinigten NE81 Antikörper. Auftragung eines Wildtyp AX2-Kernextrakts und Transfer auf eine Nitrocellulosemembran. Die Molekulargewichte sind auf der linken Seite dargestellt.

Beim Einsatz des NE81- Antikörpers im *Western Blot* fiel auf, dass NE81 bei der Auftrennung im SDS-Gel deutlich langsamer wanderte, als es vor dem Hintergrund des kalkulierten Molekulargewichts von ~81 kDa erwartet wurde. Dies könnte auf eine reduzierte Bindung des SDS an das Protein, oder eine inkomplette Denaturierung der sekundären Proteinstrukturen zurückzuführen sein (Hjelmeland und Chrambach, 1981).

Nach der Herstellung des polyklonalen NE81 Antikörpers war es möglich, die Lokalisation und das Verhalten des endogenen NE81 durch indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie an fixierten AX2-Wildtypzellen zu untersuchen (**Abbildung 13**).

Ergebnisse

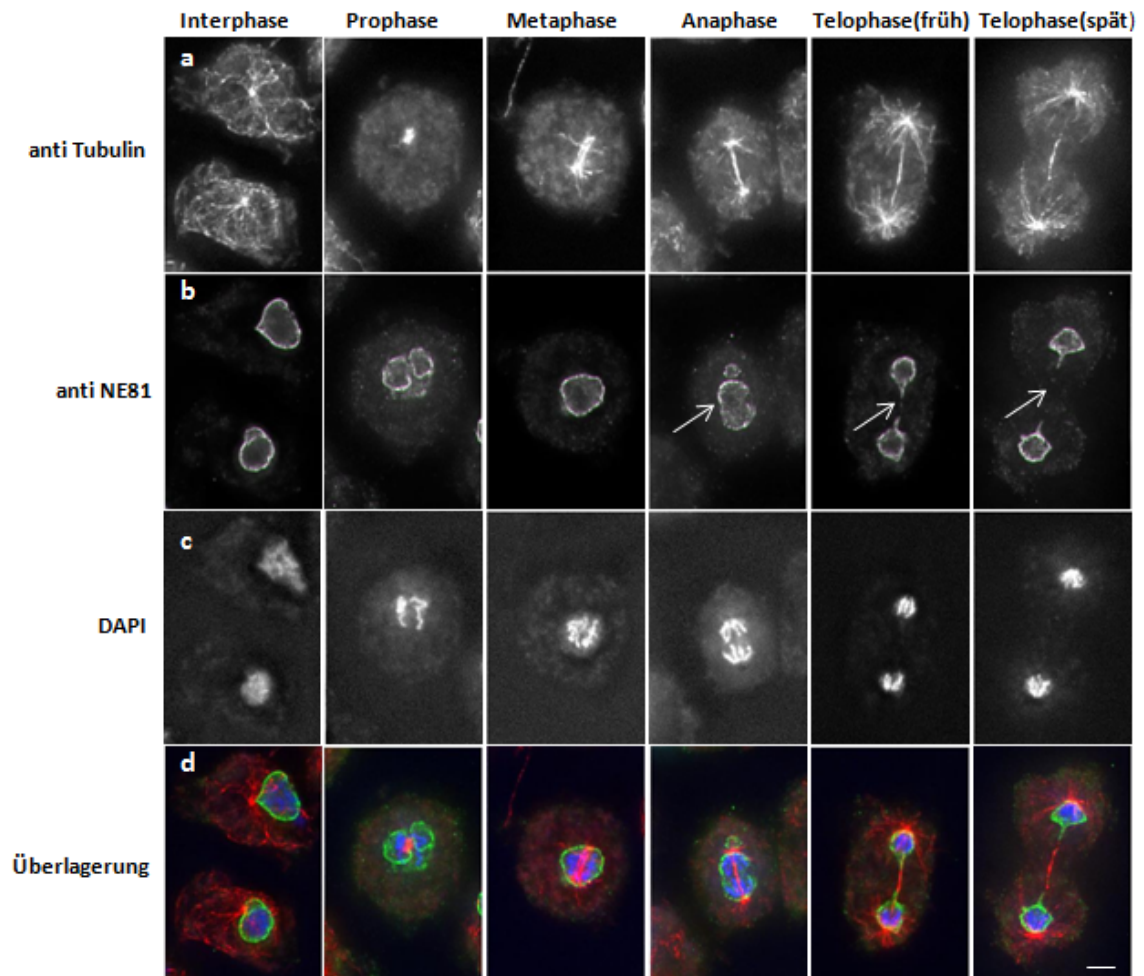


Abbildung 13: Zellzyklus-abhängige Lokalisation des endogenen NE81.

Indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie von AX2-Wildtypzellen mit Glutaraldehyd fixiert und mit anti NE81/anti-Kaninchen AlexaFluor 488, anti Tubulin/anti Ratte AlexaFluor 568 markiert. Die DNA wurde mit DAPI markiert. Abbildung der verschiedenen Mitosestadien. Die grauen Abbildungen (a-c) zeigen die einzelne Darstellung der verwendeten Antikörper anti Tubulin, anti NE81 und die DNA Markierung durch DAPI. Die Überlagerung (d) zeigt anti Tubulin in rot, anti NE81 in grün und DAPI in blau. Die Pfeile markieren den reduzierten NE81- Gehalt im Bereich der Kernhülle. Balken: 2 µm

Die mikroskopische Auswertung der Zellen zeigte, dass NE81 in der Kernhülle von *Dictyostelium* lokalisierte. In der Interphase war das Protein gleichmäßig um den gesamten Nukleus verteilt. Im Verlauf der einzelnen Mitosephasen blieb das NE81 stabil mit der Kernhülle assoziiert. Es wurde sichtbar, dass in der Karyokinese eine Reduktion bzw. Umverteilung des Proteins im Bereich der Konstriktionszone erfolgte. Der verminderte Gehalt an NE81 in diesem Bereich, war beim Übergang der Anaphase zur Telophase am deutlichsten zu erkennen. Das Fehlen von NE81 in der Äquatorialebene der Telophasespindel kann nicht durch ein Fehlen der Kernhülle begründet werden, da frühere Untersuchungen gezeigt haben, dass in diesem Telophasestadium eine intakte Kernhülle vorliegt (Moens, 1976).

3.1.2.3 NE81 ist mit der inneren Kernmembran assoziiert

Lamine bilden zusammen mit laminassoziierten Proteinen eine nukleäre Lamina aus, die mit der inneren Kernmembran assoziiert ist. Da NE81 als laminähnliches Protein im Verdacht

Ergebnisse

stand, war es wichtig, die genaue Lokalisation im Bereich der Kernhülle zu überprüfen. Dafür wurden Zellkerne aus Wildtyp *Dictyostelium* Zellen isoliert und mit einem Goldpartikelgekoppelten Antikörper markiert, der gegen das endogene NE81 gerichtet war. Die hergestellten Präparate wurden freundlicherweise durch Prof. Dr. Baumann (Universität Potsdam, Abteilung Tierphysiologie) elektronenmikroskopisch betrachtet und fotografiert. Die elektronenmikroskopische Auswertung der isolierten Zellkerne zeigte, dass der Goldpartikel-konjugierte Antikörper mit der inneren Kernmembran assoziiert war. Besonders anschaulich wurde dieser Effekt in Bereichen, in denen die innere und äußere Kernmembran getrennt voneinander vorliegen (**Abbildung 14**, siehe Pfeil). Es wurde damit deutlich, dass NE81 im Bereich der inneren Kernhülle lokalisierte.

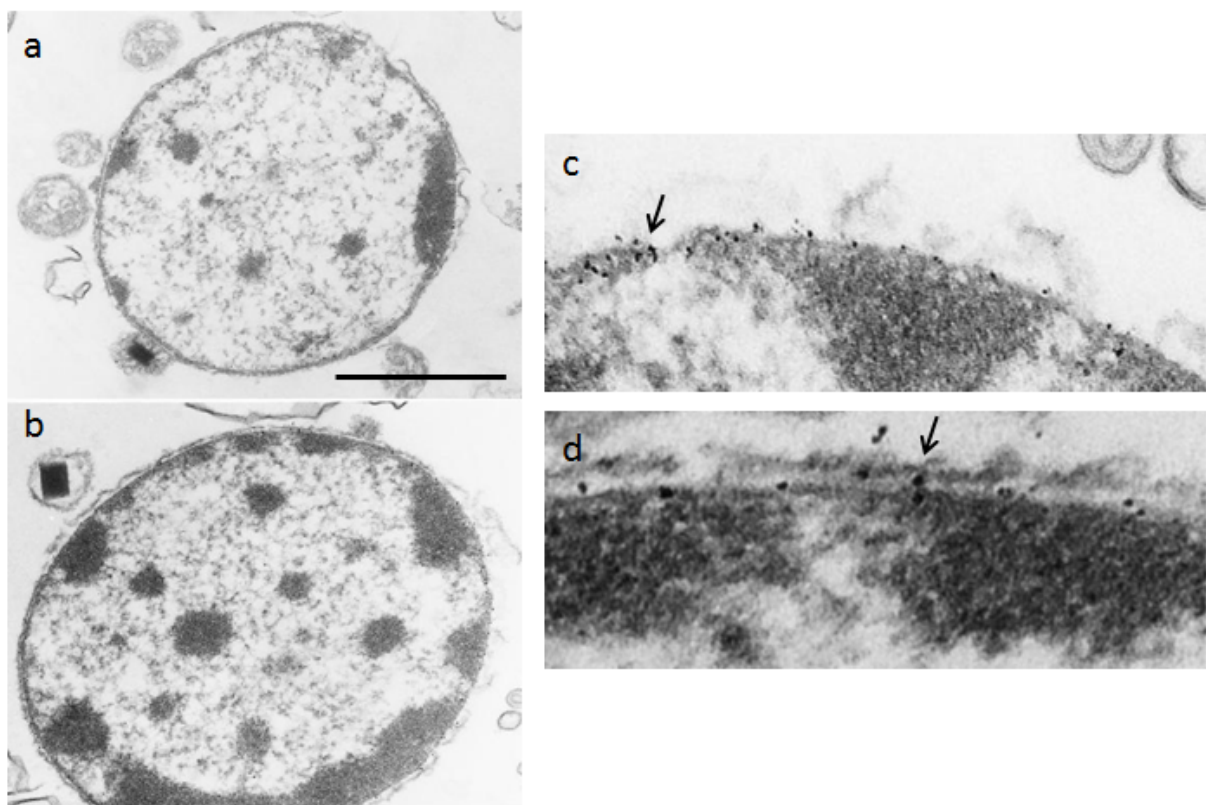


Abbildung 14: NE81 ist mit der inneren Kernhülle assoziiert.

Immunogold Elektronenmikroskopie von isolierten AX-2 Wildtyp-Zellkernen, markiert mit anti-NE81 und Nanogold anti-Kaninchen Fab Fragmenten. a, b: Die Abbildungen zeigen einen Überblick über zwei isolierte Zellkerne. c, d: Darstellung ausgewählter Vergrößerungen aus der Abbildung b. Die Pfeile zeigen endogenes NE81, das mit einem Goldpartikelgekoppelten Antikörper markiert ist. Die Assoziation des Nanogold Fab-Fragmentes wird besonders in den Bereichen deutlich, in denen die äußere Kernhülle von der inneren Kernhülle dissoziiert vorliegt (Abb. c, d) Balken: 1 µm

3.1.3 Charakterisierung der Überexpression des GFP-NE81 Fusionsprotein

3.1.3.1 Die Überexpression des GFP-NE81 resultiert in einer stark vergrößerten Kernhülle

Lamine übernehmen in den Zellen eine Vielzahl an Funktionen, die sich durch die Interaktion mit zahlreichen Proteinen begründen lässt. Zu den Funktionen der nukleären

Ergebnisse

Intermediärfilamente zählen u.a. die Chromatinorganisation, die Aufrechterhaltung der Membranintegrität und die Verbindung zwischen nukleärer Lamina- und Cytoskelett (Dahl *et al.*, 2008). Das NE81 auch eine laminähnliche Funktion in den *Dictyostelium* Zellen übernimmt, wurde sichtbar durch die phänotypische Auswertung von GFP-NE81 Zellen kurz nach der Transformation, wo das GFP-Fusionsprotein stark überexprimiert wird (**Abbildung 15**).

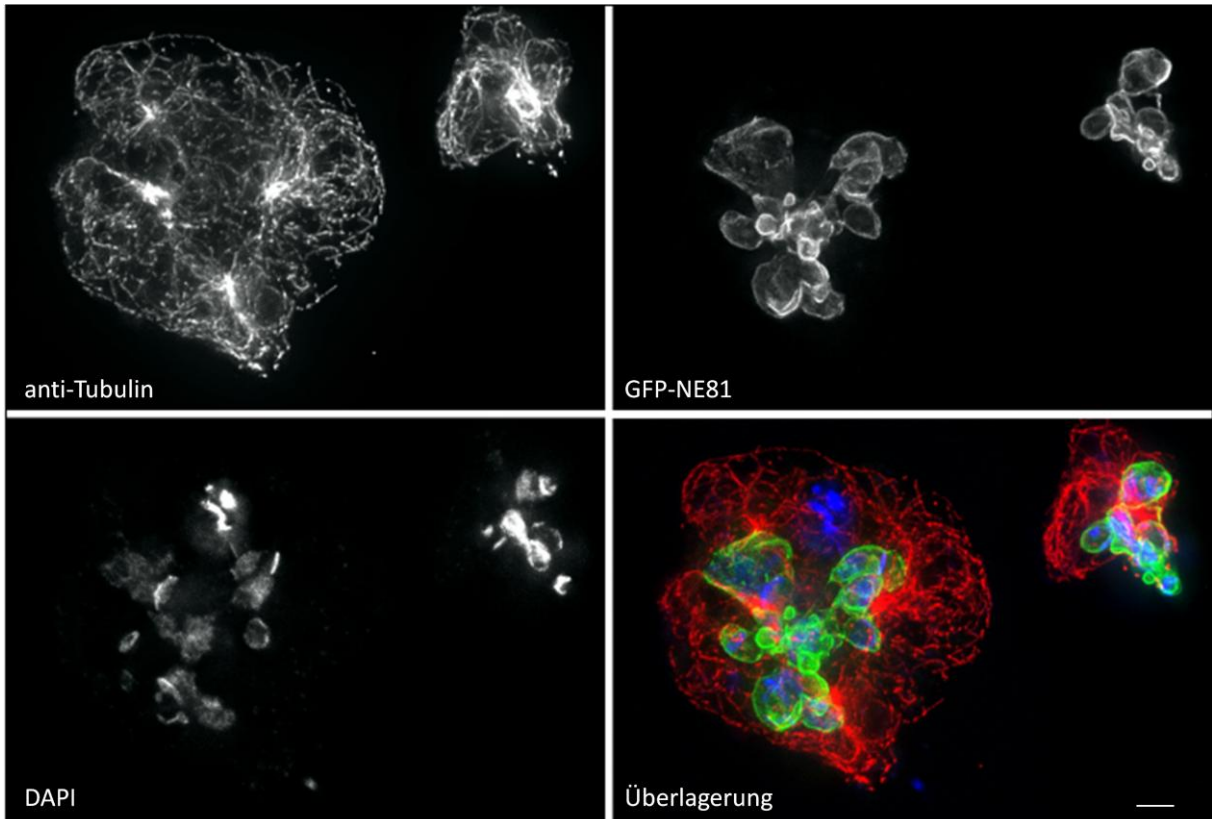


Abbildung 15: Die GFP-NE81 Überexpression führt zu deformierten Zellkernen und ungleichmäßig organisiertem Chromatin.

Immunfluoreszenzmikroskopie von GFP-NE81 Zellen zwei Wochen nach der Transformation. Die Zellen wurden mit Glutaraldehyd fixiert und mit anti-Tubulin/anti Ratte AlexaFluor 568 markiert. Die DNA wurde mit DAPI markiert. Die Überlagerung zeigt das GFP in grün, das Tubulin in rot und die DNA in blau. Balken: 2µm

Die Transformation des GFP-NE81 Konstrukts in die AX2-Zellen resultierte in einer stark vergrößerten, blasigen Kernhülle mit einer großflächigen Verteilung über die Zelle. Dies ging mit einer veränderten, bzw. teilweise fehlenden Organisation um das Chromatin einher, so dass dieses über die Zelle verteilt vorlag und auch außerhalb der Kernhülle zu finden war. Das Erscheinungsbild des Chromatins, das durch die Markierung mit DAPI erkennbar wurde, zeigte eine differentielle Konzentration der DNA in verschiedenen Zellbereichen.

Die starke Überexpression des GFP-NE81 Fusionsproteins schien sehr schädlich für die Zellen zu sein, so dass ein starker Selektionsdruck gegen die GFP-NE81 stark exprimierenden Zellen herrscht. Folglich zeigte sich nach einigen Tagen und mehrfachen Passagierungen ein deutlich attenuierter Phänotyp (**Abbildung 10**).

Ergebnisse

Die folgenden Aussagen beziehen sich auf die abgeschwächte Expression des GFP-NE81, die im Vergleich zum endogenen Protein 3,2-fach stärker war (**Abbildung 16**). Dieses Ergebnis wurde durch die densitometrische Auswertung eines *Western Blot* mit der Software *ImageJ* erhalten.

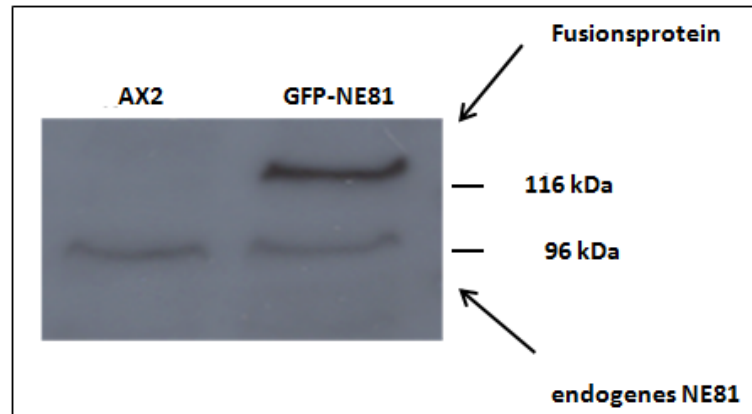


Abbildung 16: Die Expression des GFP-NE81 ist 3,2-fach stärker gegenüber dem endogenen NE81.

Abbildung des *Western Blots* von AX2- und GFP-NE81-Gesamtzellextrakten mit einer attenuierten Expression des GFP-Fusionsproteins. Der Nachweis der Proteine erfolgte durch den NE81-Antikörper. Die Detektion der Proteinbanden wurde durchgeführt mit verstärkter Chemolumineszenz (ECL). Der Antikörper erkennt eine Bande bei ~98 kDa und bei ~120 kDa. Diese stimmen mit den kalkulierten Proteingrößen von 81 kDa und 124,5 kDa überein.

Die vergrößerte Kernhülle in den GFP-NE81-Zellen resultierte in einem erhöhten Abstand vom Chromatin. Dieser wurde an fixierten Zellen mit dem Längenmessungswerkzeug der Axiovision Software 4.8 in dem Bereich mit der größten Entfernung zwischen Chromatin und Kernhülle ermittelt. Die AX2-Zellen wurden für diesen Versuch mit dem anti-NE81-Antikörper markiert (**Abbildung 17**).

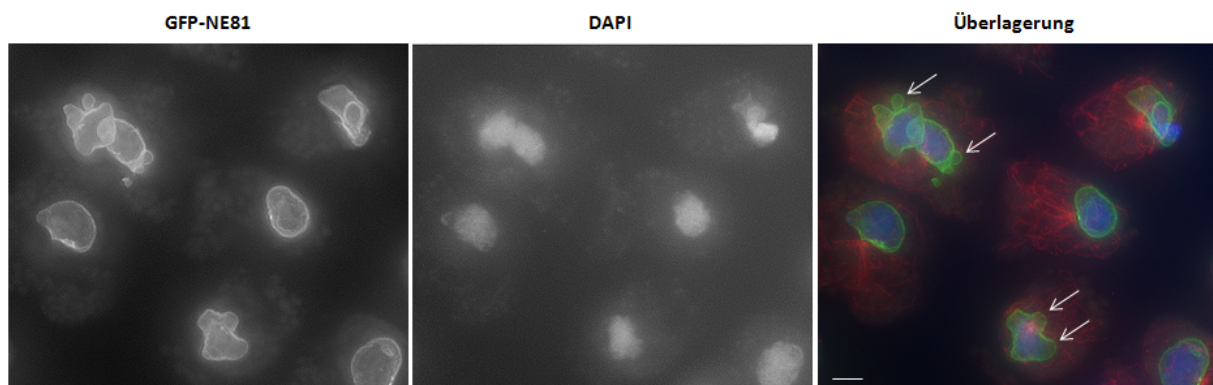


Abbildung 17: Die GFP-NE81-Überexpression resultiert in einem erhöhten Abstand zwischen Kernhülle und Chromatin.

Immunfluoreszenzmikroskopie von GFP-NE81-Zellen mit attenuiertem Phänotyp. Die Pfeile markieren repräsentative Zellen mit einem vergrößerten Abstand zwischen dem Chromatin und der Kernhülle. Die Zellen wurden mit Glutaraldehyd fixiert und mit anti-Tubulin/anti-Ratte AlexaFluor 568 markiert. Die DNA wurde mit DAPI markiert. Die Überlagerung zeigt das GFP in grün, das Tubulin in rot und die DNA in blau. Balken: 2 μm

Die Distanz belief sich bei den AX2-Zellen auf $0,073 \mu\text{m} \pm 0,2$ ($n=230$) und bei den GFP-NE81-Zellen auf $0,486 \mu\text{m} \pm 0,4$ ($n=256$). Bei den GFP-NE81-Mutanten wiesen 70,7 % der Zellen einen Abstand $\geq 0,3 \mu\text{m}$ zwischen der DNA und der Kernhülle auf, bei den AX2-Zellen waren es 24,3 % (**Abbildung 18**, **Abbildung 19**).

Ergebnisse

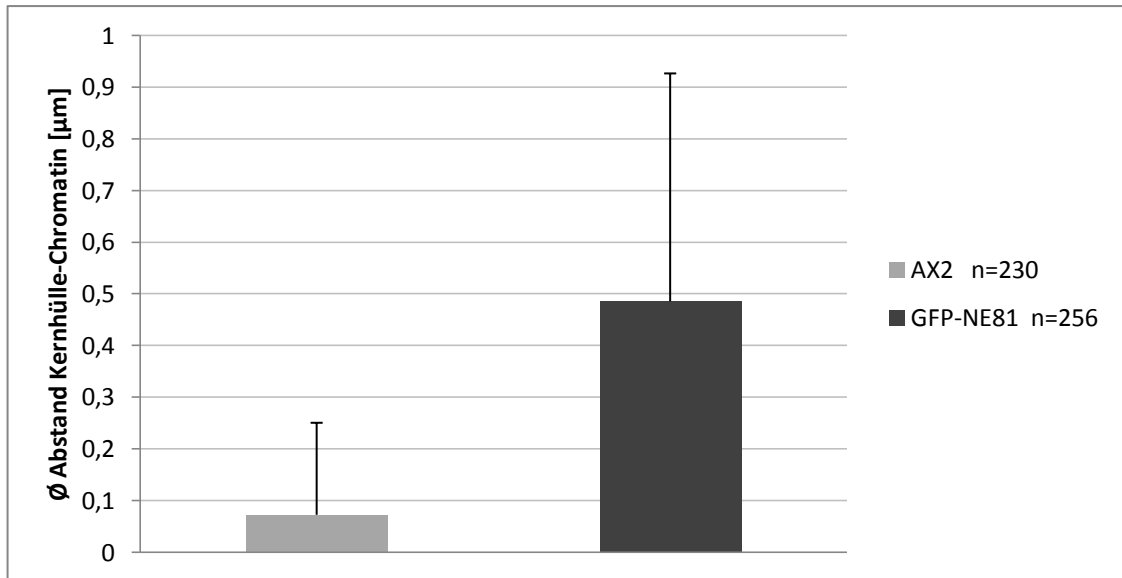


Abbildung 18: Die GFP-NE81 Überexpression führt zu einem erhöhten Abstand zwischen Chromatin und Kernhülle. Abbildung des durchschnittlichen Abstands zwischen Chromatin und Kernhülle in AX2- und GFP-NE81 Zellen. Der Abstand in den GFP-NE81 Zellen ist deutlich erhöht (AX2: $0,073\mu\text{m} \pm 0,2$ n=230; GFP-NE81: $0,486\mu\text{m} \pm 0,4$ n=256).

Die genauere Auswertung der Kern- und Centrosomenanzahl in den GFP-NE81 Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen erfolgte, durch das Auszählen der Antikörper-bzw. GFP-markierten Zellorganellen in fixierten Präparaten. Es zeigte sich dabei, dass die numerische Übereinstimmung von Kernen und Centrosomen in beiden Zelllinien ähnlich hoch war (AX2: 98 %, n=326; GFP-NE81- Zellen: 94 %, n=256). Der prozentuale Anteil überzähliger Centrosomen lag bei den GFP-Zellen bei 0,4 % und beim Wildtyp bei 2 %. AX2-Zellen zeigten keine unterzähligen Centrosomen, im Gegensatz zu den GFP-NE81 Zellen (2,3 %) (Abbildung 19).

Ergebnisse

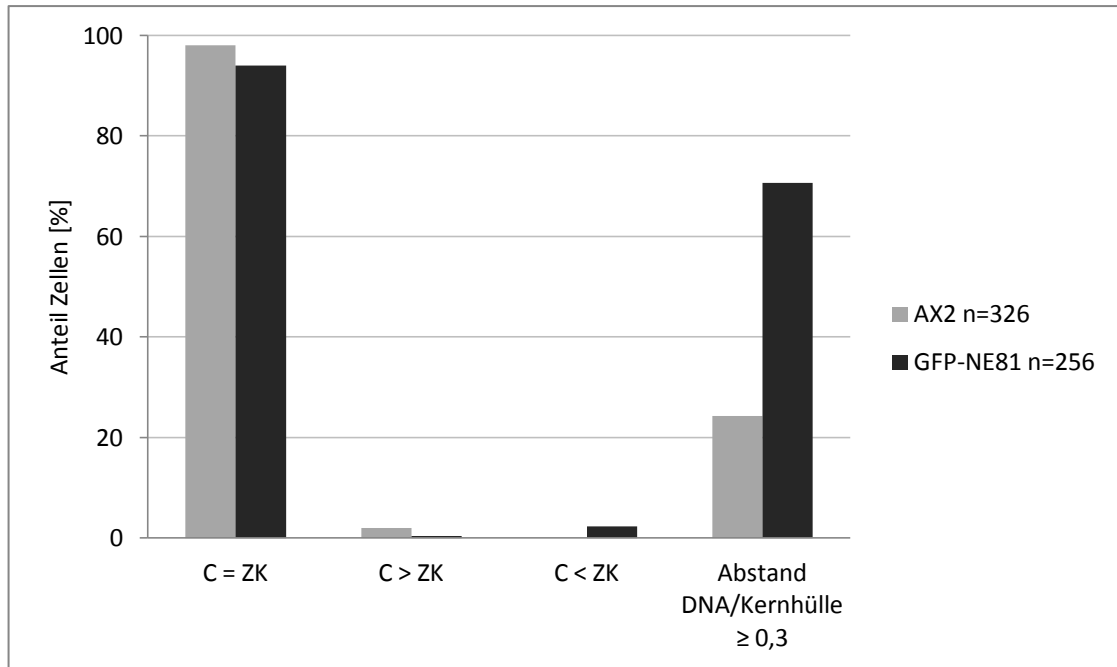


Abbildung 19: GFP-NE81 Zellen zeigen keine deutlichen Unterschiede bei der Analyse von Zellkern - und Centrosomenanzahl.

Angabe des prozentualen Anteils von AX2-Wildtypzellen und GFP-NE81 Zellen mit gleicher Anzahl von Centrosomen und Zellkernen (C = ZK), überzähligen Centrosomen (C > ZK), fehlenden Centrosomen (C < ZK) und einem Abstand $\geq 0,3 \mu\text{m}$ zwischen der DNA/Kernhülle.

3.1.3.2 Das in der Interphase immobile GFP-NE81 Fusionsprotein zeigt eine erhöhte Mobilität in der frühen Mitose

In Säugerzellen konnte nachgewiesen werden, dass Lamine in der Interphase eine stabile nukleäre Lamina ausbilden und darin keine Mobilität zeigen. Ihre Phosphorylierung zu Beginn der Mitose triggert die Disassemblierung des Laminskeletts, was mit entsprechend hoher Mobilität der Lamine einhergeht (Boban *et al.*, 2010; Broers *et al.*, 1999; De Souza und Osmani, 2007). Dieses Phänomen sollte mit den GFP-NE81 Zellen durch FRAP-Analyse (*fluorescence recovery after photobleaching*) in *Dictyostelium* überprüft werden. Der genaue Ablauf des durchgeführten Experiments ist in **Abschnitt 2.5.3** beschrieben. Falls das NE 81 eine Hauptkomponente der nukleären Lamina darstellt, würde man erwarten, dass in der Interphase keine starke Proteinbewegung innerhalb des Zellkerns vorhanden ist. Mit dem Eintritt in die Mitose sollte die Mobilität des Proteins erhöht sein, um die Konstriktion der Kernhülle während der Karyokinese zu gewährleisten.

Für die Untersuchung dieses Phänomens wurden GFP-Mutanten verwendet, die sich in den verschiedenen Stadien des Zellzyklus befanden (Interphase, frühe Mitose, späte Mitose).

Zu Beginn des Versuches wurde die Ausgangsfluoreszenz des GFP-NE81 Fusionsproteins in einem definierten Bereich der Kernhülle gemessen. Anschließend wurde die GFP-Fluoreszenz des Fusionsproteins mit einem starken Laserpuls ausgebleicht. Im Anschluss daran, wurde das erneute Erscheinen von GFP-NE81 im ausgebleichten Bereich untersucht.

Ergebnisse

In den Zellkernen die sich in der Interphase befanden, zeigte das GFP-NE81 zum Zeitpunkt null seine volle Fluoreszenzintensität. Nach dem Ausbleichen einer definierten Region der Kernhülle, kam es zu einem drastischen Abfall der mittleren Fluoreszenzintensität auf ca. 10 % des Ausgangswerts. Auch nach fast 380 Sekunden ließ sich kein signifikanter Anstieg der Intensität im Vergleich zur Ausgangsfluoreszenz beobachten (**Abbildung 20**).

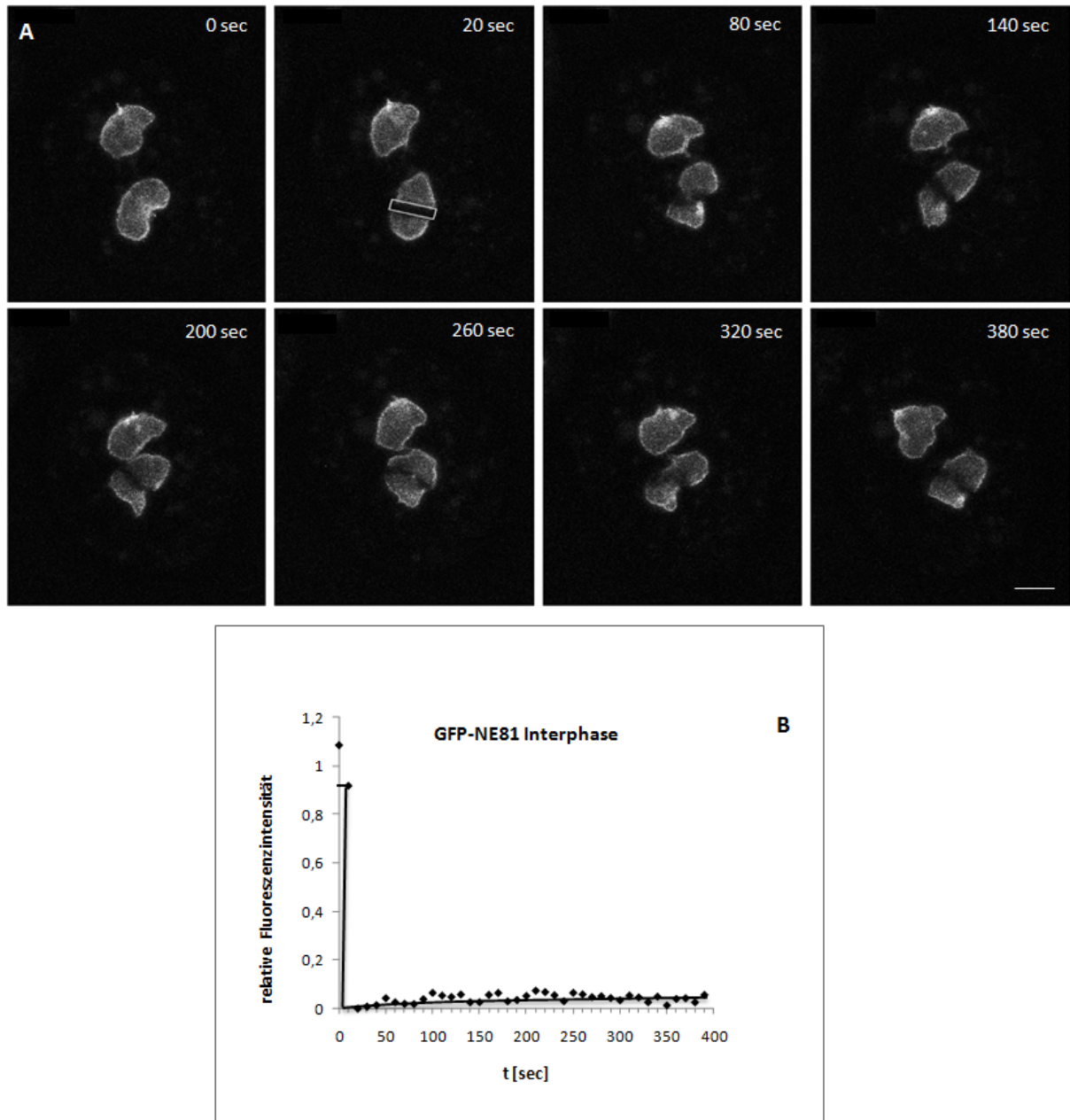


Abbildung 20: GFP-NE81 zeigt keine deutliche Mobilität innerhalb der Kernhülle während der Interphase.

FRAP Experiment in einer 3D-Zeitreihe, aufgenommen an einen konfokalem Laserscanning Mikroskop. Die ausgebleichene Region ist durch einen weißen Balken markiert. Die Aufnahmezeit betrug sechs z-Stapel pro Minute (Bildanzahl: fünf Bilder/s). Abbildung der "Maximum-Intensity"-Projektion von fünf Schichten/Abbildung.

A,B: Ausbleichen definierter Regionen in der Interphase ohne Regenerierung der Fluoreszenz

B: korrigierte FRAP- Kurve eines repräsentativen Experimentes (n= 15)

Die x-Achse gibt den zeitlichen Verlauf wieder, die y-Achse stellt die relative Fluoreszenz dar.

Ergebnisse

Das GFP-NE81 zeigte somit in der Interphase keine nennenswerte Mobilität, d.h. es fand kein Austausch von Proteinen zwischen dem Cytosol und dem Zellkern statt. Das Protein ist offensichtlich fest mit der Kernmembran assoziiert. Es lassen sich somit Rückschlüsse auf eine mögliche strukturelle Funktion des Proteins im Zellkern ziehen.

Im Gegensatz dazu verhielt sich GFP-NE81 in Metaphase-Zellen völlig anders. Das Auffinden von mitotischen Zellen erfolgte anhand ihrer typischen Zellmorphologie im Hellfeld. Gegenüber Interphasezellen sind mitotische Zellen deutlich abgerundet, zeigen aufgrund der Golgifragmentierung viel mehr Vesikel und es sind keine Nukleoli mehr zu erkennen.

Nach dem Ausbleichen eines Kernhüllenbereichs auf eine relative Fluoreszenzintensität von ca. 10% des Ausgangswerts, ließ sich schon nach 50 - 100 Sekunden ein Anstieg der relativen Fluoreszenzintensität messen, die sich im Folgenden an die Höhe der Ausgangsfluoreszenz annäherte. Es zeigte sich somit in frühen mitotischen GFP-NE81 Zellen eine drastisch erhöhte Mobilität des GFP-Fusionsproteins (**Abbildung 21**).

Ergebnisse

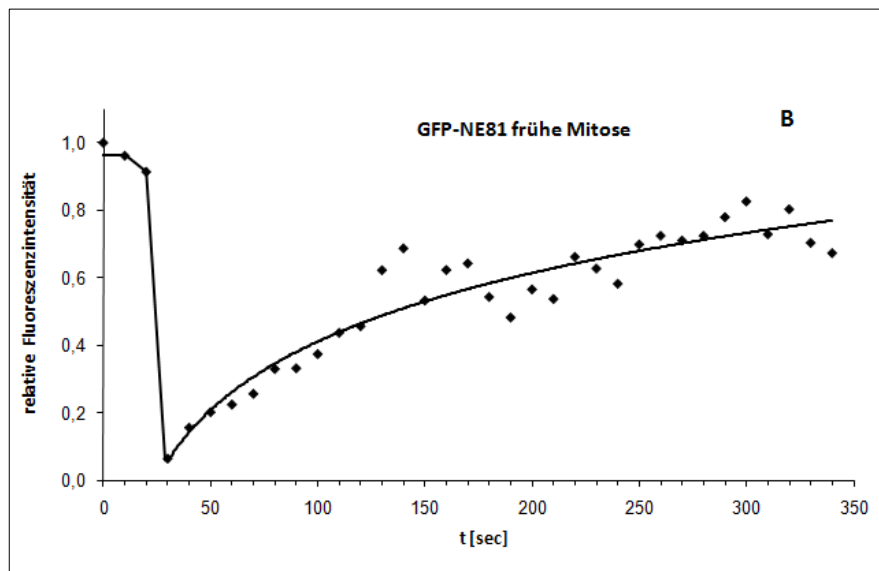
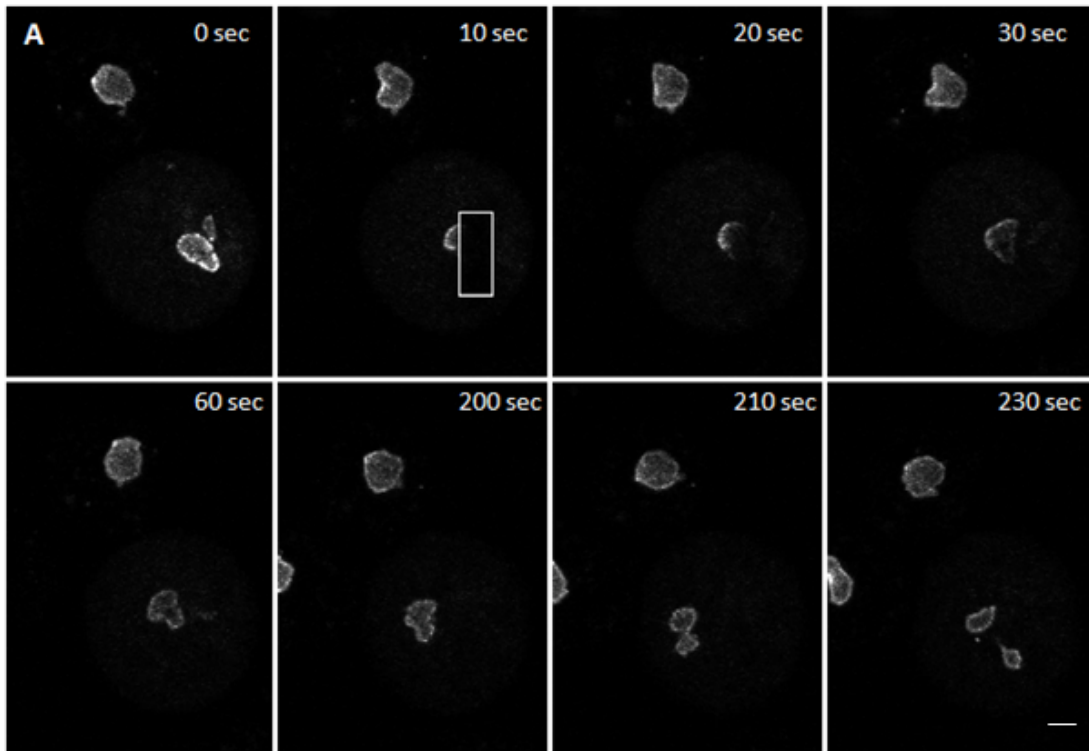


Abbildung 21: GFP-NE81 zeigt eine deutliche Mobilität innerhalb der Kernhülle während der Metaphase.

FRAP Experiment in einer 3D-Zeiterie, aufgenommen an einen konfokalem Laserscanning Mikroskop. Die ausgebleichte Region ist markiert durch einen weißen Balken. Die Aufnahmezeit betrug sechs z-Stapel pro Minute (Bildanzahl: fünf Bilder/s). Abbildung der "Maximum-Intensity"-Projektionen von fünf Schichten/Abbildung.

A,B: Ausbleichen definierter Region während der Metaphase mit Regenerierung der Fluoreszenz

B: korrigierte FRAP- Kurve eines repräsentativen Experimentes (n= 4)

Die x-Achse gibt den zeitlichen Verlauf wieder, die y-Achse stellt die relative Fluoreszenz dar.

In Telophase-Zellen konnte nach dem Ausbleichen des GFP-Fusionsproteins in der Kernhülle, wie bei Interphase-Zellen kein signifikanter Anstieg der Fluoreszenz innerhalb von 150 Sekunden gemessen werden (**Abbildung 22**).

Ergebnisse

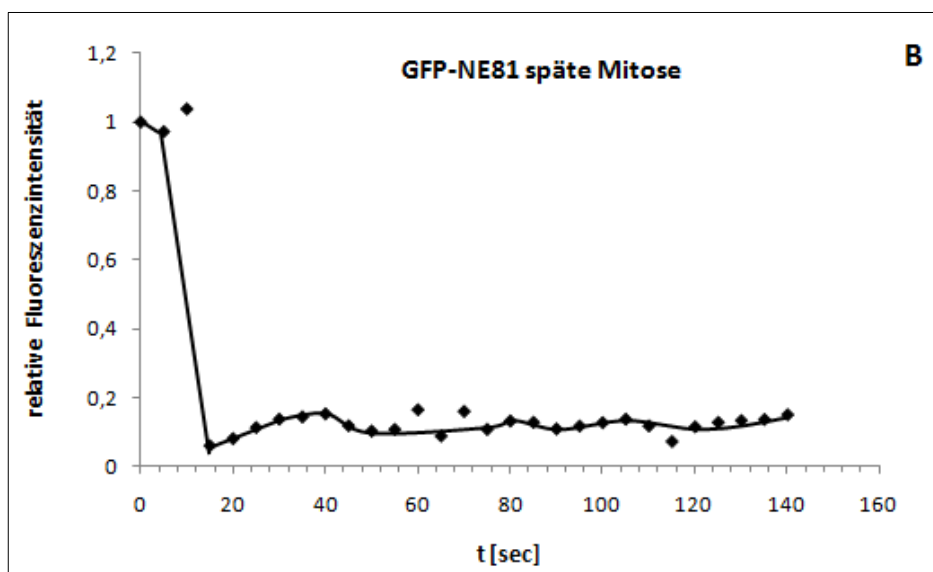
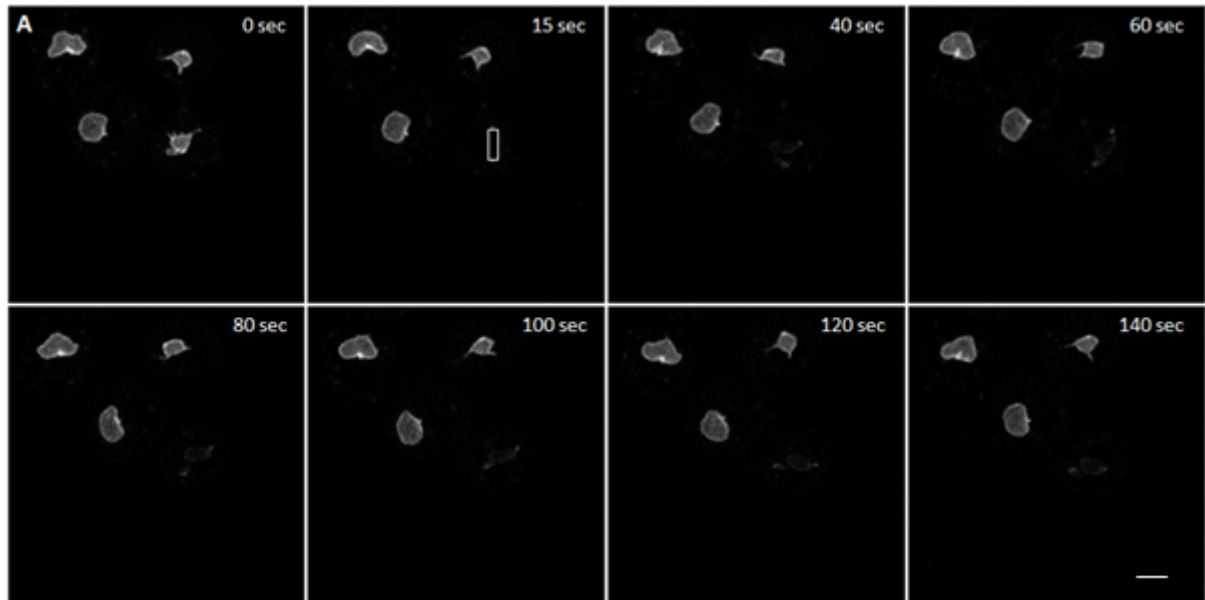


Abbildung 22: GFP-NE81 zeigt keine deutliche Mobilität innerhalb der Kernhülle während der Telophase.

FRAP Experiment in einer 3D-Zeiterie, aufgenommen an einen konfokalem Laserscanning Mikroskop. Die ausgebleichte Region ist markiert durch einen weißen Balken. Die Aufnahme rate betrug sechs z-Stapel pro Minute (Bildanzahl: fünf Bilder/s). Abbildung der "Maximum-Intensity"-Projektionen von fünf Schichten/Abbildung.

A,B: Ausbleichen definierter Region während der Telophase ohne Regenerierung der Fluoreszenz

B: korrigierte FRAP- Kurve eines repräsentativen Experimentes (n= 1)

Die x-Achse gibt den zeitlichen Verlauf wieder, die y-Achse stellt die relative Fluoreszenz dar.

Das Protein ist somit in Abhängigkeit vom Zellzyklus mobil, was mit der Annahme einhergeht, dass NE81 einen Bestandteil der nukleären Lamina darstellt und eine strukturgebende Funktion innerhalb des Zellkerns übernimmt.

3.1.4 Funktionelle Charakterisierung von NE81

3.1.4.1 Der Phänotyp der NE81 Nullmutante bekräftigt die laminähnliche Funktion des Proteins

Lamine übernehmen, wie vorher beschrieben, in den Zellen eine Vielzahl an Funktionen, die sich durch die Interaktion mit zahlreichen Proteinen begründen lässt. Um weitere Einblicke in die Funktion des NE81 zu bekommen und um mögliche Rückschlüsse auf eine Laminartigkeit des Proteins ziehen zu können, wurde eine NE81 Nullmutante generiert.

Hierfür wurde ein Konstrukt hergestellt, das neben einer Blastizidinkassette ein 820 bp großes, genomisches DNA-Fragment aus der 5'UTR-Region und ein 680 bp großes Fragment aus dem C-terminalen, kodierenden Bereich des Gens enthielt. Dieses wurde linearisiert und in Wildtypzellen transformiert. Die homologe Rekombination führt bei Erfolg zum Ersatz der chromosomalen NE81 kodierenden Sequenz durch die Blastizidinkassette (**Abbildung 23**). Die Expression des C-terminalen, kodierenden Fragmentes ist in diesem Fall unwahrscheinlich, da bei der Herstellung der NE81 Nullmutante ein Teil des Promotors deletiert wird.

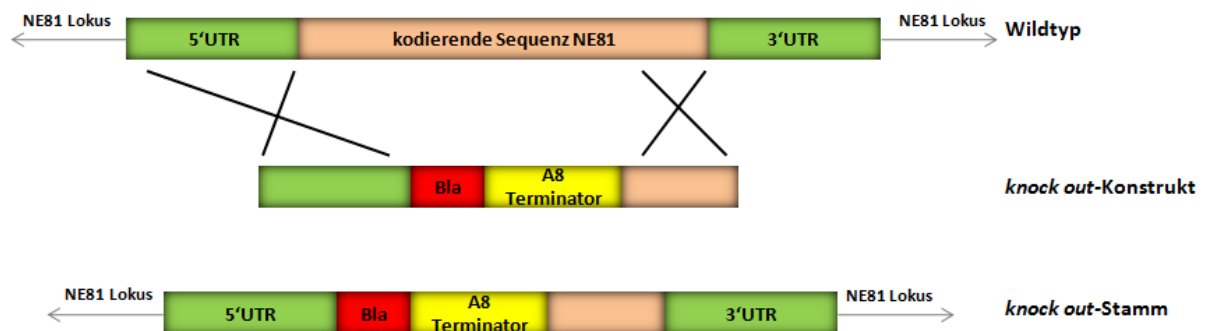


Abbildung 23: Generierung einer NE81-Nullmutante durch homologe Rekombination.

Schematische Darstellung der homologen Rekombination beim NE81 *knock out*. In diesem Fall wurde die kodierende Region des NE81 durch eine Blastizidinkassette ersetzt (hier dargestellt als Bla, A8 Terminator und 620 bp der kodierenden NE81 Sequenz), es resultierte eine unterdrückte Genexpression und eine Blastizidinresistenz.

Der erfolgreiche Einbau des *knock out*-Konstruktes durch homologe Rekombination und damit die Deletion eines Teils der kodierenden Sequenz, wurde mit Hilfe des NE81 Antikörpers durch Immunfluoreszenzmikroskopie an fixierten Zellen nachgewiesen. Der Antikörper konnte im Fall des *knock out* kein endogenes NE81 in der Kernhülle mehr markieren (**Abbildung 24**). Trotz der mehrfachen Transformation des *knock out* Plamides und der Vereinzelung von Zellen, konnte kein reiner Stamm erzeugt werden. Die Zellen, die das Konstrukt ektopisch ins Genom integriert hatten, überwucherten die Nullmutanten. Das Vorliegen der Mischkultur brachte den Vorteil, dass die *knock out* Mutanten von den anderen Zellen unterschieden werden konnten, da nur ein Teil der fixierten Zellen mit dem NE81 Antikörper markiert waren. Es konnte damit einerseits die Funktionsfähigkeit des Antikörpers

Ergebnisse

bestätigt werden, andererseits dienten die NE81 exprimierenden Zellen als praktische interne Kontrolle zur Auswertung des *knock out* Phänotyps.

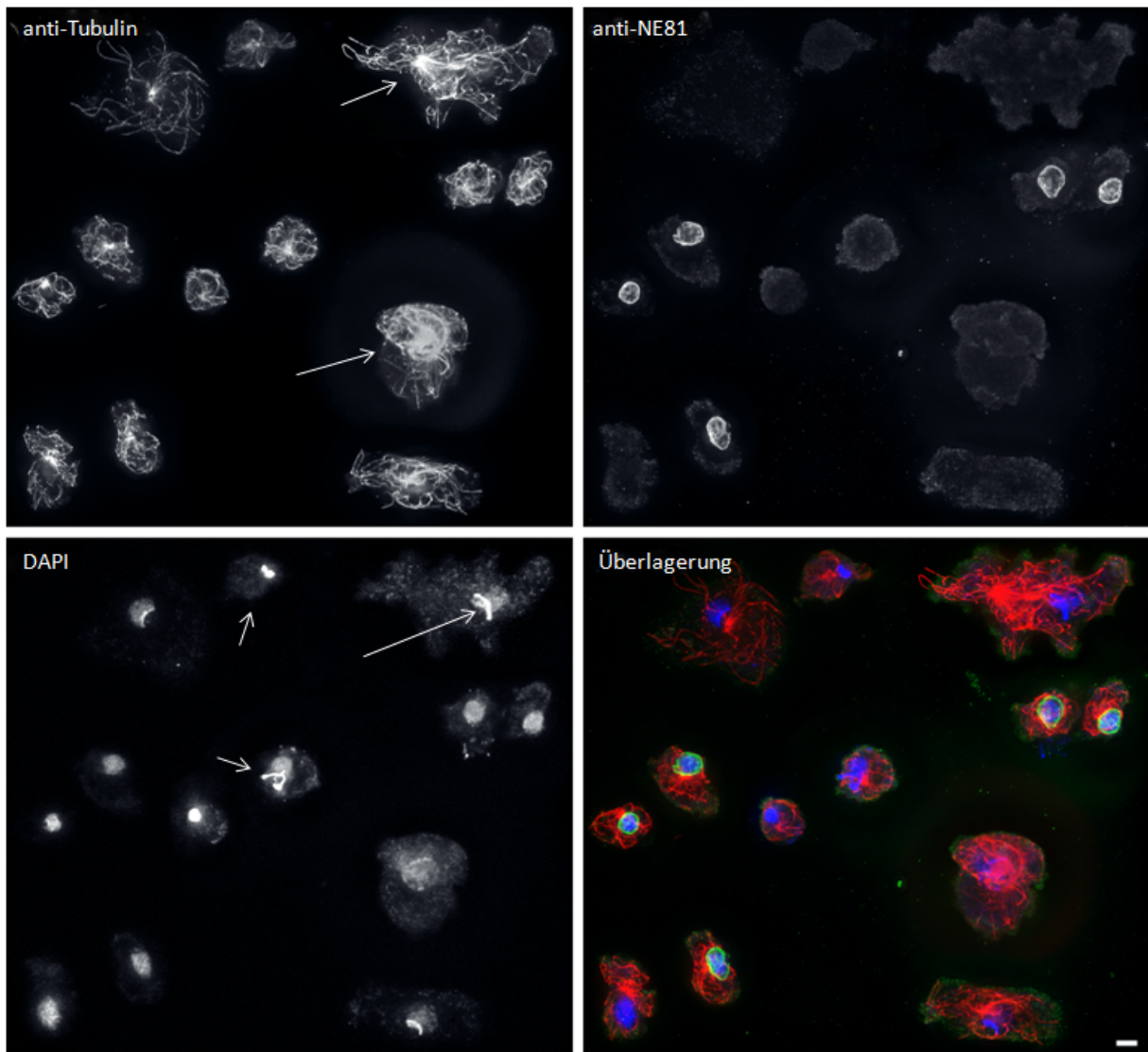


Abbildung 24: Phänotyp des NE81 *knock out*.

Die Generierung einer NE81 Nullmutante führt zu ungleichmäßig kondensiertem Chromatin, häufig fehlorganisierte Mikrotubuli und zu einem erhöhten Abstand zwischen Centrosom und Zellkern. Indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie von transformierten NE81 *knock out* Zellen. Die Zellen wurden mit Glutaraldehyd fixiert und mit anti Tubulin/anti Ratte AlexaFluor 568, anti NE81/anti Kaninchen AlexaFluor 488 markiert. Die DNA wurde mit DAPI gefärbt. Die Überlagerung zeigt anti-NE81 in grün, anti Tubulin in rot, DAPI in blau. Die Pfeile zeigen beispielhaft Phänotypen der NE81-Defizienz. Balken: 2µm

Zellen ohne NE81 Expression zeichneten sich durch deformierte Zellkerne mit unterschiedlich starker Chromatinkondensation aus. Dies wurde durch eine starke, helle Anfärbung der DNA und durch unterschiedlich große Kerne sichtbar (**Abbildung 24**, siehe Pfeil). Die missgebildeten Zellkernen waren bei 31,6 % der Nullmutanten vertreten (AX2: 0 %) und sind in **Abbildung 25** beispielhaft dargestellt.

Ergebnisse

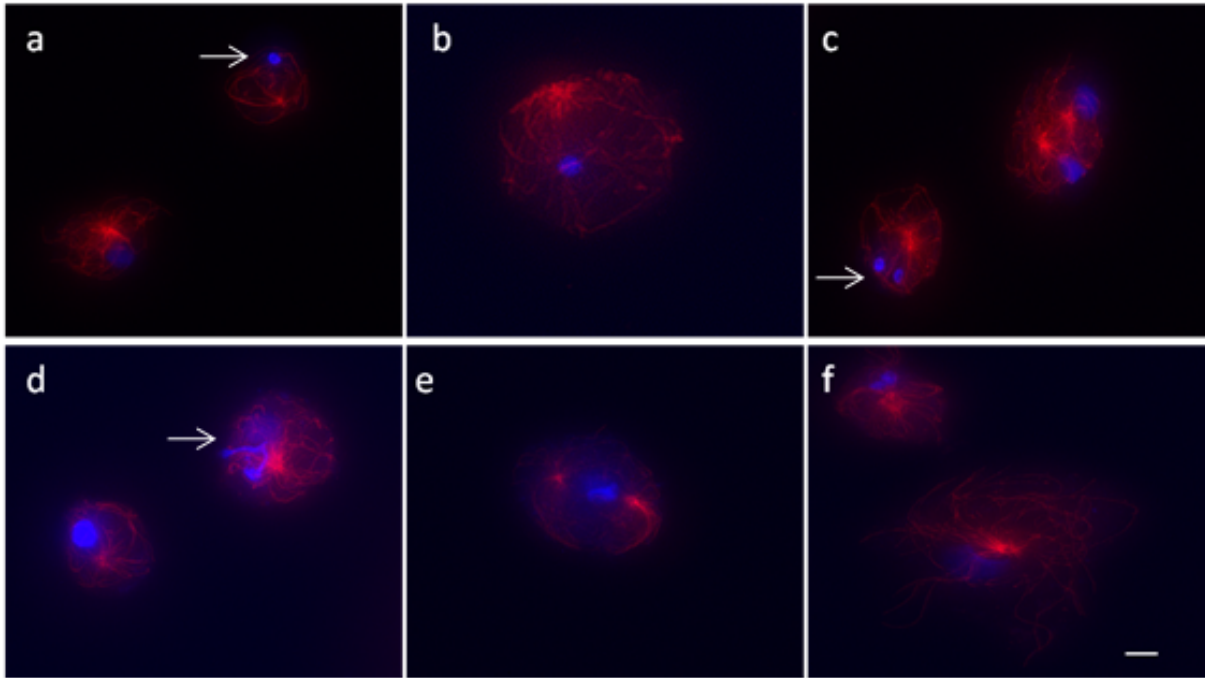


Abbildung 25: Darstellung verschiedener Kernphänotypen in NE81 defizienten Zellen.

Abbildung a-f zeigt Immunfluoreszenzbilder von NE81 *knock out* Zellen in der Interphase. Die Zellen wurden mit Glutaraldehyd fixiert und mit anti NE81/anti Kaninchen AlexaFluor 488, anti Tubulin/anti Ratte AlexaFluor 568 markiert. Die DNA wurde mit DAPI gefärbt. Die Überlagerung zeigt anti-Tubulin in rot, DAPI in blau. Der grüne Kanal ist nicht dargestellt. Die Pfeile zeigen beispielhaft verschiedene missgebildete Zellkerne. Balken :2 µm

Weiterhin konnte ein hoher Anteil an Nullmutanten detektiert werden, deren Centrosom/Zellkernverbindung gestört war und einen Abstand von ≥ 1 µm zwischen Centrosom und Zellkern aufzeigten (*knock out* Mutante: 55,3 %). Gemessen wurde die Entfernung zwischen Kernhülle und Centrosom in "Maximum-Intensity"-Projektionen. Die reguläre Distanz zwischen Zellkern und Centrosom liegt in Wildtypzellen deutlich unter 1 µm. Die AX2-Zellen die in diesem Versuch verwendet wurden, zeigten in 5 % der Fälle einen erhöhten Abstand zwischen Centrosom und Zellkern.

Weiterhin konnte bei den *knock out* Mutanten beobachtet werden, dass der Anteil von Zellen mit überzähligen bzw. unterzähligen Centrosomen im Gegensatz zu AX2 leicht erhöht war (überzählige Centrosomen: AX2: 2 %; NE81 Nullmutante; 6,6 %; unterzählige Centrosomen: AX2: 0 %, NE81 Nullmutante: 5,3 %). Die numerische Übereinstimmung von Centrosomen und Zellkernen wurde durch die fehlende NE81 Expression demzufolge auch gering beeinflusst (AX2: 98 %, NE81 Nullmutante: 88 %). Die Verteilung der Merkmale in den NE81-defizienten Zellen im Vergleich zu den AX2-Kontrollzellen ist in der **Abbildung 26** graphisch dargestellt.

Ergebnisse

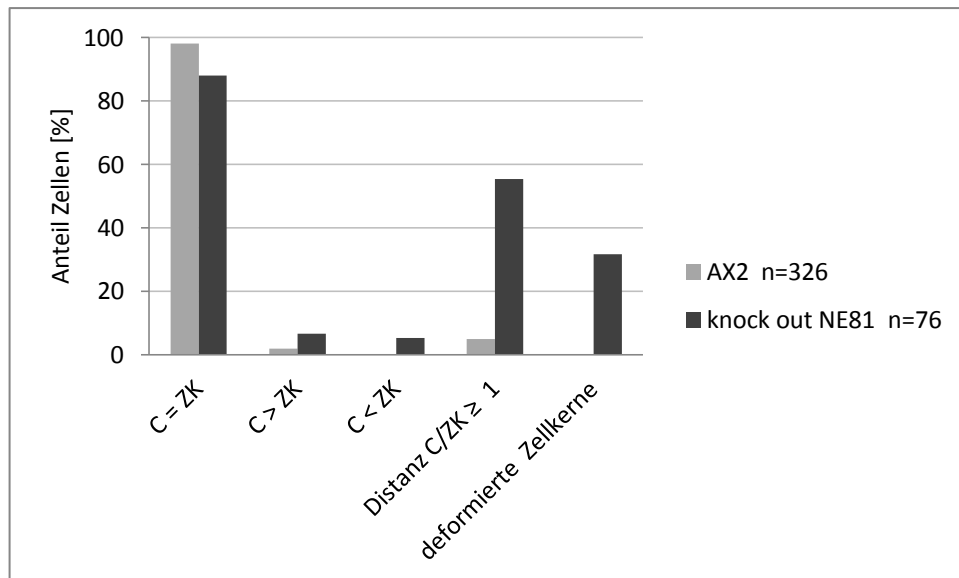


Abbildung 26: NE81 Nullmutanten zeigen Unterschiede im Vergleich zu AX2-Wildtypzellen.

Angabe des prozentualen Anteils von Zellen mit gleicher Anzahl von Centrosomen und Zellkernen ($C = ZK$), überzähligen Centrosomen ($C > ZK$), fehlenden Centrosomen ($C < ZK$), Zellen mit einer erhöhten Distanz zwischen Centrosom/Zellkern, deformierte Zellkerne

3.1.5 Analyse von zwei CaaX-Box deletierten NE81 Proteinvarianten

3.1.5.1 Die CaaX-Box beeinflusst die Lokalisation von NE81 im Zellkern

Es ist bekannt, dass Lamine durch die posttranslationale Modifikationen der CaaX-Box im Bereich der inneren Kernmembran lokalisieren (Hofemeister *et al.*, 2000). Dementsprechend war es wichtig zu überprüfen, inwiefern die CaaX-Box, die im NE81 durch die Aminosäuren Cystein – Leucin – Isoleucin - und Methionin (CLIM) repräsentiert wird, die Lokalisation des Proteins beeinflusst.

Die funktionelle Charakterisierung der hochkonservierten Sequenz erfolgte durch die Herstellung eines GFP-NE81 Konstrukts, bei dem die letzten vier Aminosäuren, d.h. die sogenannte CaaX-Box, deletiert wurde. Die resultierenden *Dictyostelium* GFP-NE81 Δ CLIM Zellen wurden fixiert und durch indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie untersucht.

Das GFP-Fusionsprotein bildete in Interphasezellen ca. acht Proteinclustern innerhalb des Zellkerns aus. Die Proteincluster variierten in ihrer Größe und schienen meist mit der Kernmembran assoziiert zu sein. Das Cytoplasma der Zellen zeigte keine GFP-Fluoreszenz.

In mitotischen Zellen veränderte sich das Bild deutlich. Die GFP-NE81 Δ CLIM Cluster waren bereits in der Prophase nicht mehr detektierbar. Gleichzeitig konnte eine deutliche Zunahme der GFP-Fluoreszenz im Cytoplasma beobachtet werden, die während der Interphase nicht vorhanden war. Zu Beginn der Telophase traten die GFP-NE81 Δ CLIM Cluster im Bereich des Chromatins und der mitotischen Spindel wieder auf. Zeitgleich kam es zur Abnahme der GFP-Fluoreszenz im Cytosol (**Abbildung 27**).

Ergebnisse

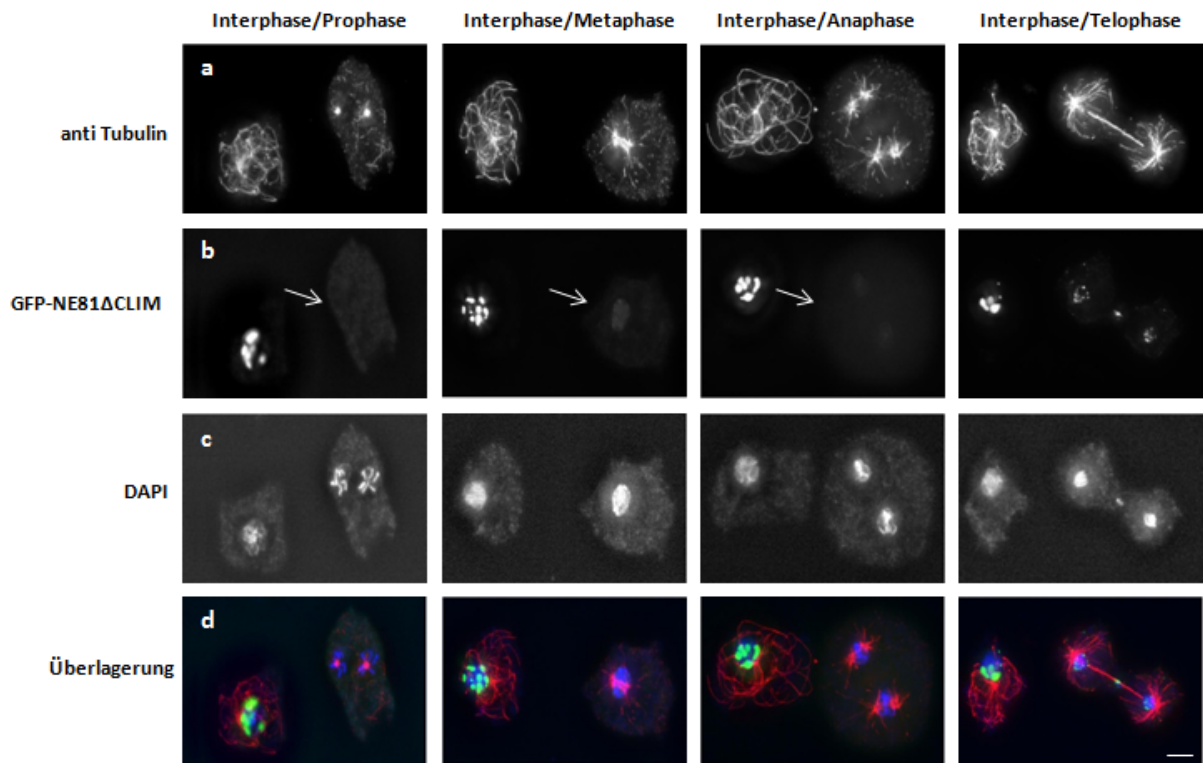


Abbildung 27: GFP-NE81ΔCLIM bildet reversible Aggregate innerhalb des Zellkerns.

Immunfluoreszenzmikroskopie von GFP-NE81ΔCLIM Zellen mit Glutaraldehyd fixiert und mit anti Tubulin/anti Ratte AlexaFluor 568 markiert. Die grauen Abbildungen (a-c) zeigen die einzelne Darstellung des verwendeten Antikörpers, das GFP-Fusionsprotein und die DNA-Markierung durch DAPI. Balken: 2 µm

Um die Expressionsstärke des GFP-NE81ΔCLIM Proteins gegenüber dem endogenen Protein zu bestimmen, wurde eine *Western Blot* Analyse mit einem Gesamtzellextrakt aus Wildtypzellen und GFP-NE81ΔCLIM Zellen durchgeführt. Der Nachweis der Proteinbanden erfolgte mit dem NE81 Antikörper. Die densitometrische Auswertung wurde mit *ImageJ* durchgeführt. Diese ergab, dass GFP-NE81ΔCLIM im Vergleich zum endogenen NE81 4,9-fach stärker exprimiert wurde (**Abbildung 28**).

Ergebnisse

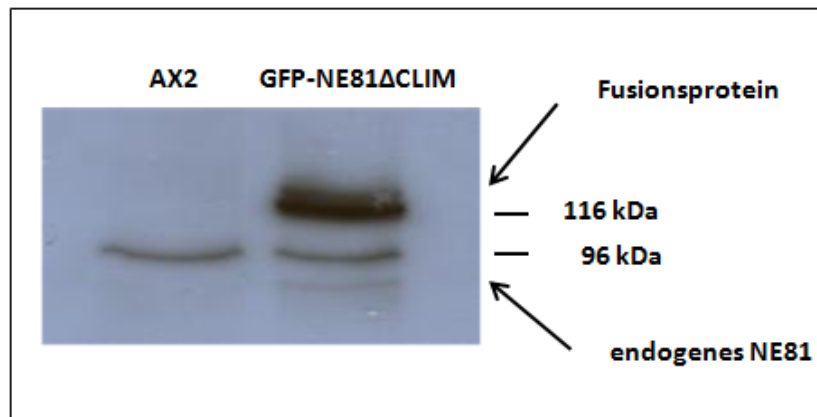


Abbildung 28: GFP-NE81 Δ CLIM wird 4,9 fach stärker exprimiert als das endogene NE81.

Die Abbildung des *Western Blots* eines AX2- und GFP-NE81 Δ CLIM Gesamtzellextraktes zeigt, dass eine 4,9 fache Überexpression des GFP-NE81 Δ CLIM gegenüber dem endogenen NE81 vorliegt. Der Nachweis der Proteinbanden erfolgte durch die Verwendung des anti NE81 als Primärantikörper und einem entsprechenden anti Kaninchen Antikörper, der mit einer Peroxidase gekoppelt war. Die Detektion der Proteinbanden erfolgte per ECL. Der Antikörper erkennt eine Bande bei ~ 98 kDa und bei ~ 120 kDa. Diese stimmen mit den kalkulierten Proteingrößen von 81 kDa und 124,5 kDa überein.

Um die Dynamik des GFP-NE81 Δ CLIM Proteins genauer zu studieren, wurde ein Stamm generiert, der zusätzlich zum GFP-NE81 Δ CLIM ein rot fluoreszierendes *cherry* Histon 2B Fusionsprotein exprimiert. Dies erleichterte das Erkennen der verschiedenen Mitosestadien in lebenden Zellen. Mit Hilfe dieser GFP-NE81 Δ CLIM/*cherry* Histon 2B-Zelllinie, konnte eine vollständige Mitose aufgenommen werden. Diese Aufnahmen zeigten, wie bereits bei den fixierten GFP-NE81 Δ CLIM Zellen beschrieben, dass die GFP-Cluster in Abhängigkeit vom Zellzyklus auf- und abgebaut werden, d.h. sie verschwinden mit Beginn der Prophase und bilden sich in der Telophase wieder neu. Außerdem wurde sichtbar, dass die Größe der Cluster im Laufe der Telophase zunahm und sie sich innerhalb der Kernhülle nicht bewegten. Sie schienen mit der Kernhülle verankert zu sein (**Abbildung 29**).

Ergebnisse

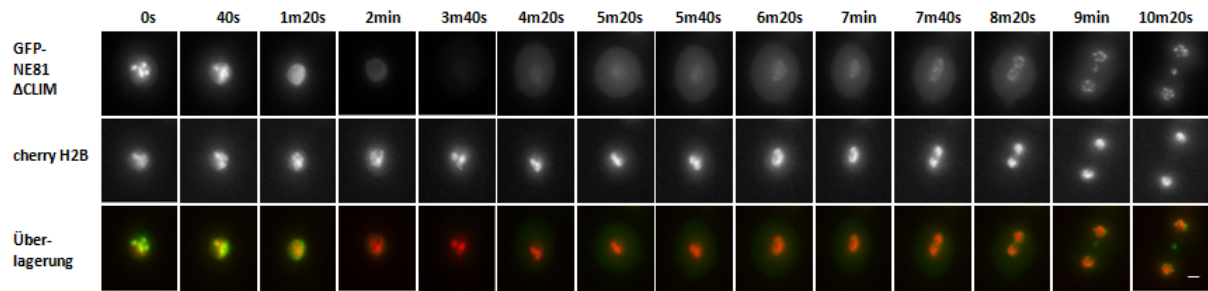


Abbildung 29: Die GFP-NE81 Δ CLIM Cluster lösen sich zu Beginn der Mitose auf und reichern sich in der Telophase im Bereich der zentralen Spindel und des Chromatins wieder an.

Abbildung einer Zeitreihe von Weitfeld Mikroskop Bildern einer mitotischen Zelle. Die obere Abbildung zeigt die Fluoreszenz des GFP-NE81 Δ CLIM Fusionsproteins, die mittlere Abbildung gibt die Fluoreszenz des *cherry* Histon 2B wieder. Die Überlagerung beider Fluoreszenzfarbstoffe ist in der unteren Abbildung dargestellt. Aufgrund räumlicher Beschränkungen sind nur bestimmte Zeitpunkte dargestellt. Die Zeitreihe startet 80 sec vor der Mitose (Zeitpunkt 0) und endet nach 10,20 min. Die Zeitpunkte sind über der Abbildung angegeben. Für jeden Zeitpunkt wurde ein z-Stapel mit je fünf Bildern in einem Intervall von 0,25 μ m aufgenommen. Dargestellt sind die "Maximum-Intensity"-Projektionen. Balken: 2 μ m

Um zu überprüfen, ob die GFP-NE81 Δ CLIM Proteinansammlungen eine geordnete Struktur ausbilden, wurden Kerne aus den GFP-NE81 Δ CLIM Zellen isoliert und in elektronenmikroskopischen Schnitten analysiert (Prof. Otto Baumann, Universität Potsdam).

Die Auswertung der Präparate zeigte in den GFP-NE81 Δ CLIM Zellen im Vergleich zu AX2-Wildtypzellen klar abgegrenzte Strukturen, die mit der inneren Kernhülle assoziiert waren. Diese schwammartigen, nur mäßig elektronendichten Strukturen unterschieden sich deutlich vom bekannten Erscheinungsbild von Proteinaggregaten aus fehlgefalteten oder denaturierten Proteinen, welche normalerweise eine hohe Elektronendichte zeigen (Kopito, 2000). Die schwammartigen Strukturen waren auch deutlich heller, als die Nukleoli in den betreffenden Zellkernen (**Abbildung 30**).

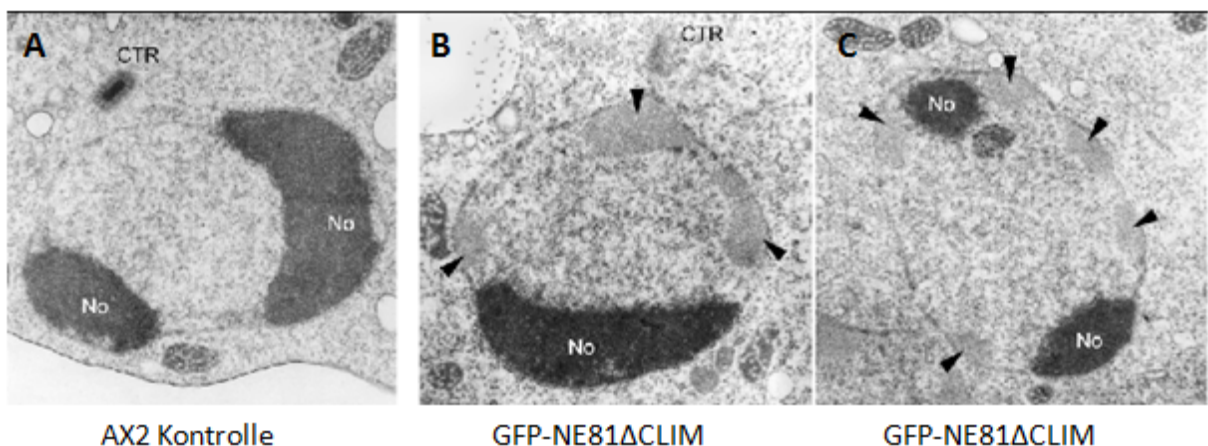


Abbildung 30: GFP-NE81 Δ CLIM bildet schwammartige Cluster mittlerer Elektronendichte innerhalb des Zellkerns aus.

Abbildung von Ultradünnschnitten durch den Zellkern von Kontrollzellen (A) und GFP-NE81 Δ CLIM Zellen (B, C). GFP-NE81 Δ CLIM Cluster sind durch Pfeile markiert. Abkürzungen: No: Nukleolus, CTR: Centrosom

Die Auswertung fixierter und lebender GFP-NE81 Δ CLIM-Zellen zeigte also, dass der Auf- und Abbau der GFP-Ansammlungen im Inneren des Zellkerns in Abhängigkeit vom

Ergebnisse

Zellzyklus und möglicherweise in Abhängigkeit von einem oder mehreren mitotischen Signalen erfolgte. Weiterhin wurde deutlich, dass die prognostizierte Kernlokalisationssequenz im NE81 funktional ist, da sich GFP-NE81 Δ CLIM eindeutig im Inneren des Zellkerns anreicherte.

3.1.5.2 Lokalisation des endogenen Sun1 in GFP-NE81 Δ CLIM exprimierenden Zellen

Ein bekannter Interaktor von Laminen in Säugetieren ist das Kernhüllenprotein Sun1 (Haque *et al.*, 2010). Auch in *Dictyostelium* wurde ein Sun1 Protein identifiziert und charakterisiert. Um zu überprüfen, ob die Lokalisation von Sun1 durch die Expression des deletierten Δ CLIM-Proteins beeinflusst wird, wurden die GFP-NE81 Δ CLIM Zellen fixiert und das Sun1 Protein mit Hilfe eines polyklonalen Antikörpers nachgewiesen. Die fluoreszenzmikroskopische Auswertung der Zellen zeigte, dass der Antikörper das endogene Sun1 in der Kernhülle ähnlich wie in Kontrollzellen anfärbte (Schulz *et al.*, 2009). Eine Markierung des Proteins in den GFP- Δ CLIM Anreicherungen konnte nicht nachgewiesen werden (**Abbildung 31**). Die Lokalisation des Sun1 wurde somit durch die Expression des CLIM Box deletierten NE81 nicht beeinflusst.

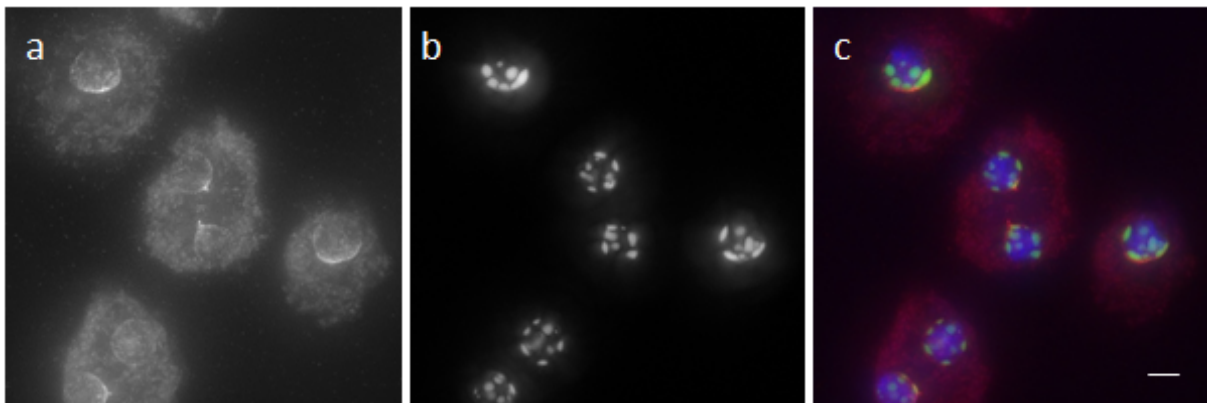


Abbildung 31: Sun1 lässt sich in den GFP-NE81 Δ CLIM Ansammlungen nicht nachweisen.

Immunfluoreszenzmikroskopie von GFP-NE81 Δ CLIM Zellen mit Glutaraldehyd fixiert und mit anti-Sun1/anti-Kaninchen AlexaFluor 568 und DAPI markiert. In grau die Darstellung des Sun1 Antikörpers (Abbildung a), Abbildung (b) das GFP-Fusionsprotein. Die Überlagerung (c) zeigt anti-Sun1 in rot, GFP in grün und die DNA-Markierung in blau. Balken: 2µm

3.1.5.3 GFP-NE81 Δ CLIM ist während der Interphase im Zellkern nicht mobil

FRAP-Analysen am GFP-NE81 Volllängenprotein zeigten, dass dieses keine Mobilität in der Kernhülle von Interphasezellen besitzt. Um zu überprüfen inwieweit die veränderte Lokalisation des Proteins durch die fehlende CaaX-Box einen Einfluss auf das Mobilitätsverhalten innerhalb der Kernhülle besitzt, wurden FRAP-Untersuchungen mit den GFP-NE81 Δ CLIM Zellen durchgeführt.

Nach dem Ausbleichen der Fluoreszenz in einer definierten Kernregion, wurde keine signifikante Regeneration des Fluoreszenzsignals registriert (**Abbildung 32**). Dieses Resultat macht deutlich, dass GFP-NE81 Δ CLIM ähnlich wie das GFP-NE81 Volllängenprotein keine

Ergebnisse

Mobilität innerhalb der Kernhülle bzw. den Proteinclustern besitzt, da kein Austausch von GFP-Proteinen zwischen der geblichenen Zone und dem Nukleoplasma, der Kernhülle oder dem Cytoplasma erfolgte. Gleichzeitig deutet dies auf eine strukturgebende Funktion von NE81 innerhalb der Kernhülle hin. Die fehlende CaaX-Box, verbunden mit der Fehllokalisierung des Proteins hat also keinen Einfluss auf die Mobilität innerhalb der Kernhülle.

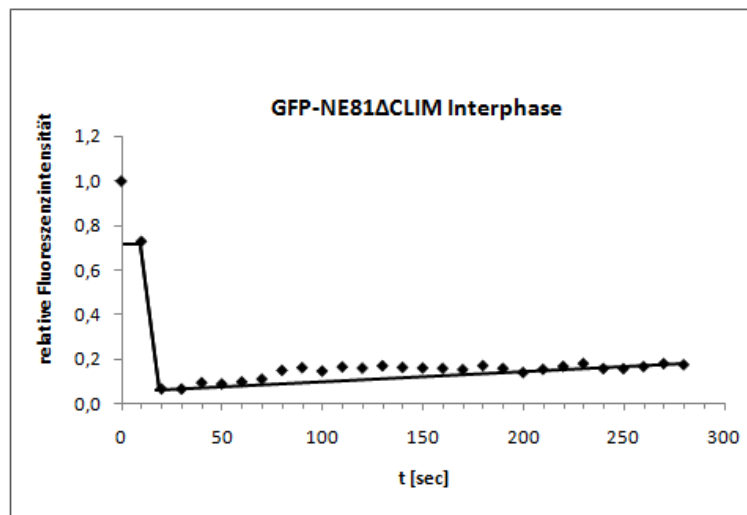


Abbildung 32: GFP-NE81ΔCLIM zeigt keine deutliche Mobilität innerhalb der Kernhülle während der Interphase. Abbildung der korrigierten FRAP-Kurve eines repräsentativen Experimentes (n=8), aufgenommen an einem konfokalem Laserscanning Mikroskop. Die Aufnahmezeit betrug sechs z-Stapel pro Minute (Bildanzahl: fünf Bilder/s). Die x-Achse gibt den zeitlichen Verlauf wieder, die y-Achse stellt die relative Fluoreszenz dar.

3.1.5.4 GFP-NE81ΔCLIM Zellen zeigen ein verändertes Wachstumsverhalten verbunden mit einer erhöhten Mechanosensibilität

Es bestand die Vermutung, dass die veränderte Lokalisation der CaaX-Box deletierten Proteinvariante GFP-NE81ΔCLIM, einen Einfluss auf die Organisation der Proteine in der Kernhülle von *Dictyostelium* ausüben könnte, z.B. durch eine Rekrutierung des endogenen NE81 oder mutmaßlicher NE81-Interaktoren in die GFP-Proteincluster. Dies könnte in einer veränderten Zusammensetzung der potentiell vorhandenen nukleären Lamina, die sich in *Dictyostelium* auch in Form eines Netzwerks ausbilden könnte, mit einem möglichen Funktionsverlust resultieren. Da Lamina eine wichtige Funktion bei der Stabilität der Kernhülle übernehmen, wurden zwei Versuche durchgeführt, mit denen die Robustheit der Zellen gegen mechanischen Stress untersucht werden konnte.

Dictyostelium Zellen können adhärent, oder in Schüttelkultur bei 150 rpm/min kultiviert werden. Das permanente Bewegen der Zellen bedingt einen erhöhten mechanischen Stress, der aber für AX2-Wildtypzellen kein Problem darstellt. Um zu überprüfen, ob dies auch für die GFP-NE81ΔCLIM Zellen galt, wurde das Wachstumsverhalten der Zellen in Schüttelkultur untersucht. Dafür wurden jeweils drei Erlenmeyerkolben mit einer definierten

Ergebnisse

Zellmenge (AX2, GFP-NE81 Δ CLIM) angeimpft und für die Dauer des Versuchs auf einem Schüttler in Bewegung gehalten. Zu definierten Zeiten wurde eine Zählung der Zellen durchgeführt (**Abbildung 33**).

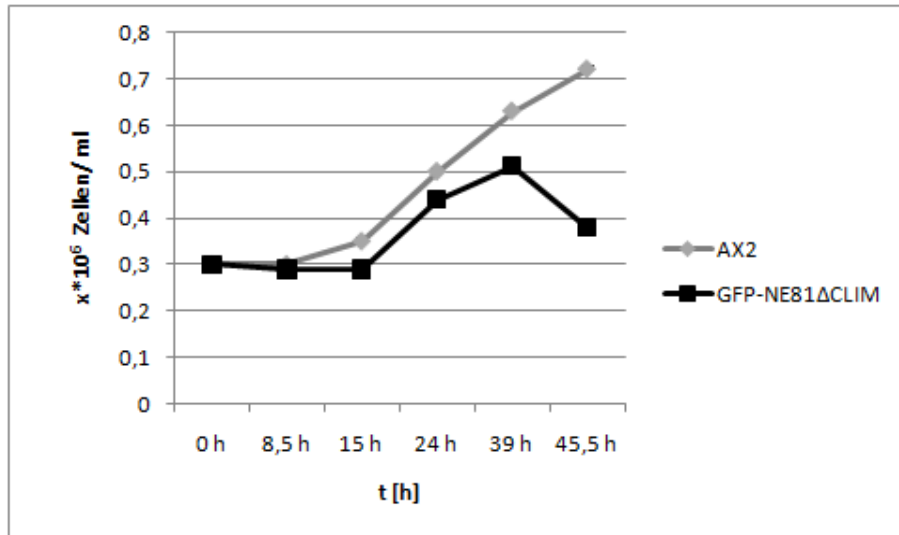


Abbildung 33: GFP-NE81 Δ CLIM Zellen zeigen ein verändertes Wachstumsverhalten in Schüttelkultur. Die x-Achse gibt die Zeitpunkte der Zellzählung wieder, die y-Achse stellt die Anzahl der gezählten Zellen dar

Die Auszählung der Zellen zeigte, dass die Expression der deletierten NE81 Variante einen Einfluss auf das Wachstumsverhalten der Mutanten ausübte. Während die AX2-Wildtypzellen eine stetige Zunahme der Zellzahl von $0,3 \times 10^6$ Zellen/ml auf $0,7 \times 10^6$ Zellen/ml zeigten, war diese bei den Δ CLIM Zellen deutlich geringer. Nach 39 h stagnierte das Wachstum der Zellen und die Zellzahl fiel von $0,5 \times 10^6$ Zellen/ml auf $\sim 0,4 \times 10^6$ Zellen/ml ab. Zusätzlich konnte beobachtet werden, dass mit zunehmender Dauer des Versuchs eine vermehrte Klumpenbildung der GFP-NE81 Δ CLIM Zellen auftrat, die das Auszählen der Zellen deutlich erschwerte. In adhärenter Kultur zeigten die Zellen ein normales Wachstumsverhalten.

Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass die Expression von GFP-NE81 Δ CLIM zu einer geringeren mechanischen Belastbarkeit der Zellen, ausgelöst durch permanentes Schütteln der Zellen, führte. Die Klumpenbildung in der Schüttelkultur der Zellen, die in adhärenter Kultur nicht auftrat, schien der Stabilisierung der Zellen zu dienen.

Die offensichtlich erhöhte Stressanfälligkeit der Zellen wurde mit einem zweiten Experiment genauer untersucht. Dafür wurden adhärent kultivierte Zellen AX2- und GFP-NE81 Δ CLIM Zellen einer bestimmten Zellzahl, in einem definiertem Volumen mit Hilfe einer Injektionspumpe und unterschiedlichen Geschwindigkeiten durch einen Polycarbonatfilter mit einer Porengröße von genau $12 \mu\text{m}$ gepresst. Der Filter und die Injektionspumpe dienten bei diesem Versuch zur Erzeugung unterschiedlich großer und definierter mechanischer Scherkräfte. Um sicher zu stellen, dass die Zellgröße der beiden unterschiedlichen

Ergebnisse

Dictyostelium Stämme keinen Einfluss auf das Versuchsergebnis hatte, wurde der Durchmesser der Zellen mit dem Längenmessungstool der Axiovision Software 4.8 bestimmt. Die Zellen zeigten dabei keine auffälligen Unterschiede (AX2: $7,33 \pm 1,43 \mu\text{m}$; GFP-NE81 Δ CLIM: $6,61 \pm 1,3 \mu\text{m}$; $n=79$).

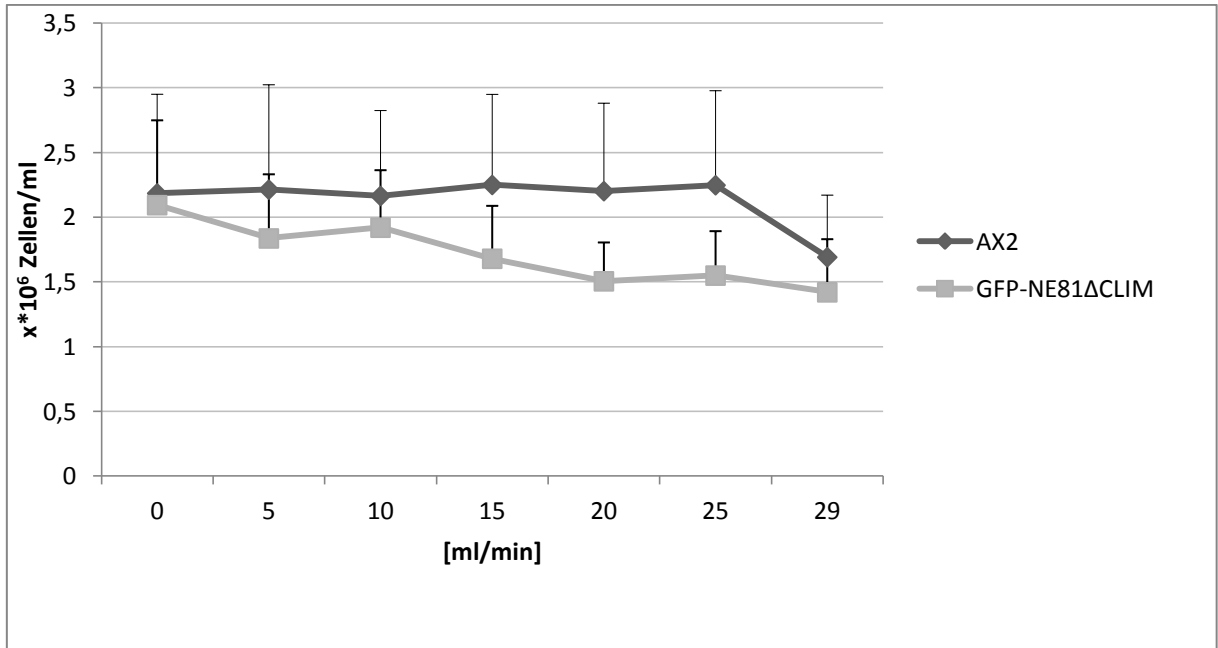


Abbildung 34: GFP-NE81 Δ CLIM Zellen zeigen eine erhöhte Mechanosensitivität.

AX2-Kontrollzellen und GFP-NE81 Δ CLIM Zellen passierten mit unterschiedlichen Fließgeschwindigkeiten einen Polycarbonatfilter mit einer Porengröße von $12 \mu\text{m}$. Die Flussrate ist auf der x-Achse dargestellt. Die ausgezählten, überlebenden Zellen sind auf der y-Achse dargestellt. $n=9$

Bereits ab einer mechanischen Beanspruchung von 15 ml/min, kam es bei den GFP-NE81 Δ CLIM Zellen zu einem deutlichen Abfall der Zellzahl. Dieser lässt sich durch eine Lyse der Zellen aufgrund zu starker mechanischer Belastung erklären. Dieser Trend setzte sich bis zu einer Kräfteinwirkung von 29 ml/min fort. Im Vergleich zu AX2-Kontrollzellen die erst ab 29 ml/min einen Abfall der gezählten Zellen aufwiesen, zeigten die generierten GFP-NE81 Δ CLIM Zellen somit deutlich eine verringerte mechanische Belastbarkeit (**Abbildung 34**).

Die Feststellung, dass GFP-NE81 Δ CLIM Zellen eine verminderte Mechanosensibilität aufweisen, deckt sich mit der Hypothese, dass das NE81 ähnlich der Lamine bei Metazoen, eine Funktion bei der Stabilisierung des Zellkerns übernimmt, dessen Destabilisierung bei höheren Zellen nachweislich die gesamte mechanische Belastbarkeit negativ beeinflusst (Lammerding *et al.*, 2004; Broers *et al.*, 2004).

3.1.5.5 GFP-NE81 Δ CLIM Zellen zeigen keine Besonderheiten bei der Analyse von Zellkernen und Centrosomen

Die Untersuchung des Einflusses der Deletion der CaaX-Box auf das Verhältnis von Centrosom und Zellkernen in den *Dictyostelium* Zellen, erfolgte wie bereits zuvor genauer beschrieben, durch das Auszählen der Centrosomen und Zellkernen in fixierten Präparaten. Es zeigte sich dabei, dass sich die AX2- und die GFP-NE81 Δ CLIM Zellen ähnlich verhielten (**Abbildung 35**). Die numerische Übereinstimmung von Zellkernen und Centrosomen war in 98 % der Wildtyp- und in 99 % der generierten GFP-NE81 Δ CLIM Zellen vorhanden. Demzufolge war auch die Anzahl überzähliger bzw. unterzähliger Centrosomen in beiden Zelllinien ähnlich hoch (überzählige Centrosomen: AX2: 2 %, GFP-NE81 Δ CLIM: 1 %; unterzählige Centrosomen: AX2/GFP-NE81 Δ CLIM: 0 %).

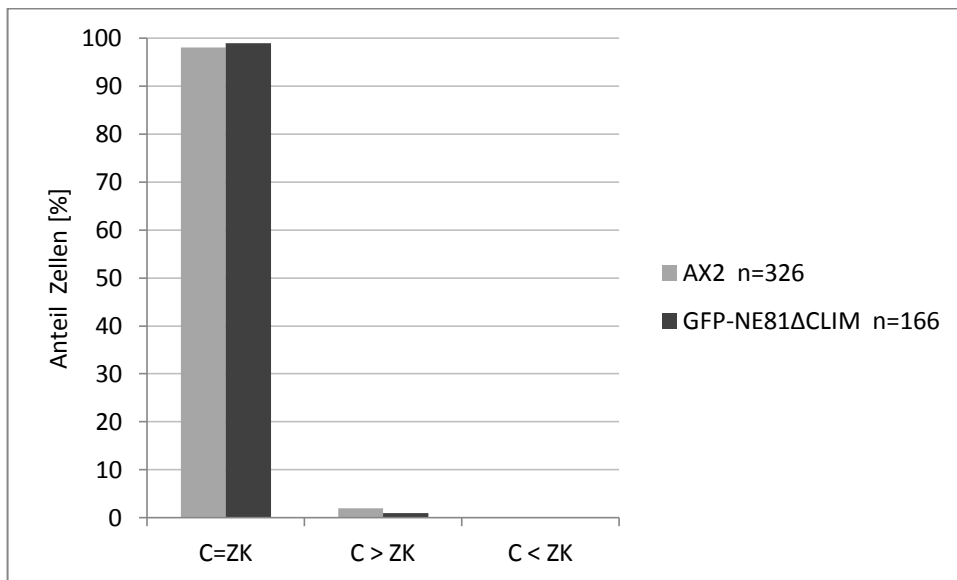


Abbildung 35: GFP-NE81 Δ CLIM Zellen zeigen keine deutlichen Unterschiede bei der Analyse von Kern- und Centrosomenanzahl.

Angabe des prozentualen Anteils von Zellen mit gleicher Anzahl von Centrosomen und Zellkernen (C = ZK), überzähligen Centrosomen (C > ZK), fehlenden Centrosomen (C < ZK).

3.1.5.6 Der Phänotyp einer zweiten Δ CLIM-Proteinvariante (GFP-NE81 Δ C) bestätigt die Relevanz der CaaX-Box in NE81

Die Generierung von GFP-NE81 Δ CLIM bestätigte, dass die CaaX-Box einen wichtigen Einfluss auf die Lokalisation des Proteins besitzt. Um zu überprüfen, ob im C-terminalen Bereich weitere Sequenzen vorhanden sind, die neben der CaaX-Box einen Einfluss auf die Lokalisation und das Verhalten des NE81 besitzen, wurde eine weitere NE81 Variante kloniert und in *Dictyostelium* exprimiert, die eine Deletion der letzten 204 Aminosäuren zeigte (GFP-NE81 Δ C) und fast unmittelbar hinter der Kernlokalisationssequenz endete (**Abbildung 36**).

Ergebnisse

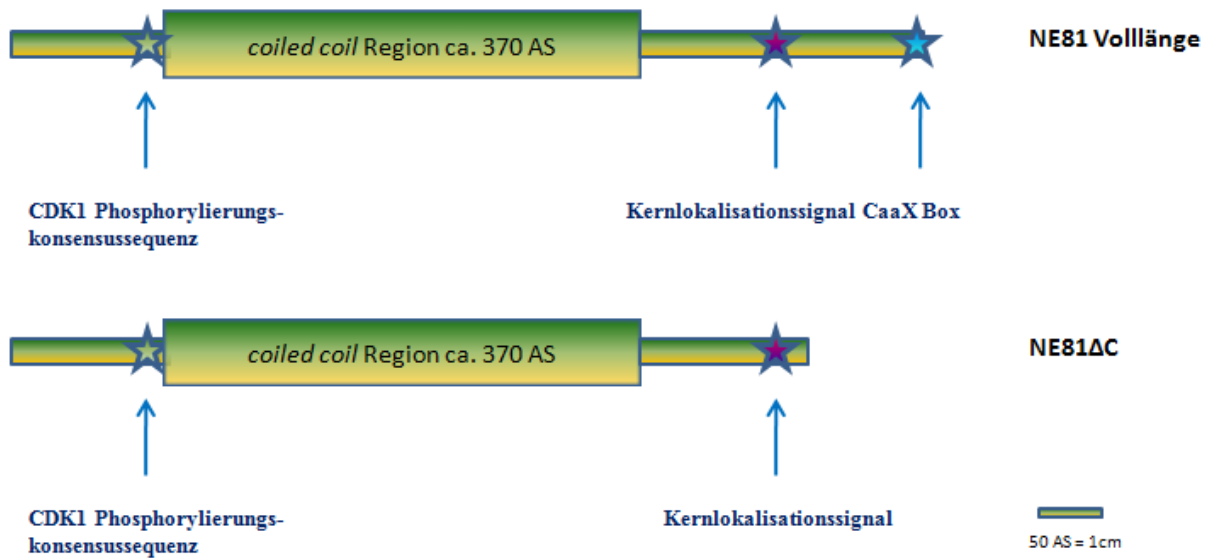


Abbildung 36: Darstellung der modifizierten NE81ΔC-Variante.

Die Abbildung gibt einen Überblick über das endogene NE81 mit seinen funktionalen Elementen im Vergleich zur generierten NE81Δ-Variante. Die letzten 204 Aminosäuren wurden bei dieser Proteinmodifikation deletiert. Somit konnte das Protein nicht mehr isoprenyliert werden. Das GFP ist in dieser Darstellung nicht abgebildet.

Um zu überprüfen, ob auch in dieser Proteinvariante eine Veränderung der Lokalisation auftrat, wurden die Zellen mittels Fluoreszenzmikroskopie untersucht (**Abbildung 37**).

Ergebnisse

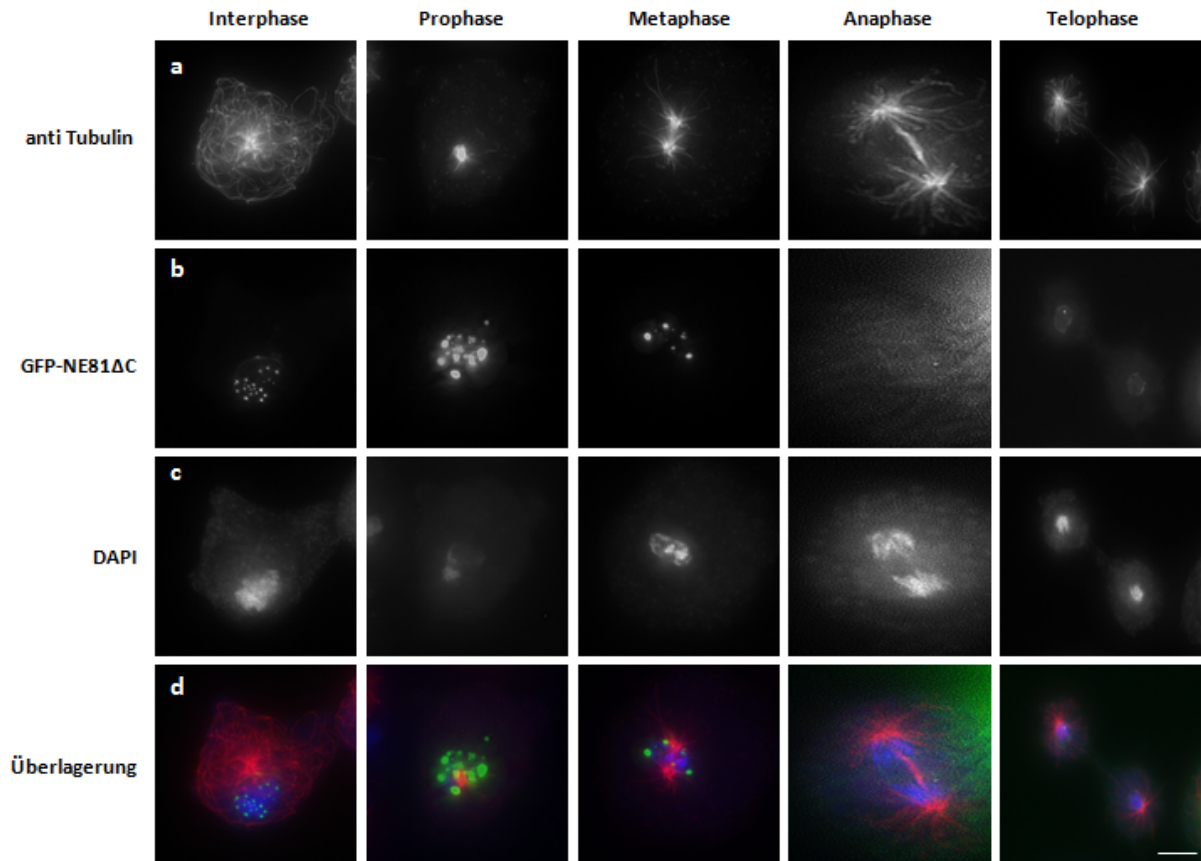


Abbildung 37: GFP-NE81ΔC bildet Cluster innerhalb des Zellkerns.

Immunfluoreszenzmikroskopie von GFP-NE81ΔC mit Glutaraldehyd fixiert und mit anti Tubulin/anti Ratte AlexaFluor 568 markiert. Die grauen Abbildungen (a-c) zeigen die einzelne Darstellung des verwendeten Antikörpers, das GFP-Fusionsprotein und die DNA-Markierung durch DAPI. Die Überlagerung (d) zeigt anti Tubulin in rot, GFP-NE81ΔC in grün, DAPI in blau. Balken: 2 µm

In Interphasezellen reicherte sich das GFP-NE81ΔC Protein, ähnlich wie das GFP-NE81ΔCLIM Fusionsprotein, in Form von GFP-Clustern im Inneren des Zellkerns an. Die Größe und Anzahl der Proteinansammlungen variierte aber im Gegensatz zu den GFP-NE81ΔCLIM Zellen in den einzelnen Zellen deutlich. Teilweise zeigten sich sehr kleine, zahlreiche GFP-Ansammlungen (**Abbildung 37**, Interphase) im Vergleich zu größeren, weniger häufig vorkommenden Proteinanreicherungen (**Abbildung 37**, Metaphase).

Ein Teil des Fusionsproteins war ähnlich dem endogenen Protein, auch im Bereich der Kernhülle lokalisiert. Die Kernhüllenlokalisierung schien in Zellen ausgeprägter zu sein, bei denen die GFP-Expression weniger stark war.

In mitotischen GFP-NE81ΔC Zellen zeigte sich, dass die Proteincluster im Gegensatz zu den GFP-NE81ΔCLIM Zellen zum größten Teil erhalten blieben. Nur ein kleiner Teil des GFP-Fusionsproteins verschwand mit dem Beginn der Prophase, was mit einer schwachen Zunahme der Hintergrundfluoreszenz im Cytosol einherging.

Die zusätzlich zur CLIM-Box deletierten Aminosäuren schienen somit einen Einfluss auf das Verhalten des GFP-Fusionsproteins im Zellzyklus zu haben.

3.1.6 Analyse der Prozessierung des endogenen NE81

3.1.6.1 Anwendung des Farnesyltransferaseinhibitors 277 auf AX2-Zellen

Für die korrekte Prozessierung eines Lamins sind, wie in der Einleitung beschrieben, verschiedene, streng nacheinander ablaufende Vorgänge nötig, bestehend aus der Farnesylierung durch eine Farnesyltransferase, der Abspaltung der drei randständigen Aminosäuren –aaX durch die Prenylprotease Zmpste24 und die Methylierung des C-terminalen Cysteins durch eine Isoprenylcysteincarboxylmethyltransferase (ICMT). Zusätzlich erfolgt bei der Reifung des Lamin A eine Abspaltung der letzten 15 Aminosäuren vom C-terminalen Ende des Proteins (Coffinier *et al.*, 2007).

Die Suche nach CaaX-Box prozessierenden Enzymen im *Dictyostelium* Genom mittels *BlastP* ergab, dass dieses verschiedene Farnesyltransferasen bzw. deren Untereinheiten enthält. Dazu zählen die fntA (Protein Farnesyltransferase /Geranylgeranyltransferase Typ I α -Untereinheit; *DDB_G0283053*), die fntB (Protein Farnesyltransferase β -Untereinheit, *DDB_G0270948*) und die fdfT (Farnesyl-Diphosphat Farnesyltransferase, *DDB_G0292072*).

Um zu testen, ob die Hemmung der Farnesyltransferase einen Einfluss auf die Prozessierung des NE81 besitzt und somit eine mögliche Ähnlichkeit zu den Laminen unterstützt, wurde mit dem Farnesyltransferaseinhibitor FTI-277 gearbeitet. Dieser sollte das Anbringen eines hydrophoben Isoprenylrestes unterbinden und somit in die posttranslationale Modifikation der CaaX-Box vom NE81 eingreifen. Der Farnesyltransferaseinhibitor 277 (FTI-277) wurde in verschiedenen Konzentrationen für eine unterschiedliche lange Zeitdauer mit den adhären kultivierten AX2-Zellen inkubiert. Zur Überprüfung des Verhaltens des endogenen NE81 in der Kernhülle, erfolgte die Fixierung der Zellen mit Glutaraldehyd, die Markierung des Proteins mit anti NE81 und die mikroskopische Auswertung. Die erwartete fehlerhafte Lokalisation des NE81 blieb aus. Das NE81 zeigte eine ähnliche Lokalisation in der Interphase und in der Mitose im Vergleich zu unbehandelten AX2-Zellen. Die Anwendung des FTI-277 hatte somit keinen erkennbaren Einfluss auf das Verhalten des endogenen NE81 in der Kernhülle von AX2-Zellen (**Abbildung 51** siehe CD).

3.1.6.2 Erforschung des Einflusses verschiedener HIV-Proteaseinhibitoren auf das Verhalten des NE81

Eine weiterführende Analyse der Prozessierung des NE81 in *Dictyostelium* fand durch den Versuch der Inhibition der Zink-Metalloproteinase Zmpste24 statt. Dieses Enzym vollführt, wie zuvor schon ausführlicher beschrieben, bei der posttranslationalen Modifikation von Laminen im Bereich der CaaX-Box die Abspaltung der randständigen Aminosäuren vom C-

Terminus des Proteins. Um einen Eindruck zu bekommen, ob dieses Enzym auch in *Dictyostelium* eine Rolle übernimmt, kamen verschiedenen Zmpste24- Inhibitoren zum Einsatz (Lopinavir, Ritonavir, Tipranavir). Diese finden normalerweise in der AIDS-Therapie, durch die Inhibition der HIV Aspartyl-Protease, ihre Anwendung. Das Auftreten von Lipiddystrophien im Rahmen der Aids-Therapie, die auch bei Progerieerkrankungen auftreten, führte zu der Entdeckung, dass die Prozessierung des Lamin A durch den Einsatz dieser Substanzen gehemmt wird und in einer Anreicherung von farnesyliertem Lamin A resultiert (Hudon *et al.*, 2008; Parnaik und Manju, 2006).

Die drei Zmpste24-Inhibitoren wurden in verschiedenen Konzentrationen für eine unterschiedliche Zeitspanne mit den adhären kultivierten AX2-Zellen inkubiert. Die anschließende Auswertung erfolgte an fixierten und NE81 markierten Zellen per Immunfluoreszenzmikroskopie. Die fixierten Zellen zeigten in Abhängigkeit von der Konzentration der verwendeten HIV-Proteaseinhibitoren ein unterschiedlich starkes Wachstum. Dabei war zu beobachten, dass die Inhibitoren in der höchsten Konzentration das Zellwachstum am meisten beeinträchtigten. Es fanden sich hauptsächlich Zelltrümmer auf den zur Kultivierung und Fixierung verwendeten Deckgläschen. Bei der Anwendung der drei Inhibitoren in geringeren Konzentrationen erfolgte zwar ein Wachstum der Zellen, aber eine erkennbare Beeinträchtigung der Lokalisation und des Verhaltens des endogenen NE81 in mitotischen und Interphasezellen konnte bei keiner verwendeten Substanz beobachtet werden (**Abbildung 52** siehe CD).

3.1.6.3 Untersuchung des ICMT-Einflusses auf die Prozessierung des NE81

Wie bereits erwähnt, sind an der Prozessierung von Laminen im Bereich der C-terminalen CaaX-Box mehrere Enzyme beteiligt, unter anderem die Isoprenylcysteinylmethyltransferase (ICMT), die für die Methylierung des Farnesylcysteins zuständig ist. Bei Abwesenheit der ICMT kann in CaaX-Box exprimierenden Proteinen keine Methylierung des C-terminalen Cysteins stattfinden. Dies resultiert in einer Fehllokalisierung des Proteins, wie zum Beispiel bei Ras GTP-asen festgestellt werden konnte (Michaelson *et al.*, 2005).

Um den potentiellen Einfluss der ICMT auf die posttranslationale Modifikation des NE81 zu erforschen, wurden AX4 *Dictyostelium* Zellen verwendet, in denen die Isoprenylcysteinylmethyltransferase durch homologe Rekombination ausgeschaltet war (Zellen freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr.E.C.Cox, Universität Princeton) (Chen *et al.*, 2007). Diese wurden mit dem NE81 Antikörper markiert und mikroskopisch analysiert (**Abbildung 38**).

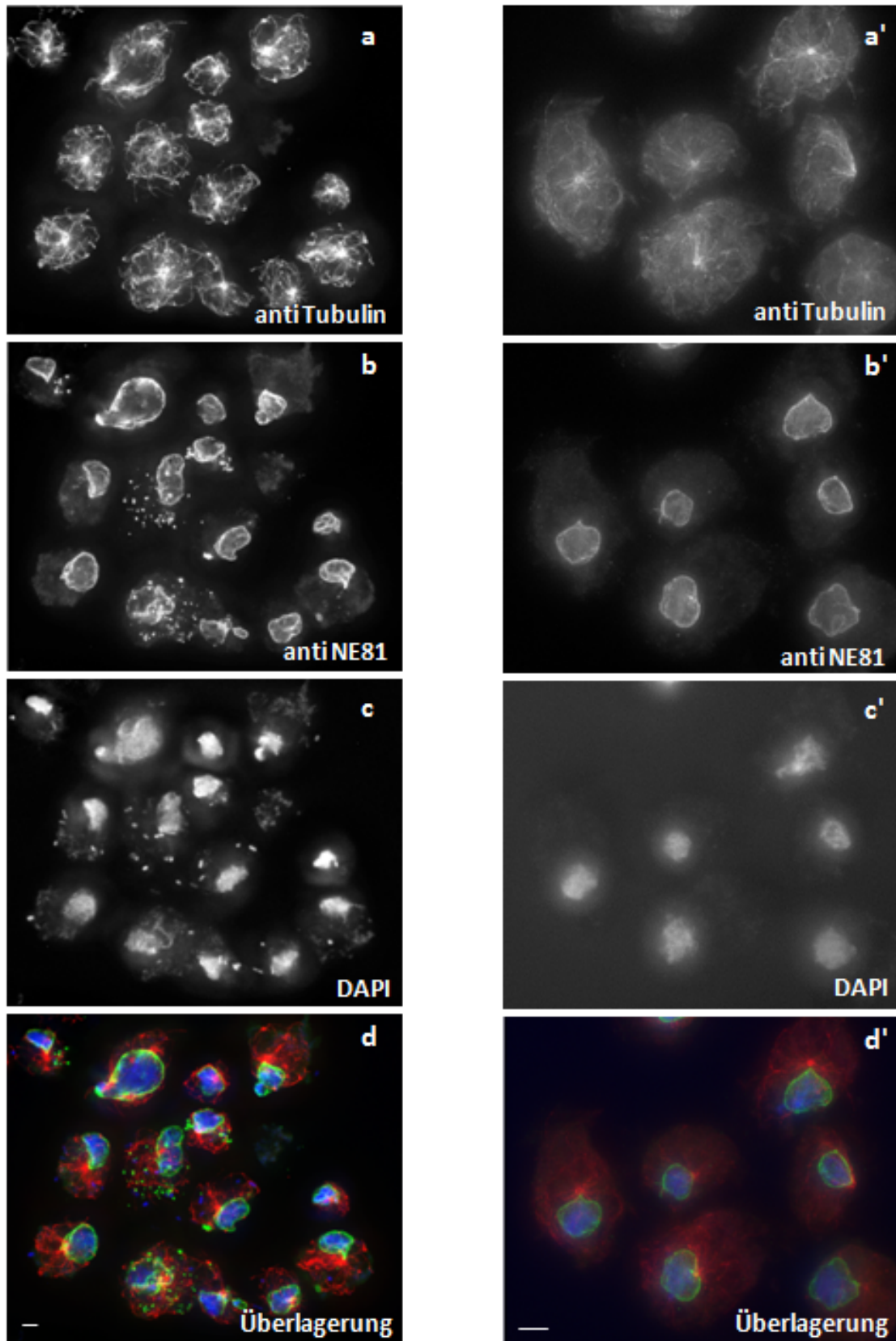


Abbildung 38: ICMT-Nullmutanten zeigen eine veränderte Verteilung des NE81.

Immunfluoreszenzmikroskopie von ICMT-Nullmutanten (linke Seite) im Vergleich zu AX2 Kontrollzellen (rechte Seite) in der Interphase. Die Zellen wurden mit Glutaraldehyd fixiert und mit anti Tubulin/anti Ratte AlexaFluor 568 markiert (a, a'), anti NE81/anti Kaninchen AlexaFluor 488 (b, b'), DNA markiert mit DAPI (c, c'). Die Überlagerung (d, d') zeigt anti Tubulin in rot, anti NE81 in grün, DAPI in blau. Balken: 2µm

Die Lokalisation des endogenen NE81 war in den ICMT-Mutanten deutlich verändert. Es war zwar weiterhin im Bereich der Kernhülle erkennbar, dennoch war die Verteilung weniger homogen als in Wildtypzellen. Weiterhin hielt sich NE81 nicht wie üblich nur im Bereich der Kernhülle auf, sondern befand sich zudem in aggregierter Form im Cytoplasma. Diese cytosolische Verteilung des NE81 war bei den ICMT-Mutanten allerdings unterschiedlich stark ausgeprägt. Außerdem unterschied sich die Kernmorphologie im Vergleich zu Wildtypzellen. Die Kerne waren unterschiedlich groß und die Verteilung des Chromatins innerhalb der Kerne ungleichmäßig.

Aus diesen Resultaten wird ersichtlich, dass die ICMT an der Prozessierung des NE81 beteiligt ist, da die mutmaßlich fehlende Methylierung des Farnesylcysteins einen Einfluss auf die Lokalisation des NE81 besitzt. Die Laminprozessierungsmaschinerie scheint somit an der posttranslationalen Modifikation des NE81 beteiligt zu sein.

3.1.7 Untersuchung einer potentiellen CDK1

Phosphorylierungskonsensussequenz in NE81

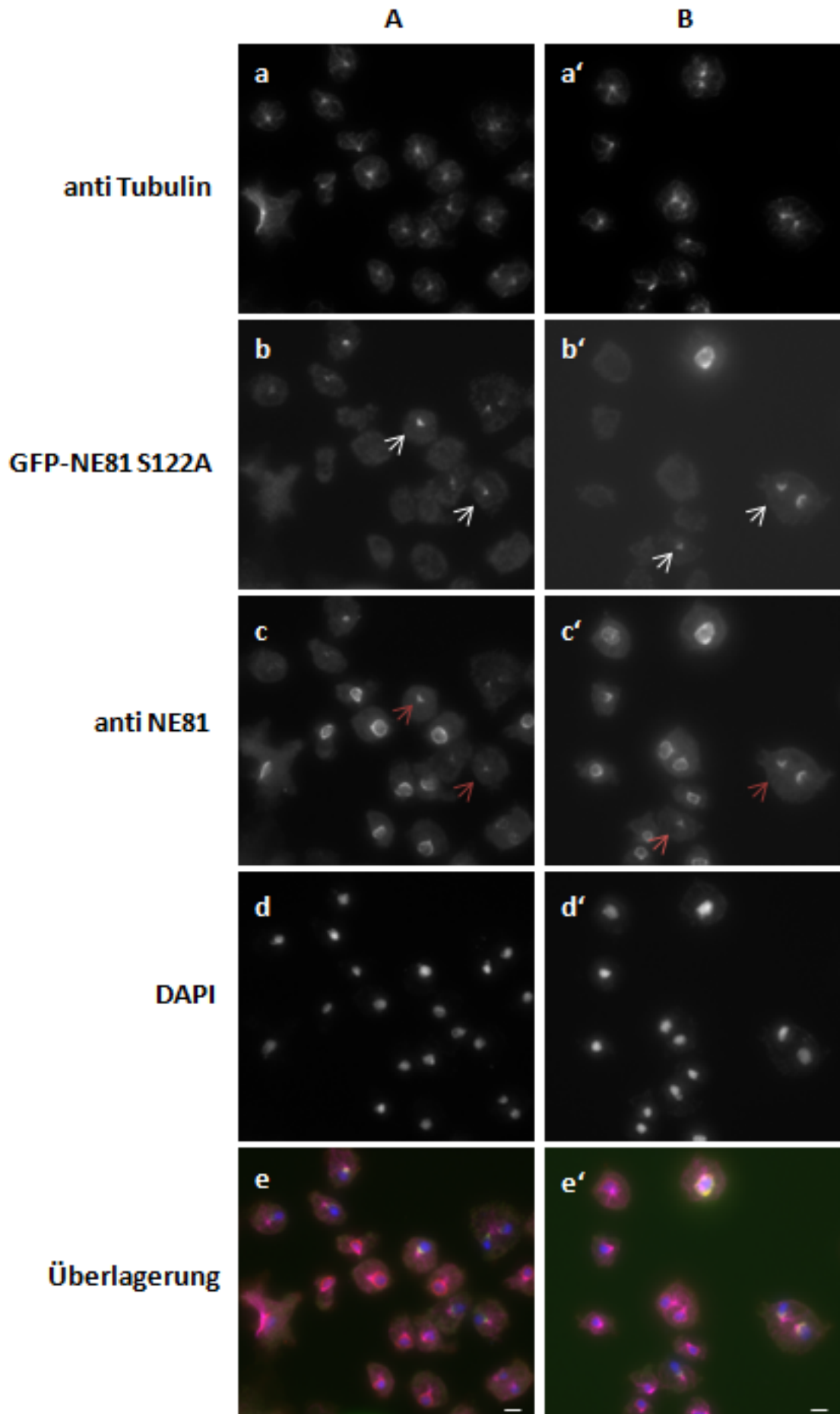
Nukleäre Intermediärfilamente spielen eine essentielle Rolle beim Abbau der Kernhülle innerhalb der Mitose. Dabei wird die Dissassemblierung dieser Proteine unter anderem durch die Phosphorylierung durch die CDK1 reguliert. Lamine besitzen verschiedene Konsensussequenzen für die Phosphorylierung durch CDK1. Die Hauptphosphorylierungsstelle befindet sich vor dem Beginn der α -helikalen „Rod“-Domäne (Nigg, 1992; Peter *et al.*, 1991; Heald und McKeon, 1990; Nigg, 1992).

Die verminderte Konzentration des GFP-NE81 in der Konstriktionszone der Kernhülle in der Mitose und die unterschiedliche Mobilität der CaaX-Mutante in der Interphase und Mitose gab deutliche Hinweise, dass auch NE81 einer Regulation durch eine mitotische Kinase unterliegen könnte. Da in der Primärsequenz des NE81 eine potentielle CDK1 Phosphorylierungskonsensussequenz im Bereich 122 - 125 vorausgesagt wurde (SPNR), wurde der Einfluss dieser auf das Verhalten und die Mobilität des NE81 genauer untersucht. Dies erfolgte, indem mit Hilfe mehrfacher PCR-Reaktionen eine Punktmutation in das CDK1-Motiv gesetzt wurde. Da die CDK1 seine Substrate neben Threonin und Tyrosin auch an Serin phosphoryliert, wurde das Serin gegen Alanin ausgetauscht. Die so gesetzte Punktmutation sollte den unphosphorylierten Zustand des Proteins imitieren. Das klonierte GFP-NE81 Volllängenproteinkonstrukt GFP-NE81 S122A wurde nach der Transformation in AX2 *Dictyostelium* Zellen fixiert, antikörpermarkiert und anschließend untersucht. Es zeigte sich, dass einige Zellen ein grünes GFP-Signal aufwiesen. Dieses war im Bereich der

Ergebnisse

Kernhülle sichtbar, mit einer Konzentrierung des GFP-NE81 S122A im pericentrosomalen Bereich (**Abbildung 39**).

Ergebnisse



Ergebnisse

Abbildung 39: GFP-NE81 S122A lokalisiert im pericentrosomalen Bereich.

Immunfluoreszenzmikroskopie von GFP-NE81 S122A Zellen mit Glutaraldehyd fixiert und mit anti Tubulin/anti Ratte Cy5, anti NE81/AlexaFluor 568 markiert. Die Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt. Abbildung A und B zeigen Interphasezellen der gleichen *Dictyostelium* Mutante. Die grauen Abbildungen zeigen anti Tubulin (a, a'), GFP-NE81 S122A (b, b'), anti NE81 (c, c') und DAPI (d, d'). Die Überlagerung (e, e') zeigt anti Tubulin in violett, GFP-NE81 S122A in grün, anti NE81 in rot und DAPI in blau. Die weißen Pfeile zeigen ein deutliches Signal des GFP-NE81 S122A im pericentrosomalen Bereich. Die roten Pfeile zeigen die veränderte Lokalisation des endogenen NE81. Balken: 2 μ m

Diese Anreicherung wurde deutlich, da ein Antikörper verwendet wurde, der neben den Mikrotubuli auch das Centrosom markierte und somit sichtbar machte. Das GFP-Signal unterschied sich deutlich von der Verteilung des endogenen NE81 in Wildtypzellen (**Abbildung 13**). Diese Verteilung erinnerte an die von Sun1, einem Protein der Centrosom-Zellkernverbindung. Einige Zellen zeigten auch eine komplette Markierung der Kernhülle, wobei dieser Phänotyp in der Unterzahl auftrat. Mit der Verwendung des anti NE81 Antikörper wurden neben dem GFP-NE81 S122A auch das endogene Protein markiert. Dabei zeigte sich eine pericentrosomale Lokalisation des Proteins, aber auch eine sehr schwache Markierung des Proteins im restlichen Bereich der Kernhülle.

Die erfolgreiche Transformation wurde neben der mikroskopischen Auswertung auch durch eine Sequenzierung der genomischen DNA verifiziert. Dazu wurde genomische DNA aus den *Dictyostelium* Zellen präpariert und mit Hilfe der PCR ein Bereich des NE81 Gens amplifiziert, der die mutmaßlich inserierte Punktmutation enthielt (**Abbildung 40**). Die Sequenzierung wurde die Firma GATC Biotech AG, Konstanz vorgenommen.

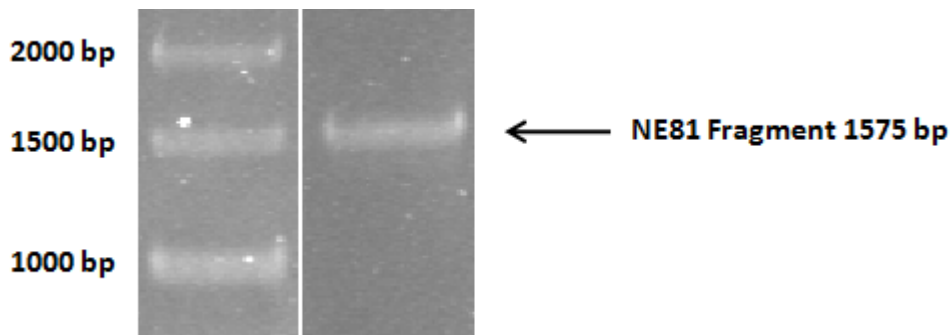


Abbildung 40: Abbildung des amplifizierten NE81 Fragmentes.

Die genomische DNA wurde aus *Dictyostelium* präpariert und mittels PCR Reaktion amplifiziert. Auf der linken Seite Darstellung des DNA Größenstandards. Die rechte Seite zeigt das amplifizierte DNA Fragment. Das erhaltene Fragment wurde anschließend zur Sequenzierung verwendet.

3.2 Untersuchung eines centrosomalen Kandidatenproteins in *Dictyostelium discoideum*

Die Analyse der molekularen Zusammensetzung des Centrosoms in *Dictyostelium* ist ein entscheidender Schritt, um ein besseres Verständnis über dieses Organell zu bekommen. Für die Identifikation neuer, centrosomaler Proteine wurde deshalb eine groß angelegte Proteomstudie von Reinders und Schulz durchgeführt (Reinders *et al.*, 2006; Schulz *et al.*, 2009). Mit der Kombination verschiedener Separationstechniken und Massenspektrometrie

konnten mehr als 70 centrosomale Kandidatenproteine in *Dictyostelium* identifiziert werden. Darunter auch Proteine, die mit zellbiologischen und biochemischen Methoden bereits als echte, centrosomale Bestandteile zugeordnet werden konnten. Im zweiten Teil dieser Arbeit sollte das CP75, als möglicher centrosomaler Bestandteil untersucht und erste Einblicke in das Verhalten des Proteins erhalten werden.

3.2.1 Sequenzanalyse des CP75

Um eine Auswahl für die genauere Charakterisierung eines potentiell, centrosomalen Kandidatenproteins treffen zu können, wurden die identifizierten Proteine nach für centrosomale Proteine typischen Merkmalen, wie potentiellen *coiled-coil* Bereichen und einem geringen Expressionslevel untersucht (Schulz *et al.*, 2009). Die Ausbildung von *coiled-coil* Strukturen scheint ein häufiges Merkmal von centrosomalen Proteinen zu sein. Viele Komponenten des Hefespindelpolkörpers und 75 % aller identifizierten humanen, centrosomalen Proteine weisen dieses Charakteristikum auf (Andersen *et al.*, 2003; Zizlsperger *et al.*, 2008). Auch bei den bereits bekannten centrosomalen Proteinen in *Dictyostelium*, wie DdCP224, DdTACC, DdEB1 und γ -Tubulin, wird die Ausbildung von *coiled-coil* Strukturen vorhergesagt (Euteneuer *et al.*, 1998; Gräf *et al.*, 2000; Rehberg und Gräf, 2002; Koch *et al.*, 2006). Das geringe Expressionslevel centrosomaler Proteine wird deutlich dadurch, dass deren cDNA's in konventionellen cDNA-Bibliotheken unterrepräsentiert sind, was wiederum zu wenigen oder keinen in Datenbanken angegebenen EST's (*expressed sequence tags*) führt. Eines der Proteine, dem ein geringes Expressionslevel (www.dictybase.org) und die Ausbildung von *coiled-coil* Strukturen im Bereich der Aminosäuresequenzen 300 - 360 und 500 - 540 zugeordnet wurde, wird durch das Gen *DDB_G0283111* kodiert (**Abbildung 41**). Das von diesem Gen kodierte Protein setzt sich aus 652 Aminosäuren mit einem errechneten Molekulargewicht von 75,3 kDa zusammen und wurde aufgrund der folgenden Charakterisierung CP75 (centrosomales Protein 75 kDa) genannt. Die Suche nach Homologen und konservierten Domänen in anderen Organismen mit dem Programm *BlastP* verlief negativ.

Ergebnisse

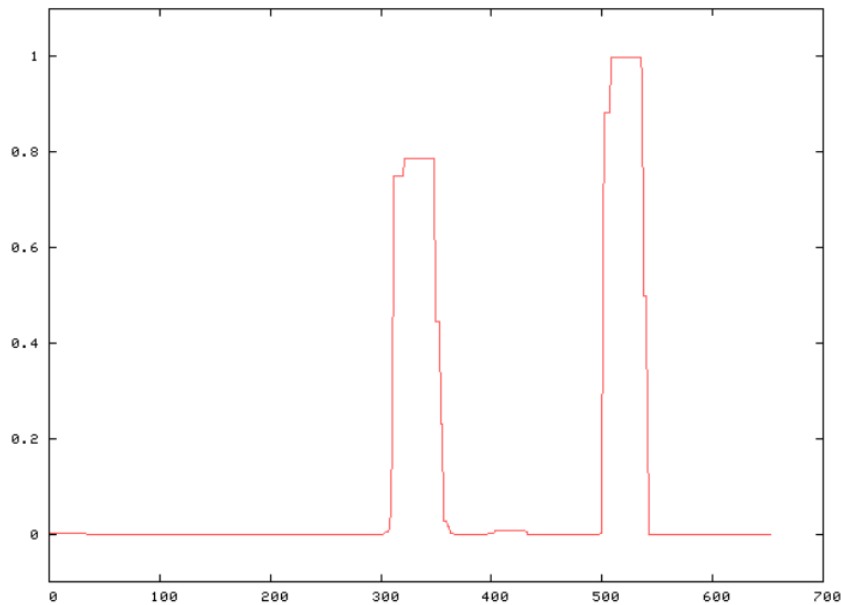


Abbildung 41: Abbildung der prognostizierten *coiled-coil* Bereiche im CP75.

Das Schema gibt in Kurvenform die Wahrscheinlichkeit für die Ausbildung von *coiled-coil* Regionen in den 652 Aminosäuren wieder. Abbildung modifiziert nach http://www.ch.embnet.org/cgi-bin/COILS_form_parser.

3.2.2 GFP-CP75 lokalisiert in Interphasezellen am Centrosom

Um einen genauen Eindruck von der Lokalisation des Proteins in der Zelle zu bekommen, wurde CP75 N-terminal an GFP fusioniert und das Konstrukt in *Dictyostelium* AX2-Zellen transformiert. Die generierten Zellen wurden fixiert, das Mikrotubuli Cytoskelett und das MTOC mit einem Antikörper markiert (anti α - Tubulin) und mittels indirekter Immunfluoreszenzmikroskopie analysiert.

Das GFP-CP75 Signal befand sich in Interphasezellen klein und punktförmig in der Mitte der mit α - Tubulin gefärbten Centrosomenstruktur (**Abbildung 42**). Dabei wurde deutlich, dass die Zellen keine, bzw. eine kaum sichtbare GFP-Hintergrundfluoreszenz zeigten. Die GFP-CP75 Moleküle waren somit fast vollständig ins Centrosom integriert.

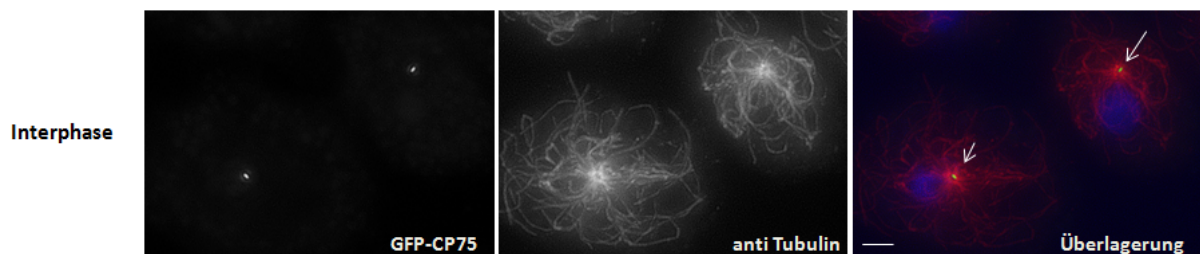


Abbildung 42: Das rekombinante GFP-CP75 Fusionsprotein lokalisiert punktförmig im Bereich des Centrosoms.

Indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie von GFP-CP75 Zellen mit Glutaraldehyd fixiert und mit anti Tubulin/ anti Ratte-Alexa Fluor 568 markiert. Die Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt. Die Überlagerung zeigt GFP-CP75 in grün, anti Tubulin in rot und die DNA in blau. Die Pfeile markieren das GFP-CP75 Balken: 2 μ m

Es folgte der Größennachweis von GFP-CP75 mittels Immunfärbung eines *Western Blots* (**Abbildung 43**). Hierfür wurden Gesamtzellextrakte aus AX2- und GFP-CP75 Zellen

Ergebnisse

verwendet. Der Nachweis des GFP-Fusionsproteins erfolgte mit einem monoklonalen GFP-Antikörper.

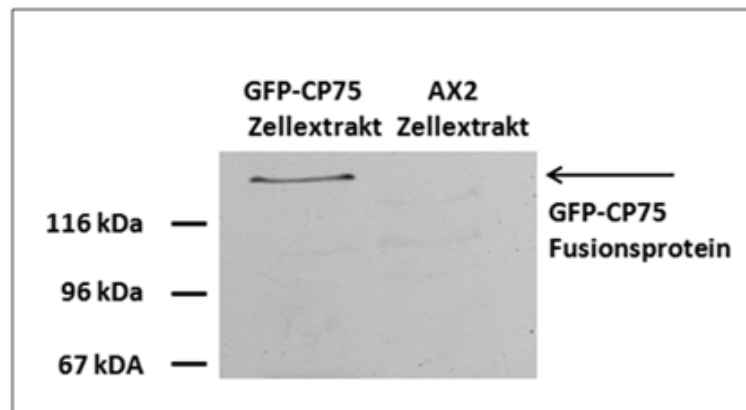


Abbildung 43: Der GFP-Antikörper erkennt spezifisch eine Bande bei ~ 130 kDa.

Das GFP-CP75 ist als Volllängenprotein mit einem GFP-Antikörper markiert. Es erfolgte die Auftragung eines GFP-CP75- und AX2- Gesamtzellextraktes mit anschließendem Transfer auf eine Nitrocellulosemembran. Die Molekulargewichte sind auf der linken Seite dargestellt.

In der Spur mit der Auftragung des GFP-CP75 Gesamtzellextraktes war eine Bande von ~130 kDa zu erkennen, die in der AX2 Kontrolle nicht auftrat. Es konnte somit bestätigt werden, dass es sich bei dem sichtbaren GFP Signal am Centrosom der AX2-Zellen, um das GFP-CP75 handelte. Es wurde deutlich, dass GFP-CP75 im SDS-Gel deutlich langsamer wanderte, als vom kalkulierten Molekulargewicht von ~103 kDa her angenommen wurde. Dies könnte auf eine reduzierte Bindung des SDS an das Protein, oder eine inkomplette Denaturierung der sekundären Proteinstrukturen zurückzuführen sein und findet sich häufig bei centrosomalen, *coiled-coil* haltigen Proteinen (Hjelmeland und Chrambach, 1981).

3.2.3 GFP-CP75 ist an isolierten Centrosomen nachweisbar

Centrosomale Proteine die an aufgereinigten, mikrotubulifreien Centrosomen detektiert werden können, werden als echte, centrosomale Proteine bezeichnet. Im Gegensatz dazu stehen die centrosomassoziierten Proteinen die Mikrotubuli benötigen, um am Centrosom zu lokalisieren (Alieva und Uzbekov, 2008). Für eine genaue Klassifizierung des CP75 in *Dictyostelium*, wurden GFP-CP75 Centrosomen nach einem modifizierten Protokoll aus den entsprechenden Zellen präpariert (Schulz *et al.*, 2006). Für die Markierung der auf ein Deckglas zentrifugierten Centrosomen, wurde der monoklonale Antikörper gegen DdCP224 verwendet, der als Coronamarker ringförmig die äußere Struktur des Centrosoms markiert. Die mikroskopische Analyse zeigte, dass alle Centrosomen eine grüne, punktförmige Fluoreszenz aufwiesen, die sich innerhalb des vom Coronamarker DdCP224 markierten Bereichs befand. Daher kann davon ausgegangen werden, dass GFP-CP75 ein *Core* Protein darstellt (**Abbildung 44**).

Ergebnisse

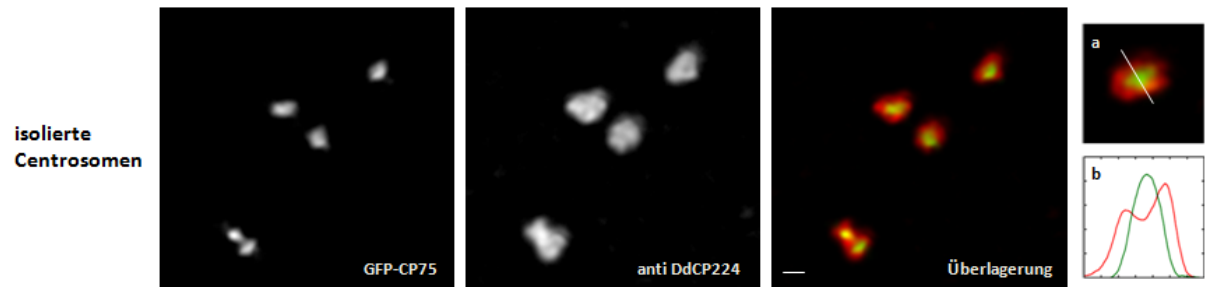


Abbildung 44: Das rekombinante GFP-CP75 Fusionsprotein lokalisiert punktförmig an aufgereinigten Centrosomen. Die isolierten Centrosomen wurden mit Methanol fixiert und markiert mit anti DdCP224/anti Maus-AlexaFluor 568 als centrosomalen Coronamarker (rot in Überlagerung und Bild a,b) und GFP-CP75 (grün in Überlagerung und Bild a,b). (a): Auswahl eines repräsentativen Centrosoms, mit einer Linie die den Querschnitt des Centrosoms markiert (b): Verteilung der Fluoreszenzintensität entlang des Centrosomenquerschnitts (GFP-Kanal in grün, DdCP224-Kanal in rot) Modifiziert nach Schulz *et al.* 2009. Balken: 1 μ m

CP75 ist also ein echtes, centrosomales Protein, da es auch an mikrotubuli-freien Centrosomen nachweisbar war.

3.2.4 Die centrosomale Lokalisation von GFP-CP75 ist zellzyklusabhängig

Bei der Duplikation des *Dictyostelium* Centrosoms zu Beginn der Prophase, ist das Auflösen der Corona- und die Aufspaltung der dreilagigen *Core* Struktur, bei der die mittlere Lage verschwindet, ein entscheidender Vorgang. Anhand des Verhaltens von centrosomalen Proteinen im Laufe der Centrosomenduplikation ist es theoretisch möglich, Aussagen über die Zugehörigkeit des Proteins zur Corona- bzw. der dreilagigen *Core* Struktur zu treffen. Aus diesem Grunde wurde die Anwesenheit des GFP-CP75 am Centrosom in Abhängigkeit vom Mitosestadium genauer analysiert. Dies erfolgte, indem GFP-CP75 exprimierende Zellen fixiert und mit einem α -Tubulin Antikörper markiert wurden, der eine Klassifizierung der Mitosestadien möglich machte.

In der Interphase konnte das GFP-CP75 als kleines, punktförmiges Signal innerhalb des Centrosoms erfasst werden. Mit dem Eintritt in die Prophase wurde das GFP Signal in Form von zwei Punkten sichtbar, die einen geringen Abstand zueinander aufzeigten. Zellen die sich in der Metaphase befanden, besaßen dagegen kein GFP-CP75 Signal im Bereich der Spindelpole mehr. Stattdessen wurde eine leichte Zunahme der GFP-Fluoreszenz im Bereich des Cytoplasmas sichtbar. Erst mit dem Eintritt in die Telophase konnte das GFP-Signal erneut detektiert werden (**Abbildung 45**).

Ergebnisse

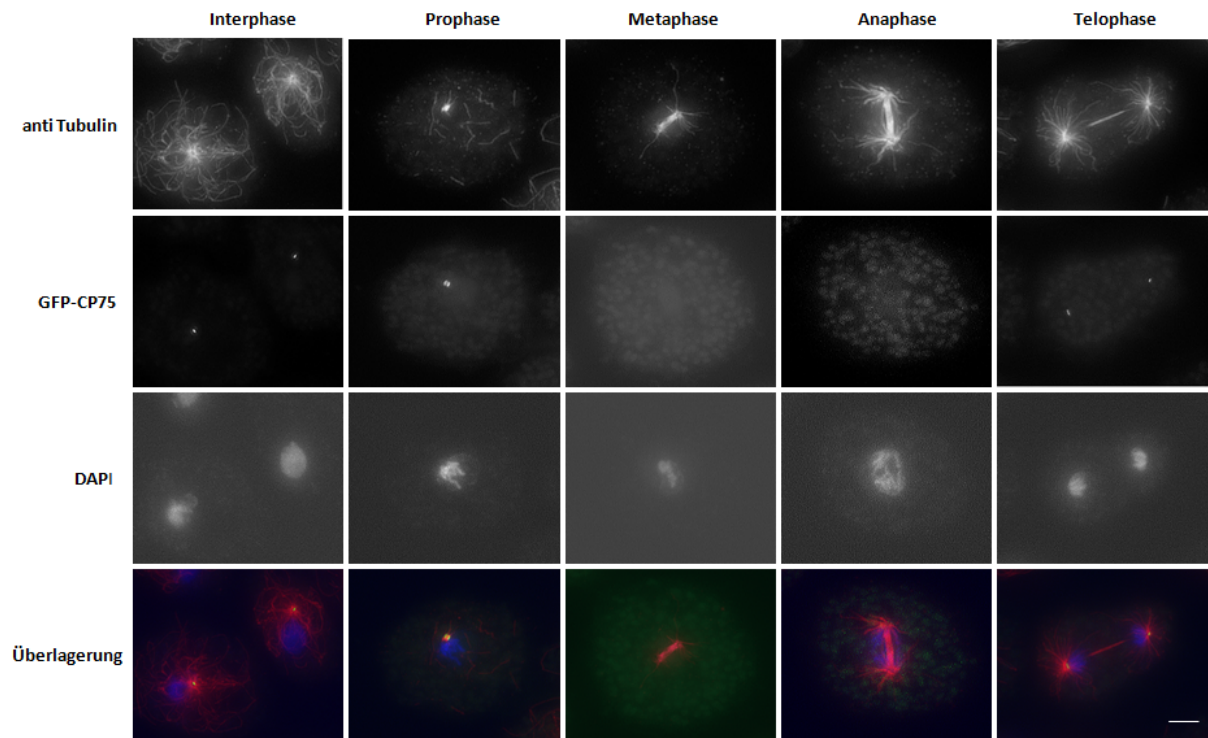


Abbildung 45: Zellzyklus-abhängige Lokalisation des GFP-CP75.

Indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie von GFP-CP75 Zellen mit Glutaraldehyd fixiert und mit anti Tubulin/anti Ratte AlexaFluor 568 markiert. Abbildung der Interphase und der verschiedenen Mitosestadien. Die grauen Abbildungen zeigen den anti Tubulin Antikörper, das GFP-CP75 Fusionsprotein und der DNA-Markierung durch DAPI. Die Überlagerung zeigt anti Tubulin in rot, GFP-CP75 in grün, DAPI in blau. Balken: 2 µm

Damit das Verhalten des GFP-CP75 auch in lebenden Zellen untersucht werden konnte, wurde ein GFP-CP75 *Dictyostelium* Stamm generiert, der zusätzlich *cherry* Histon 2B exprimierte. Damit war es möglich, auch ohne eine Fixierung der Zellen mit anschließender Antikörpermarkierung den Eintritt in die Mitose zu erkennen und die einzelnen Mitosestadien zu klassifizieren.

Die Aufnahme der lebenden Zellen in Form eines Films, startete unmittelbar in der Prophase. Somit war das GFP-CP75 Signal im Bereich des Centrosoms noch sichtbar. Nach 2 min, d.h. mit dem Eintritt der Zelle in die Metaphase, war die grüne, centrosomale Fluoreszenz nicht mehr vorhanden, sondern trat erst nach 6:45 min im Bereich der Spindelpole wieder in Erscheinung (**Abbildung 46**).

Ergebnisse

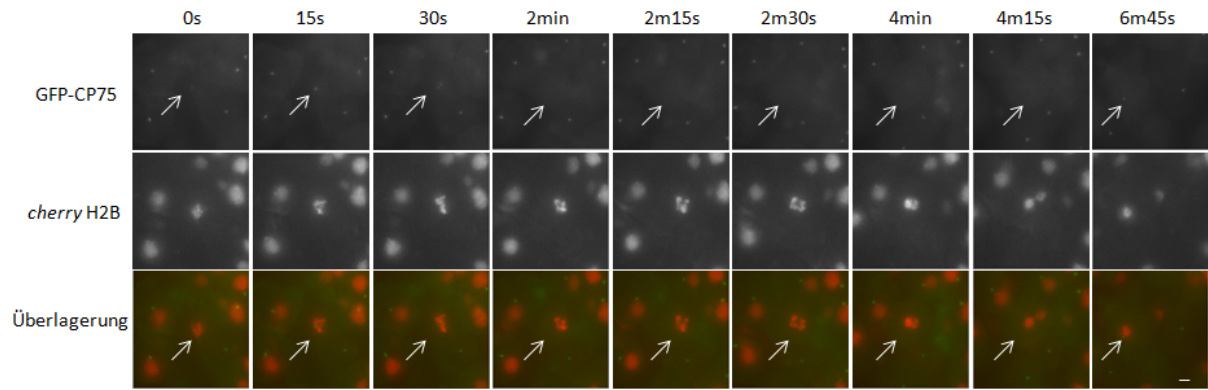


Abbildung 46: Die Lokalisation des GFP-CP75 erfolgt zellzyklusabhängig.

Abbildung einer Zeitreihe von Weitfeld Mikroskop Bildern einer mitotischen Zelle und von Interphasezellen. Das GFP-CP75 ist in der oberen Abbildung und *cherry* Histon 2B in der mittleren Abbildung dargestellt. Die Überlagerung beider Fluoreszenzfarbstoffe ist in der unteren Abbildung dargestellt. Die Zeitreihe startet mit dem Eintritt in die Mitose (Zeitpunkt 0) und endet nach 6,45 min. Die Zeitpunkte sind über der Abbildung dargestellt. Für jeden Zeitpunkt wurde ein z-Stapel mit je fünf Bildern in einem Intervall von 0,25 µm aufgenommen. Die Aufnahme der z-Stapel erfolgte alle 15 Sekunden. Dargestellt sind die "Maximum-Intensity"-Projektionen. Balken: 2 µm

Die Lokalisation des GFP-CP75 am *Dictyostelium* Centrosom ist also abhängig vom Mitosestadium. Dabei wurde deutlich, dass das Verschwinden des Proteins innerhalb der Mitose mit dem Auflösen der mittleren Lage der *Core* Struktur in der Prometahase zeitlich korreliert (Gräf *et al.*, 2004). CP75 könnte daher einen zentralen Bestandteil der *Core* Struktur repräsentieren.

3.2.5 GFP-CP75 zeigt in der Interphase keine Mobilität am Centrosom

Mit der Durchführung von FRAP-Versuchen ist es möglich, Erkenntnisse über eine mögliche strukturelle Funktion eines Proteins zu erhalten (**Abschnitt 2.5.3**), da bei Proteinkomponenten, die für den strukturellen Zusammenhalt des Centrosoms notwendig sind, keine Mobilität in der Interphase erwartet wird. Zu diesem Zwecke wurde das GFP-CP75 mehrfachen FRAP-Analysen unterzogen.

Beim Bleichvorgang fiel die Intensität der Fluoreszenz von GFP-CP75 auf ~ 5% des Ausgangswerts ab und erholte sich nach dem Ausbleichen nicht wieder (**Abbildung 47**).

Ergebnisse

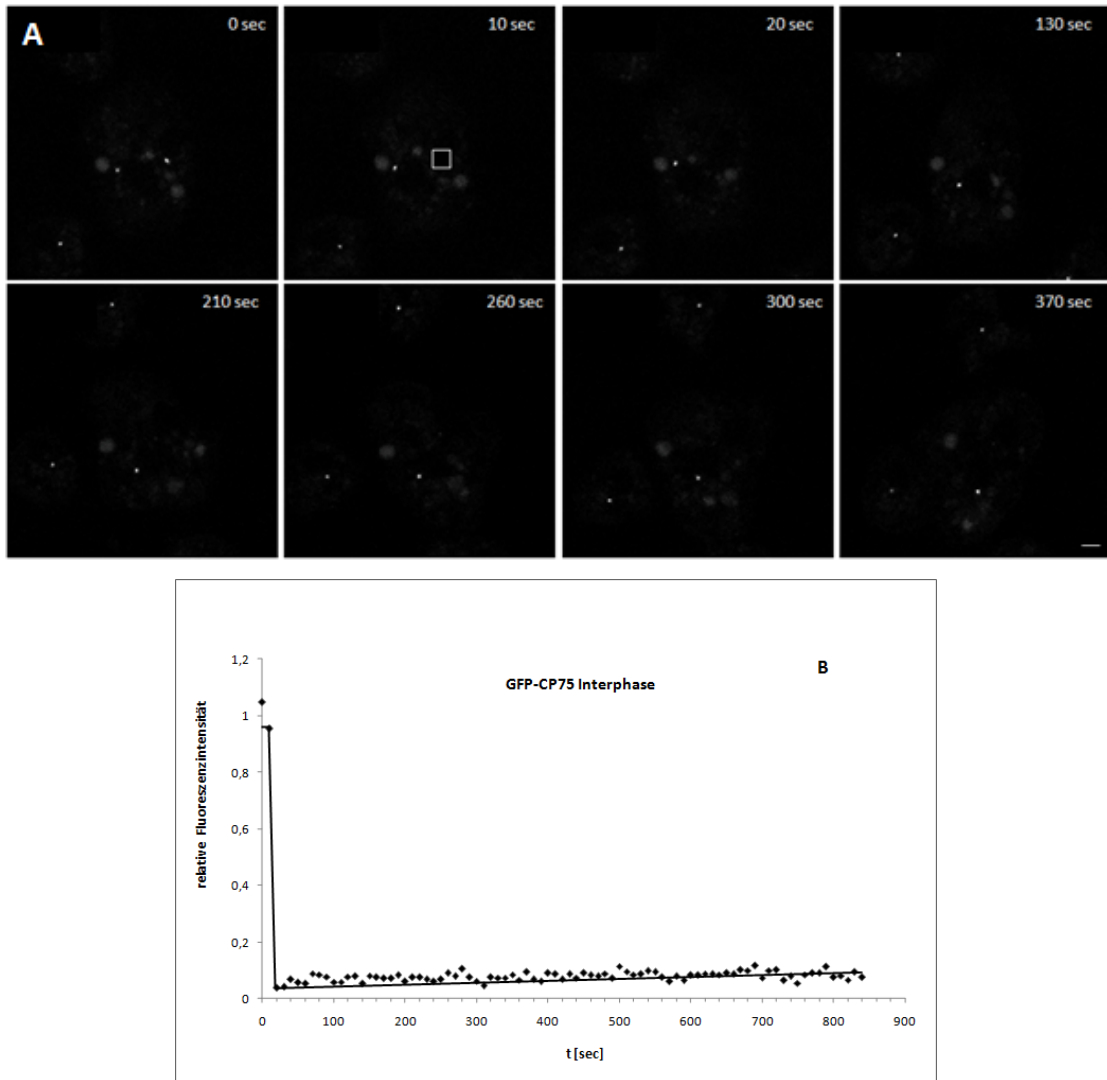


Abbildung 47: GFP-CP75 zeigt keine deutliche Mobilität im Interphasecentrosom.

FRAP Experiment in einer 3D Zeit Serie, aufgenommen an einen konfokalem Laserscanning Mikroskop. Das ausgebleichte Centrosom ist durch einen weißen Balken markiert. Die Aufnahmezeit betrug sechs z-Stapel pro Minute (Bildanzahl: fünf Bilder/s). Abbildung der "Maximum-Intensity"-Projektionen von fünf Schichten/Abbildung eines repräsentativen Experimentes.

A, B: Ausbleichen definierter Region in der Interphase ohne Regenerierung der Fluoreszenz

B : korrigierte FRAP- Kurve eines repräsentativen Experimentes (n= 9) Die x-Achse gibt den zeitlichen Verlauf wieder, die y-Achse stellt die relative Fluoreszenz dar.

Das Protein scheint somit keine Mobilität innerhalb des Centrosoms zu besitzen. Dieses Ergebnis lässt den Schluss zu, dass CP75 in *Dictyostelium* eine strukturelle Funktion übernimmt.

3.2.6 Die Überexpression des GFP-CP75 hat keinen Einfluss auf den Phänotyp der Zelle

Da die Expression des GFP-CP75 Fusionsprotein zusätzlich zum endogenen Protein erfolgte, kann man von einer Überexpression sprechen. Ein möglicher Einfluss der zusätzlichen Expression auf den Phänotyp der Zelle wurde mit unterschiedlichen Methoden ausgewertet.

Ergebnisse

Für die Analyse des Verhältnisses von Zellkernen und Centrosomen zueinander, wurden diese in fixierten Zellen ausgezählt. Die numerische Übereinstimmung von Kernen und Centrosomen war bei den AX2-Wildtypzellen ähnlich hoch, wie beim generierten GFP-CP75-Stamm (AX2: 98 %, GFP-CP75: 98 %). Dementsprechend zeigten sich keine signifikanten Unterschieden zwischen den beiden Zelllinien hinsichtlich des Auftretens überzähliger bzw. unterzähliger Centrosomen (überzählige Centrosomen: AX2: 2 %, CP75: 1,7; unterzählige Centrosomen: AX2: 0 %, CP75: 0,3 %).

Das Centrosom in *Dictyostelium* ist über eine fibröse Struktur mit dem Zellkern verbunden (Omura und Fukui, 1985). Um zu überprüfen, ob die Überexpression des CP75 einen Einfluss auf den Kontakt zwischen den beiden Zellorganellen ausübte, wurde der Abstand zwischen der mit DAPI gefärbten DNA und dem Centrosom an "Maximum Intensity"-Projektionen von fixierten Zellen mit dem Längenmessungstool von Axiovision 4.8 bestimmt. Ein Abstand kleiner 1 μm wurde als „normal“ eingestuft. Bei der Auswertung der Distanz war erkennbar, dass eine Entfernung $\geq 1 \mu\text{m}$ in 5 % der AX2- und 7,7 % der GFP-CP75-Zellen beobachtet werden konnte (**Abbildung 48**: GFP-CP75 Zellen zeigen keine bemerkenswerten Unterschiede bei der Analyse von Zellkern- und Centrosomenanzahl. Es trat somit kein Unterschied zwischen beiden Zelllinien auf.

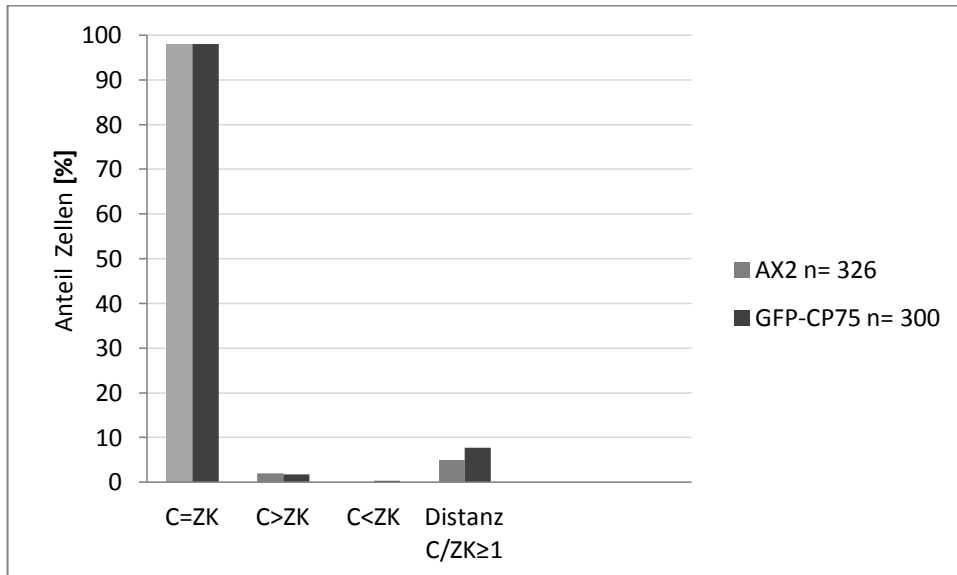


Abbildung 48: GFP-CP75 Zellen zeigen keine bemerkenswerten Unterschiede bei der Analyse von Zellkern- und Centrosomenanzahl.

Angabe des prozentualen Anteils von AX2-Wildtypzellen und GFP-CP75 Zellen mit gleicher Anzahl von Centrosomen und Zellkernen (C = ZK), überzähligen Centrosomen (C > ZK), fehlenden Centrosomen (C < N) und Zellen die eine Distanz $\geq 1 \mu\text{m}$ zwischen Zellkern und Centrosom aufwiesen.

Weiterhin wurde bei der Analyse der GFP-CP75 Zellen kein Unterschied beim Wachstumsverhalten beobachtet. Die Überexpression des GFP-CP75 Fusionsprotein übte also insgesamt keinen merkbaren Einfluss auf den Phänotyp der Zelle aus.

3.2.7 Der Versuch der Generierung eines polyklonalen CP75 Antikörpers

Für eine genauere Untersuchung des endogenen CP75 sollte ein polyklonaler Antikörper generiert werden. Da die Expression eines Volllängenproteins in *E. coli* fehlschlug, wurde der N-Terminus des CP75 bestehend aus 312 Aminosäuren als rekombinantes MBP-Fusionsprotein als Antigen exprimiert. Das Protein wurde über eine Affinitätschromatographiesäule aufgereinigt und seine Größe anhand einer SDS-Elektrophorese mit anschließender Coomassie-Färbung überprüft. Danach wurde es für die Immunisierung zweier Kaninchen verwendet (**Abbildung 49**).

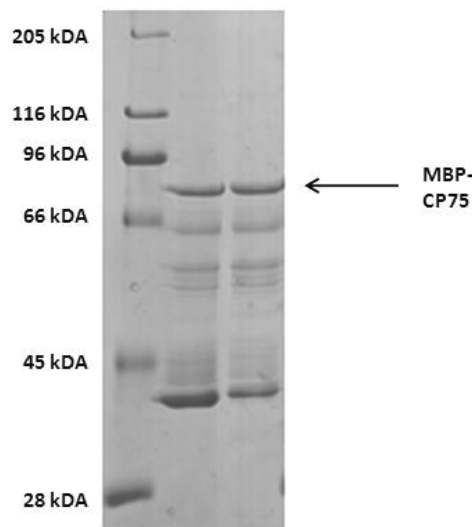


Abbildung 49: Expression des N-Terminus des CP75 als MBP-Fusionsprotein in *E. coli*.

Das MBP-CP75 wurde aufgereinigt, auf ein SDS-Gel übertragen und mit Coomassie angefärbt. Die Bande bei ~ 80 kDa korrespondiert mit dem MBP-CP75 Fusionsprotein. Die Molekulargewichte sind auf der linken Seite dargestellt.

Die erhaltenen Antikörperseren wurden zuerst in einer *Western Blot* Analyse an isolierten AX2- und GFP-CP75 Centrosomen getestet, zeigten jedoch keinen spezifischen Nachweis des CP75 bzw. GFP-CP75. Auch bei den anschließend durchgeführten Immunfluoreszenzmikroskopieversuchen an ganzen Zellen (AX2, GFP-CP75) und auf isolierten Centrosomen erfolgte keine Markierung des Antigens durch die Testseren. Die Aufreinigung der Antikörper über eine Affinitätschromatographie war erfolglos. Es konnte somit kein funktionsfähiger Antikörper generiert werden. Eine Verwechslung mit einem zeitgleich eingesandten Antigen seitens der Immunisierungsfirma ist telefonischen Auskünften der Firma nach möglich.

3.2.8 CP75 interagiert mit CP39

Im Rahmen des Screenings nach neuen, centrosomalen Komponenten in *Dictyostelium discoideum* wurden 34 Kandidatenproteine identifiziert. Dazu zählten neben dem CP75, das CP91, CP55 und CP39, die vermutlich auch der *Core* Struktur des Centrosoms zugeordnet werden (Schulz *et al.*, 2009). Um neue Einblicke in die Funktionsweise des *Dictyostelium*

Ergebnisse

Centrosoms zu bekommen, war es wichtig, mögliche Interaktionen zwischen Proteinen aufzudecken. Aus diesem Grunde wurden "*Yeast-Two-Hybrid*"-Assays durchgeführt.

Der "*Yeast-Two-Hybrid*"-Assay bietet die Möglichkeit eine Interaktion von Proteinen in lebenden Hefen nachzuweisen. Das experimentelle System macht sich dabei die Komposition vieler eukaryontischer Transkriptionsfaktoren zu Nutze, die aus zwei Domänen bestehen. Dazu zählt die DNA-Bindedomäne (DNA-BD), die es dem Transkriptionsfaktor ermöglicht, in räumlicher Nähe zum Transkriptionsstartpunkt zu binden und die Aktivierungsdomäne (AD), die mit der Transkriptionsmaschinerie interagiert und damit die Transkription von Genen initiiert. Die Beobachtung, dass man die DNA-BH und die AD trennen und auf zwei separaten Proteinen exprimieren kann, führte zu der Entwicklung des "*Yeast-Two-Hybrid*"-Systems. Im Falle einer Interaktion von CP75 mit dem potentiellen Bindungspartner, werden die DNA-Bindedomäne und die Aktivierungsdomäne in räumliche Nähe gebracht, so dass ein funktionsfähiger Transkriptionsaktivator entsteht. Dieser ist in der Lage die Reportergene (*LacZ* und *HIS3*) des verwendeten Hefestamms zu aktivieren. Die Transkription dieser beiden Gene resultiert in einem Hefephänotyp, der auf His-defizientem Medium wachsen kann und β -Galactosidase exprimiert, was bei Gabe eines geeigneten Substrats in einer Blaufärbung der Hefekolonien resultiert. In Vorexperimenten wurde überprüft, ob bereits die einzelne Expression der Transkriptionsdomänen eine Autoaktivierung der Reportergene induziert. Der genaue Ablauf des Experimentes wurde in **Abschnitt 2.3.15** beschrieben.

Die Vorversuche zeigten, dass die Expression des CP39 - Vollängenproteins in pLexA-N kombiniert mit dem pAD-Gal4-2.1 Leervektor eine Blaufärbung von Hefekolonien induzierte. Somit wurde bei der späteren Durchführung des Interaktionsversuches die Kombination CP39 in pLexA-N + CP75 in pAD-Gal4-2.1 nicht berücksichtigt, da sie falsch positive Ergebnisse geliefert hätte. Die weiteren Versuche für die Testung der Autoaktivierung zeigten keine unspezifische Aktivierung der Reportergene (**Tabelle 3**).

Ergebnisse




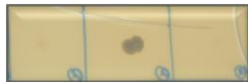

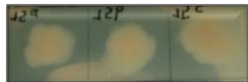


Vektorkombinationen zum Testen der Autoaktivierung der Reportergene	Resultat
CP75 VL in pAD-Gal4-2.1 + pLEXA-N Leervektor	
CP91 VL in pAD-Gal4-2.1 + pLEXA-N Leervektor	
CP55 VL in pAD-Gal4-2.1 + pLEXA-N Leervektor	
CP39 VL in pAD-Gal4-2.1 + pLEXA-N Leervektor	
CP75 VL in pLEXA-N + pAD-Gal4-2.1 Leervektor	
CP91 VL in pLEXA-N + pAD-Gal4-2.1 Leervektor	
CP55 VL in pLEXA-N + pAD-Gal4-2.1 Leervektor	
CP39 VL in pLEXA-N + pAD-Gal4-2.1 Leervektor	

Tabelle 3: Darstellung der verwendeten Protein- und Vektorkombinationen für die Testung der Autoaktivierung der Reportergene.

Auflistung der Proteine in Volllänge (VL) in den klonierten Vektoren mit dem zusätzlich getesteten Leervektor. Die Leervektoren exprimierten in diesem Fall nur die DNA-Bindedomäne (pLEXA-N) bzw. die Aktivierungsdomäne (pAD-Gal4-2.1). Die Blaufärbung von Hefekolonien charakterisiert eine Aktivierung der Reportergene. Alle Kombinationen wurden jeweils in einem dreifachen Ansatz durchgeführt.

Bei der eigentlichen Durchführung des "Yeast-Two-Hybrid"-Assay zur Suche nach potentiellen Interaktionspartnern des CP75 zeigte sich, dass keine Verbindung zum CP91 und CP55 vorlagen.

Auch eine Selbstinteraktion des CP75 wurde mit diesem Experiment ausgeschlossen. Allerdings konnte im Rahmen dieses Versuchs demonstriert werden, dass eine mögliche Interaktion zwischen dem CP75 und dem CP39 besteht. Dies wurde durch eine Blaufärbung der Hefekolonien deutlich, die aus einer Aktivierung des *LacZ* Genes resultierte (**Tabelle 4**).

Ergebnisse

CP39 VL in pAD-Gal4-2.1 + CP75 VL in pLEXA-N



Tabelle 4: Darstellung der Interaktion zwischen dem CP75 und CP39.

Die Hefetransformation wurde in einem dreifachen Ansatz durchgeführt. Die Blaufärbung der Hefekolonien symbolisiert eine Interaktion zwischen dem CP75 und CP39 im "Yeast-Two-Hybrid"-Assay. Das fehlende Hefewachstum im dritten Versuchsansatz, resultierte aus einer fehlenden Auftragung transformierter Hefezellen.

Um von einer eindeutigen Interaktion zwischen dem CP75 und dem CP39 in *Dictyostelium* sprechen zu können, muss das erhaltene Ergebnis mit anderen Methoden verifiziert werden, da die "Yeast-Two-Hybrid"-Methode anfällig für falsch positive Ergebnisse ist.

4 Diskussion

4.1 NE81 in *Dictyostelium discoideum* - ist es das erste laminähnliche Protein in einem einzelligen Organismus?

Die Suche nach neuen centrosomalen Bestandteilen im *Dictyostelium* Centrosom, führte zur Identifikation von NE81. Dieses nukleäre Protein konnte mit Hilfe von elektronenmikroskopischen Daten als Protein charakterisiert werden, das mit der inneren Kernmembran assoziiert ist.

Die in dieser Arbeit vorgestellten Daten weisen stark darauf hin, dass es sich beim DdNE81 um das erste laminartige Protein in einem einzelligen Organismus handelt.

4.1.1 Die Struktur und Lokalisation des NE81 ähnelt Laminen in Metazoen

Die prognostizierte strukturelle Organisation des NE81 mit einer aus 370 Aminosäuren bestehenden *coiled-coil* Domäne, einer globulären Kopfdomäne mit einer mutmaßlichen CDK1-Phosphorylierungskonsensussequenz, einem Kernlokalisierungssignal hinter der *coiled-coil* Domäne und einer CaaX-Box, die sich am C-Terminus befindet und ein Ort zahlreicher posttranslatinaler Modifikationen darstellt, ähnelt sehr dem Aufbau von Laminen.

Die CaaX-Box stellt auch in anderen Proteinen, wie in heterotrimeren G-Proteinen und Proteinen der Ras-Superfamilie, ein hochkonserviertes Sequenzelement dar, aber nur das Protein Kugelkern in *Drosophila* ist neben den Laminen das einzig bekannte Kernprotein mit einer CaaX-Box (Melcer und Gruenbaum, 2006; Brandt *et al.*, 2006). Kugelkern ist zusammen mit den Laminen an der Bildung der nukleären Lamina beteiligt (Brandt *et al.*, 2006). Das Protein kann aber aufgrund einer deutlich kürzeren α -helicalen *coiled-coil* Region, bestehend aus nur 47 Aminosäuren, klar von den Laminen abgegrenzt werden (Polychronidou *et al.*).

Die nukleäre Lamina, aus Laminen und anderen Proteinen bestehend, ist als polymeres Netzwerk mit der inneren Kernmembran assoziiert (Jahn *et al.*). Demzufolge war es wichtig zu überprüfen, ob NE81 an der inneren Kernmembran detektiert werden kann, was durch elektronenmikroskopische Aufnahmen bestätigt werden konnte (**Abbildung 14**). Somit war der erste Hinweis gegeben, dass es sich bei dem *Dictyostelium* Protein um ein laminartiges Protein handeln könnte. Gleichzeitig wurde damit der Beweis erbracht, dass die prognostizierte Kernlokalisationssequenz funktional ist.

4.1.2 Der Einfluss der CaaX-Box auf das Verhalten des NE81

Einen weiteren Hinweis, dass NE81 als Vorläufer der Lamine in Metazoen gelten könnte, ergab eine Analyse des *Dictyostelium* Genoms. Es konnten potentielle Gene identifiziert werden, die für die Prozessierung der CaaX-Box notwendig sind.

Dazu zählen die beiden Untereinheiten der Farnesyltransferase *fntA*, *fntB*, die Endopeptidase *Zmpste24* und die Carboxylmethyltransferase *icmA*. Die Existenz dieser Gene im Genom der sozialen Amöbe deutet darauf hin, dass die CaaX-Box bei NE81 ähnlich prozessiert wird wie die von Laminen.

Zur funktionellen Charakterisierung der CaaX-Box am C-terminalen Ende des NE81, diente die Herstellung von zwei CaaX-Box deletierten Proteinvarianten, GFP-NE81 Δ CLIM und GFP-NE81 Δ C. Diese lokalisierten im Gegensatz zum Volllängenprotein kaum bzw. gar nicht in der inneren Kernmembran, sondern reichert sich hauptsächlich in Form diskreter Cluster im Bereich des Nukleoplasmas an (**Abbildung 27**, **Abbildung 29**). Ein ähnliches Verhalten konnte auch in CHO-Zellen (*chinese hamster ovary*) und in Xenopuszellen nachgewiesen werden (Izumi *et al.*, 2000; Prüfert *et al.*, 2004). Weiterhin zeigten fibroblastenähnlichen Mauszellen mit einem stabil exprimierten Huhn Lamin B2, dass die CaaX-Box für die nukleäre Membranassoziation des Proteins notwendig ist (Kitten und Nigg, 1991). Mit der Herstellung der CaaX-Box-deletierten NE81 Varianten konnte ein wichtiger Hinweis erbracht werden, dass die CaaX-Box in *Dictyostelium* funktional und für die Lokalisation des Proteins im Bereich der inneren Kernhülle notwendig ist. Diese Ergebnisse unterstützen die Theorie, dass NE81 eine Ähnlichkeit zu Laminen aufweist.

4.1.3 NE81 verfügt über eine zellkernstabilisierende Funktion

Lamine sind über eine Interaktion mit Mitgliedern der Sun-Familie in der inneren Kernmembran und den sogenannten KASH-Domäne Proteinen in der äußeren Kernmembran, mit allen drei Cytoskelettelementen, Aktinfilamenten, Mikrotubuli und Intermediärfilamenten, verknüpft. Diese Verbindung zwischen dem Nukleo- und dem Cytoskelett ist entscheidend für die mechanische Festigkeit der Zelle gegen äußere Einflüsse und wird als LINC-Komplex bezeichnet (**Abbildung 50**) (Starr und Fridolfsson, 2010)(Stewart-Hutchinson *et al.*, 2008).

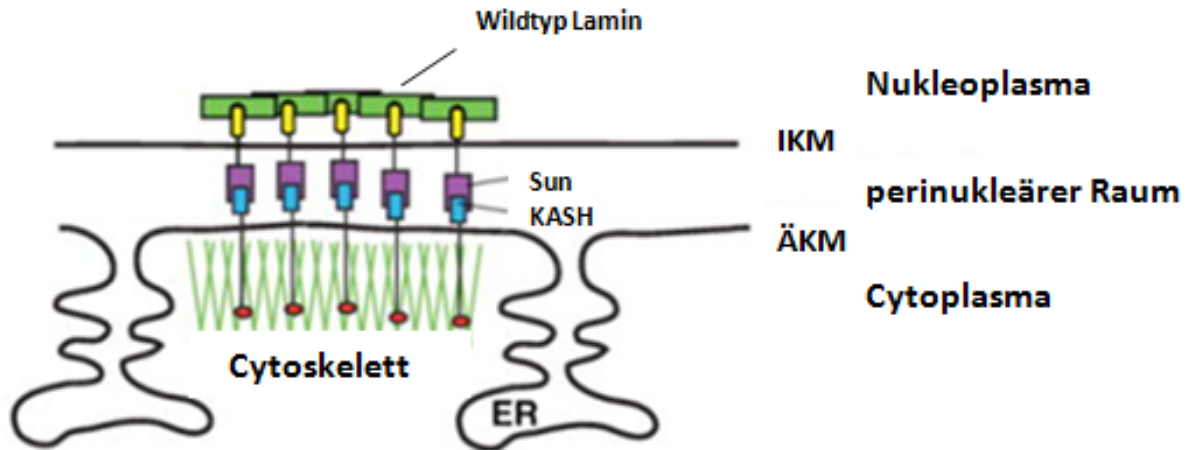


Abbildung 50: Beteiligung der LINC-Komplexe an der mechanischen Festigkeit der Zelle.

Darstellung der LINC-Komplexe, die eine physikalische Verbindung zwischen der nukleären Lamina und dem Cytoskelett herstellen. Abkürzungen: ÄKM: äußere Kernmembran, IKM: innere Kernmembran, ER: endoplasmatisches Retikulum
Modifiziert nach Hodzic *et al.* 2008

Die Bedeutung der LINC-Komplexe bei der mechanischen Beständigkeit von Zellen, konnte in Versuchen mit Mäusen bestätigt werden. Diese zeigten aufgrund einer Defizienz von A-Typ Laminen eine Unterbrechung der LINC-Komplexe, die in einem Verlust der mechanischen Festigkeit der Zelle resultierte. Die Folge war das Auftreten eines Phänotyps, der typisch für humane muskuläre Dystrophien und Kardiomyopathien ist (Sullivan *et al.*, 1999).

Dass auch NE81 eine stabilisierende Funktion innerhalb des Zellkerns und damit in der gesamten Zelle gegen äußere und innere Einflüsse übernimmt, wurde in zwei Experimenten mit den generierten GFP-NE81 Δ CLIM-Mutanten gezeigt. Zum einen konnte mit Hilfe von Wachstumsversuchen in Schüttelkultur demonstriert werden, dass die Mutanten einer mechanischen Belastung empfindlicher gegenüber standen als die AX2-Wildtypzellen. Dies wurde durch die Klumpenbildung der GFP-NE81 Δ CLIM-Zellen deutlich, die als Gegenreaktion zu der erhöhten mechanischen Sensibilität interpretiert werden kann. Zum anderen konnte durch die Ausübung kontrollierter Scherkräfte bei den Filtrationsversuchen durch einen Polycarbonatfilter konstanter Porengröße belegt werden, dass GFP-NE81 Δ CLIM-Zellen gegenüber zunehmender mechanischen Belastungen deutlich sensibler reagierten als Kontrollzellen. Ein ähnliches Resultat konnte auch in lamindefizienten *Xenopus*-Eiextrakten und lamindeletierten Säugerzellen nachgewiesen werden, die verschiedenen Scherkräften ausgesetzt wurden (Dahl *et al.*, 2008; Broers *et al.*, 2004; Lammerding *et al.*, 2004).

Es ist naheliegend, dass die veränderte Belastbarkeit der GFP-NE81 Δ CLIM-Zellen aus der fehlenden Prozessierung der CaaX-Box resultiert, die sich in einer abnormalen Lokalisation des Proteins in Clustern im Inneren des Zellkerns äußert (**Abbildung 27**). Geht man davon

aus, dass die Assemblierung von NE81 bei fehlender Membranverankerung nicht zweidimensional entlang der Kernmembran in der Ausbildung eines möglichen Netzwerkes und somit in der Ausbildung eines Nukleoskeletts resultiert, sondern dreidimensional erfolgt, wäre die Ausbildung der dynamischen GFP-NE81 Δ CLIM-Cluster leicht zu erklären. Die Rekrutierung von intaktem, endogenem NE81 in die Proteincluster könnte wiederum zu einem reduzierten NE81-Gehalt in der Kernhülle führen. Dies könnte in der Folge mit einer Schwächung der Kernhülle und des Nukleoskeletts einhergehen, die die Hypersensitivität der Zellen gegen äußere und innere Einflüsse erklären würde. Auch könnten noch unbekannte Interaktoren des NE81 in die Proteincluster integriert worden sein und die Schwächung der Kernhülle unterstützt haben.

Mit den durchgeführten Versuchen der GFP-NE81 Δ CLIM-Zellen ist ein wichtiger Beweis erbracht worden, dass NE81 eine Funktion bei der Stabilisierung der Zelle gegen interne und externe Einflüsse übernimmt, was ein weiteres Argument für NE81 als laminartiges Protein ist. Das postulierte NE81-basierte Nukleoskelett, das ähnlich wie bei Laminen aus einem Netzwerk unter der inneren Kernmembran bestehen könnte, könnte über Sun1 mit dem Cytoskelett kommunizieren. Sun1 ist als bisher einzige essentielle Komponente für die Interaktion von Zellkern und Mikrotubuli-Cytoskelett nachgewiesen worden. Die Existenz von klassischen LINC Komplexen wie in höheren Zellen, ist bei *Dictyostelium* bisher unklar, da Interaptin als bisher einziges KASH-Domäne ähnliches Protein in *Dictyostelium* nachweislich keine Interaktion zu Sun1 aufweist (Xiong *et al.*, 2008). In künftigen Experimenten soll das postulierte Netzwerk zwischen Nukleoskelett und Cytoskelett, durch Interaktionsstudien zwischen dem NE81 und Sun1 und noch unbekanntem Bindungspartnern aufgeklärt werden.

4.1.4 Das zellzyklusabhängige Verhalten des NE81 wird vermutlich durch die CDK1 reguliert

Das Verhalten von Laminen innerhalb der Zelle ist vom Stadium des Zellzyklus abhängig und wird durch die Phosphorylierung durch CDK1 an definierten Phosphorylierungsstellen reguliert, derselben Cyclin abhängige Kinase1, die auch den Eintritt in die Mitose steuert.

In der Interphase finden sich Lamine als Netzwerk von nukleären Intermediärfilamenten unterhalb der Kernhülle zusammen. In der Mitose wird dieses Netzwerk durch die Phosphorylierung durch die CDK1 aufgelöst. Die B-Typ Lamine bleiben dabei beim Kernhüllenabbau mit Membranvesikeln der Kernmembran assoziiert, während die A-Typ Lamine in den gelösten Zustand übergehen.

Mit der Analyse des endogenen NE81 und des GFP-NE81 Fusionsproteins, die hier beide als Volllängenprotein bezeichnet werden, konnte demonstriert werden, dass auch deren Mobilitätsverhalten sich in der Mitose verändert und dieses somit reguliert sein muß. In der Interphase und zu Beginn der Mitose zeigte sich eine gleichmäßige Verteilung des Volllängenproteins im Bereich der Kernhülle. Ab der Metaphase jedoch trat eine deutlich veränderte Verteilung beider Proteine im Bereich der Konstriktionszone bei der Karyokinese (=Äquatorialebene) auf. Hier war nahezu kein NE81 nachweisbar. Nachdem aus früheren Untersuchungen an GFP-Sun1 Zellen bekannt war, dass auch während der gesamten Mitose eine intakte Kernhülle vorliegt, ist die verminderte Konzentration des Volllängenproteins in diesem Bereich der Kernhülle am einfachsten durch einer erhöhten Mobilität des Proteins entlang der Kernhülle zu erklären (**Abbildung 10, Abbildung 13**)(Schulz *et al.*, 2009).

In den NE81 Varianten ohne CaaX-Box (GFP-NE81 Δ CLIM, GFP-NE81 Δ C) wurde das mitoseregulierte Verhalten des NE81 ebenfalls sichtbar und äußerte sich in einem Auf- und Abbau der GFP-Cluster im Laufe des Zellzyklus (**Abbildung 27, Abbildung 37**). Setzt man voraus, dass eine von NE81 getragene nukleäre Lamina wie bei höheren Zellen eine Stabilisierungs- und Stützfunktion für die Kernhülle hat, so erfordert die Einschnürung der Kernhülle bei der Karyokinese der geschlossenen Mitose ein Aufweichen der Kernhülle, zumindest im Bereich der Äquatorialebene wo die Einschnürung erfolgt (Moens, 1976). Entsprechend der Disassemblierung der Lamina beim Abbau der nukleären Lamina in höher organisierten Zellen, war daher auch bei *Dictyostelium* eine erhöhte Mobilität von putativen Strukturproteinen der nukleären Lamina wie NE81 zumindest im Bereich der Konstriktionszone der Kernhülle zu erwarten. Tatsächlich konnte die nach der fluoreszenzmikroskopischen Analyse der Kernhülle mitotischer Zellen postulierte wechselnde Mobilität des NE81 im Verlauf des Zellzyklus, anhand von FRAP-Versuchen bestätigt werden. Während die GFP-NE81 Zellen in der Interphase und in der späten Mitose keine Mobilität zeigten (**Abbildung 20, Abbildung 22**), war diese im Gegensatz dazu in der frühen Mitose vorhanden (**Abbildung 21**). Die erhaltenen Ergebnisse geben somit einen weiteren entscheidenden Hinweis darauf, dass NE81 sich ähnlich wie ein Lamin verhält. Auch in Säugerzellen wurde anhand von FRAP-Untersuchungen demonstriert, dass Lamina in der Interphase u. a. eine strukturgebende Funktion übernehmen und keine Bewegung in der Kernhülle zeigen. Im Gegensatz dazu zeigen sie in Zellen mit dem Eintritt in die Mitose eine erhöhte Dynamik, da die offene Mitose in Säugern einen kompletten Abbau und Wiederaufbau der Kernhülle erfordert (Wilson und Foisner, 2010; Broers *et al.*, 1999; De Souza und Osmani, 2007; Moir *et al.*, 2000).

Die gegensätzliche Dynamik des GFP-NE81 Fusionsproteins in der Interphase und Mitose lassen die Schlussfolgerung zu, dass eine Regulation des Proteinverhaltens vorhanden ist. Diese könnte in Form einer Phosphorylierung stattfinden, da auch das Verhalten von Laminen innerhalb des Zellzyklus durch die CDK1-abhängige Phosphorylierung erfolgt. Die Vermutung, dass die Regulierung des NE81 durch die CDK1 erfolgen könnte, wird durch zwei Argumente gestützt. Erstens geht dem vorderen Bereich der Primärstruktur der zentralen „Rod“-Domäne eine Konsensussequenz für die CDK1-Phosphorylierung voran, die an exakt korrespondierender Position auch für nukleäre Lamine in Metazoen typisch ist (Melcer *et al.*, 2007; Nigg, 1992). Eine in diesem Bereich gesetzte Punktmutation, die eine fehlende Phosphorylierung des GFP-NE81 S122A durch die CDK1 simulieren sollte, führte zu einer veränderten Lokalisation des generierten Fusionsproteins. Dieses reichte sich zusammen mit dem endogenen Protein hauptsächlich im pericentrosomalen Bereich an und resultierte mutmaßlich aus der fehlenden Regulation durch die CDK1. Als laminartiges Protein sollte NE81 auch an der Verbindung zwischen Centrosom und Zellkern beteiligt sein. Nachdem die Centrosom-Zellkernverbindung während des gesamten Zellzyklus persistiert, könnte die Clusterung von GFP-NE81 S122A als Folge einer fehlenden Assemblierung und Disassemblierung innerhalb des Zellzyklus gerade in der pericentrosomalen Region entstanden sein. Die veränderte Lokalisation des endogenen NE81 ergab sich dabei vermutlich aus einer Co-Assemblierung des Proteins mit dem GFP-NE81 S122A. Der zweite Grund für die Vermutung, dass die Steuerung des NE81 durch die CDK1 erfolgen könnte, folgt aus der Arbeit von Wang *et al.*. In dieser konnte gezeigt werden, dass die höchste Aktivität der CDK1 beim Übergang der G2/M-Phase und Metaphase/Anaphase vorhanden ist, was sich mit dem Zeitfenster der Mobilität des GFP-NE81 Fusionsproteins in den FRAP-Versuchen deckt (Wheatley *et al.*, 1997).

4.1.5 NE81 Nullmutanten bekräftigen den laminähnlichen Phänotyp

Für einen Beweis, dass NE81 innerhalb der Zelle Funktionen übernimmt, die denen von nukleären Intermediärfilamenten sehr ähnlich sind, wurden NE81 Nullmutanten erzeugt. Die Phänotypen, die durch die fehlende NE81-Expression auftraten, reichten von numerischen Differenzen bei der Anzahl von Centrosomen/Zellkernen, bis zu stark kondensiertem Chromatin, missgebildeten Nuklei und einem erhöhten Abstand zwischen der Centrosom-Zellkernverbindung. Es war somit ersichtlich, dass NE81 und seine möglichen Bindungspartner einen Einfluss auf die Position und die Gestalt des Zellkerns haben. Auch Lamine spielen eine Rolle bei der Ausprägung der Form des Nukleus, was durch abnorme

Kernformen in Laminopathien deutlich wird (Capell *et al.*, 2005; Mattout *et al.*, 2006; Polychronidou *et al.*, 2010).

Die bei den *Dictyostelium* NE81 Nullmutanten beobachteten Phänotypen, lassen sich einerseits auf eine mögliche Beteiligung von NE81 bei der oben diskutierten Verbindung zwischen Cyto- und Nukleoskelett zurückführen, andererseits deuten sie auf eine Funktion von NE81 bei der Chromatinorganisation hin, wie sie auch für Lamine beschrieben worden ist (Hübner *et al.*, 2006). Bei Letzterer erfolgt die Interaktion mit Chromatin direkt über die zentralen und globulären Domänen, oder indirekt über die Interaktion mit Histonen oder BAF (Dechat *et al.*, 2009; Vlcek und Foisner, 2007). Vergleichbare Interaktionen von NE81 werden z. Zt. im Labor mit Hilfe von ChIP-Assays überprüft.

4.1.6 Die NE81 Überexpression legt eine Beteiligung des NE81 an der Membran- und Chromatinorganisation offen

In Säugern, Amphibien und Fischzellen resultiert die Überexpression von B-Typ Laminen in einem starken Wachstum der Kernmembran mit einer Auslappung (Lobulierung) der Kernhülle und einer veränderten Gestalt des Zellkerns (Prüfert *et al.*, 2004). Ein ähnliches Phänomen konnte auch bei *Dictyostelium*, durch die Expression eines GFP-NE81 Fusionsproteins zusätzlich zum endogenen Protein, beobachtet werden (**Abbildung 15**). Unmittelbar nach der Transformation war die Kernhülle stark vergrößert und lobuliert, so dass eine klare Assoziation zum Centrosom nicht mehr zu erkennen war. Auch der unmittelbare Kontakt der Kernhülle zum Chromatin war abgeschwächt bzw. gar nicht mehr vorhanden. Damit ging ein stark fehlerhaft organisiertes Chromatin einher, das in diesen Zellen sehr großflächig verteilt über die gesamte Zellmitte und teilweise auch außerhalb der Kernhüllenmarkierung mit GFP-NE81 vorlag. Das unzureichend organisierte Chromatin, hervorgerufen durch die starke Überexpression des GFP-NE81, könnte einen Einfluss auf die Genexpression und somit auf die Vitalität der Zellen gehabt haben. Dies könnte auch erklären, warum die Zellen nur sehr langsam wuchsen. Auch in attenuierten GFP-NE81 Zellen war die Überexpression noch so stark, dass ein deutlicher Abstand zwischen Chromatin und Kernhülle zu erkennen war. Dies weist darauf hin, dass NE81 eine Rolle bei der Assoziation von Chromatin mit der Kernmembran spielt und somit eine weitere zu den Laminen analoge Funktion übernimmt.

4.1.7 Überprüfung der Prozessierungsmaschinerie des NE81 in *Dictyostelium*

An der Prozessierung von CaaX-Box Proteinen, im Laufe derer sie mit einem hydrophoben Membrananker versehen werden, sind unterschiedliche Enzyme beteiligt, deren Gene auch im

Diskussion

Dictyostelium Genom nachgewiesen werden konnten. Da NE81 als potentiell laminartig gehandelt wird, war es wichtig zu testen, ob die Laminprozessierungsmaschinerie auch an diesem Protein angreift. Um diese Fragestellung zu überprüfen, wurde mit dem Farnesyltransferaseinhibitor FTI-277 gearbeitet, der das Anbringen eines Farnesylrestes an die CaaX-Box unterbinden sollte. Trotz unterschiedlicher Wirkstoffkonzentrationen und Inkubationszeiten konnten jedoch keinerlei offensichtlichen Veränderungen bezüglich der intranukleären Lokalisation des NE81 beobachtet werden. Dies könnte mehrere Gründe haben: Erstens: Der Farnesyltransferaseinhibitor konnte auf die in *Dictyostelium* exprimierte Farnesyltransferase keinen Einfluss ausüben, da diese im Vergleich zu Metazoen eine andere Faltung zeigte und somit keinen Angriffspunkt bot. Zweitens: Die verwendete Substanz wurde durch die Amöbe in Vesikel transportiert und konnte so ihre Wirksamkeit nicht entfalten, da die Zielstrukturen nicht erreicht wurden. Ein solcher Vorgang ist bei *Dictyostelium* auch schon für eine Reihe von DNA Fluoreszenzfarbstoffen, wie z. B. DRAQ5 und Hoechst 33342 beobachtet worden (persönliche Korrespondenz Prof. Gräf). Drittens: In menschlichen Coloncancerzellen (DLD-1) konnte gezeigt werden, dass die Anwendung von Farnesyltransferaseinhibitoren eine Geranylgeranylierung der CaaX-Box enthaltenden Proteine in Gang setzte und zum Anhängen eines hydrophoben Lipidankers im Bereich der CaaX-Box führte. Die Prozessierungsmaschinerie wurde somit nicht unterbrochen und es erfolgte die korrekte Lokalisation der Proteine. Fakt ist, dass Geranylgeranyltransferasen als Erkennungsmotiv die CaaX-Sequenz benötigen, an deren Ende jedoch statt Serin, Methionin, Alanin oder Glutamin (Farnesyltransferase) ein Leucin vorhanden sein muss (Casey und Seabra, 1996) Die CaaX-Sequenz des NE81 enthält an letzter Stelle ein Methionin und ist somit eher für die Farnesyltransferase prädestiniert. Andererseits ist für *Dictyostelium* bisher nicht beschrieben, in welchem Maße eine potenzielle Geranylgeranylierung in Abhängigkeit von der letzten Aminosäure der CaaX-Sequenz erfolgt. Geranylgeranyltransferasen funktionieren ähnlich wie Farnesyltransferasen als Heterodimer. Die α - Untereinheit ($\alpha_{F/GGI}$) teilen sie mit der Farnesyltransferase, benutzen aber eine andere β - Untereinheit (β_{GGI}), die auch im *Dictyostelium* Genom kodiert wird (pggt1b). Da die Funktion der Geranylgeranyltransferase auch für andere Prozesse innerhalb der Zelle benötigt wird, wie Signaltransduktion und die Membranverankerung von Proteinen, könnte sich das Vorhandensein der nötigen Untereinheiten des Enzyms auch damit erklären lassen. Die vierte Möglichkeit wurde in den Versuchen aufgezeigt, die durch Grosshans *et al.* 2010 durchgeführt wurden. Die Arbeitsgruppe konnte im Rahmen der Anwendung von Farnesyltransferaseinhibitoren in *Drosophila* zeigen, dass diese keinen sichtbaren Effekt auf

die Lokalisation des Dm0-Lamins zeigten. Parallel bewiesen sie durch FRAP Versuche, dass Lamine eine nur sehr geringe Mobilität in der Kernhülle besitzen (Polychronidou *et al.*, 2010). Das heißt, dass sich der Effekt der Farnesyltransferaseinhibitoren gar nicht unmittelbar auf den Zellkern auswirken kann, da eine fehlende Farnesylierung ja nur bei Proteinen auftritt, die nach der Gabe des Inhibitors synthetisiert werden. Im Gegensatz dazu hat die Anwendung von Farnesyltransferaseinhibitoren in NIH 3T3-Zellen (Mäusefibroblasten) eine veränderte Lokalisation des Prälamins A, in Form von Proteinaggregaten innerhalb des Nukleus zur Folge (Barrowman *et al.*, 2008).

Diese kontroversen Ergebnisse können auftreten, da die Untersuchung der Farnesyltransferaseinhibitoren an unterschiedlichen Laminen und in unterschiedlichen experimentellen Systemen erfolgte. So könnte zum Beispiel die zeitliche Dauer des Kernhüllenabbaus im Rahmen der Mitose bzw. der unvollständige Kernhüllenabbau in *Drosophila* S2 Zellen, verglichen mit der offenen Mitose in Säugern einen Einfluss auf die Resultate gehabt haben.

Eine weitere Möglichkeit zu untersuchen, in welchem Umfang die Prozessierung von Laminen auch beim NE81 Anwendung findet, bestand in der Anwendung von Zmpste24-Inhibitoren. Diese werden auch in der AIDS Therapie zur Hemmung der HIV Aspartylprotease eingesetzt (Goulbourne und Vaux, 2010). Auch hier konnte trotz verschiedener Substanzen, unterschiedlicher Konzentrationen und differierender Inkubationszeiten kein Effekt auf die Lokalisation und das Verhalten des NE81 in der Mitose beobachtet werden, was sich vermutlich auch hier mit einem anderen gefalteten Zmpste24, bzw. mit einer möglichen Sequestrierung der Substanzen in Vesikeln erklären lässt. Somit kann abschließend gesagt werden, dass der Gebrauch des Farnesyltransferaseinhibitors 277 und die Anwendung der drei Zmpste24-Inhibitoren keine Erkenntnisse bezüglich der posttranslationalen Modifikation des NE81 geliefert haben, aber in keiner Weise ausgeschlossen werden kann, dass diese Modifikationen bei *Dictyostelium* NE81 tatsächlich stattfinden. Um dies zu klären müßte die Wirksamkeit der Inhibitoren an den entsprechenden gereinigten *Dictyostelium* Enzymen getestet werden, was im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr möglich war.

Ein weiterer Aspekt zur Überprüfung der posttranslationalen Modifikation des NE81 durch potentielle Laminprozessierungsenzyme, erfolgte durch die Verwendung eines ICMT *knock out* Stammes, der durch Prof. Edward C. Cox zur Verfügung gestellt wurde. Die ICMT-Nullmutante zeigte durch die Deletion der Isoprenylcysteinmethyltransferase einen interessanten Phänotyp, der sich unter anderem durch eine Fehllokalisierung verschiedener

Proteine wie z.B. Ras GTPasen, einer anormalen Fruchtkörperbildung und einer fehlender Sporenbildung auszeichnete (Chen *et al.*, 2007). Die Überprüfung des Effekts einer möglicherweise nicht durchgeführten Methylierung des C-terminalen Cysteins im NE81 durch die ICMT in *Dictyostelium*, erfolgte durch indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie. In den ICMT Nullmutanten war NE81 zwar weiterhin im Bereich der Kernhülle vorhanden, aber im Vergleich zu den Zellkernen in Wildtypzellen weniger homogen verteilt (**Abbildung 38**). Die Verteilung im Bereich des Zellkerns erschien fleckenhaft. Zusätzlich lokalisierte ein Teil des NE81 in Form von Proteinaggregaten im Bereich des Cytosols. Bereits in embryonalen Mäusefibroblasten konnte gezeigt werden, dass die Defizienz der ICMT zu einer veränderten Lokalisation von CaaX-Box exprimierenden Proteinen wie Ras GTPasen führte. Statt einer membranständigen Lokalisation wurden diese zusätzlich im Cytosol lokalisiert (Michaelson *et al.*, 2005). Es konnte somit der Nachweis erbracht werden, dass die Isoprenylcysteinmethyltransferase in *Dictyostelium* eine Rolle bei der posttranslationalen Modifikation des NE81 übernimmt. Damit wurde ein wichtiger Hinweis erbracht, dass NE81 laminähnlich prozessiert werden könnte. Dies ist auch ein Hinweis darauf, dass die hierarchisch vor der Methylierung stattfindenden Modifikationsprozesse (Farnesylierung, aaX-Abspaltung) bei NE81 tatsächlich stattfinden und die getesteten Inhibitoren bei *Dictyostelium* aus den bereits genannten möglichen Gründen nicht wirksam sind.

4.2 Diskussion CP75

Das in dieser Arbeit näher charakterisierte Protein CP75 wurde im Rahmen einer Suche nach neuen Bestandteilen des *Dictyostelium* Centrosoms, als eines unter mehr als 34 möglichen centrosomalen Kandidatenproteine identifiziert (Reinders *et al.*, 2006). CP75 weist keinerlei bekannte Sequenzmotive auf und zeichnete sich durch die Existenz einer *coiled-coil* Region und einem geringen Expressionslevel aus, zwei Merkmale, die häufig bei centrosomalen Bestandteilen in anderen Organismen vorkommen (Wigge *et al.*, 1998; Andersen *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2004; Broadhead *et al.*, 2006; Reinders *et al.*, 2006; Bettencourt-Dias und Glover, 2007; Kilburn *et al.*, 2007; Keller und Marshall, 2008; Sakamoto *et al.*, 2008).

Mit Hilfe eines N-terminalen GFP-CP75 Fusionsproteins und Fluoreszenzmikroskopie wurde nachgewiesen, dass es sich bei CP75 um eine Komponente der *Core* Struktur des *Dictyostelium* Centrosoms handelt (**Abbildung 42**) (Schulz *et al.*, 2009). Auch das Verhalten von CP75 in der Mitose lässt Rückschlüsse auf eine genaue Zuordnung des Proteins zur *Core* Struktur des *Dictyostelium* Centrosoms zu. GFP-CP75 war mit dem Eintritt in die Pro/Prometaphase in Form von zwei Punkten im Bereich des Centrosoms sichtbar und mit

dem Übergang in die Metaphase vollständig verschwunden. Erst im Laufe der Telophase trat das GFP-Fusionsprotein wieder in Erscheinung (**Abbildung 46**). Dieses Verhalten deckt sich mit dem Auflösen und dem erneuten Erscheinen der mittleren *Core* Struktur im Rahmen der Centrosomenduplikation, so dass CP75 damit dieser innersten Lage zugeordnet werden kann. Die Existenz des GFP-CP75 in Form von zwei Punkten in der Prometaphase, lässt sich vermutlich damit erklären, dass Teile der zentralen Lage der *Core* Struktur noch mit den beiden äußeren, sich voneinander trennenden Lagen assoziiert sind. Das wechselnde Verhalten des GFP-CP75 Fusionsproteins in der Mitose, das sich durch die Existenz des Proteins am Centrosom, bzw. der Abwesenheit vom Zellorganell, verbunden mit einer erhöhten cytoplasmatischen Fluoreszenz äußert, scheint mit einer veränderten Affinität des Proteins zum Centrosom verbunden zu sein. Naheliegender wäre es hier, an eine Phosphorylierung zu denken, welche möglicherweise die Löslichkeit des Proteins beeinflusst. Dies könnte z.B. durch die einzige Polokinase in *Dictyostelium*, Plk, oder DdNek2, zwei Kinasen, die beide zum entsprechenden Zeitpunkt am Centrosom nachgewiesen werden konnten, erfolgen (Schulz *et al.*, 2009; Gräf, 2002).

Um weitere Einblicke in die komplexe Funktionsweise des *Dictyostelium* Centrosoms zu bekommen, war es wichtig, nach potentiellen Interaktionspartnern des CP75 zu suchen. Im Rahmen der Charakterisierung neuer Proteine im Centrosom von *Dictyostelium*, konnten drei weitere Proteine als echte, centrosomale Bestandteile der *Core* Struktur zugeordnet werden: CP39, CP55 und CP91. Diese stellen gute Kandidaten für mögliche Interaktoren des CP75 dar (Schulz *et al.*, 2009). Der Test auf eine direkte Proteininteraktion erfolgte mit dem "Yeast two hybrid" Assay. Dieser zeigte, dass innerhalb dieser experimentellen Methode weder eine Interaktion zwischen dem CP75/CP55 noch zwischen dem CP75/CP91 bestand. Jedoch konnte eine direkte Verbindung mit dem CP39 nachgewiesen werden. Da CP39 ein ähnliches Mitoseverhalten aufzeigte wie CP75 und somit vermutlich auch der zentralen *Core* Struktur zugeordnet werden kann, stellt es einen realistischen Interaktor dar. Die Anwendung des "Yeast two hybrid" Assay birgt aber auch das Risiko falsch positiver Ergebnisse. Das Zustandekommen dieser erklärt sich durch mehrere Faktoren. Bei diesem experimentellen System erfolgt die Untersuchung einer potentiellen Interaktion zwischen Proteinen, die innerhalb des Hefezellkerns überexprimiert vorliegen. Die alleinige Tatsache der Überexpression birgt das Risiko falscher Bindungsaffinitäten. Ein weiterer Punkt ist, dass die Untersuchung potentieller Interaktionen nur im Zellkern der Hefen erfolgen kann. Somit besteht die Möglichkeit, dass sich Proteine in den Hefen anders falten, als in den Organismen in denen sie normalerweise zu finden sind. Darüber hinaus verfügen Hefen über

Diskussion

Proteinmodifikationen, die sich zu denen in Eukaryoten unterscheiden, bzw. es fehlen posttranslationale Modifikationen (Deane *et al.*, 2002; Koegl und Uetz, 2007). Die erzielten Ergebnisse müssen somit durch weitere Interaktionsstudien, wie Co-Immunpräzipitationen und Affinitätschromatographien verifiziert werden. Dennoch spricht die Tatsache, dass CP39 ein ähnliches Mitoseverhalten aufzeigt wie CP75 und ebenfalls der zentralen *Core* Struktur zugeordnet werden kann, stark für eine realistische Interaktion der beiden Proteine.

Mit der Verwendung von *BlastP* wurde der Versuch unternommen, nach Orthologen des CP75 in anderen Organismen zu suchen. Die Suche war erfolglos und auch die anderen neuen *Core* Komponenten des *Dictostelium* Centrosoms CP91, CP55 und CP39 konnten bisher keinen Proteinen aus anderen Organismen zugeordnet werden. Auch der Phänotyp der Überexpression des GFP-CP75 liefert keine Hinweise auf mögliche Orthologe in anderen Organismen. Das Verhalten des GFP-CP75 in der Mitose jedoch, könnte ein Hinweis auf mögliche funktionale Homologe sein. Das Erscheinen des Proteins in der Telophase, deckt sich mit dem Wiederaufbau der Schicht nach der Duplikation des Zellorganells. Dies lässt sich in gewisser Weise mit dem Prozess der Centriolenduplikation in Metazoen vergleichen. Centriolen stellen zylindrische Strukturen dar, die zusammen mit einer pericentriolären Matrix das Centrosom in tierischen Zellen bilden. Die Duplikation der Centriolen wird initiiert durch SPD-2 in *C. elegans*, bzw. Cep192 beim Menschen, einem Protein das während des gesamten Zellzyklus mit dem Centrosom assoziiert ist. Dieses ist notwendig für die centrosomale Rekrutierung der ZYG-1 Kinase, die auch funktionale Analoge im Menschen (Plk4) und in *Drosophila* (Sak) besitzt und unabkömmlich für die Centriolenduplikation ist (Bettencourt-Dias und Carvalho-Santos, 2008; Kleylein-Sohn *et al.*, 2007; Peel *et al.*, 2007; Bettencourt-Dias *et al.*, 2005).

Die Aktivierung der ZYG-1 Kinase resultiert in *C. elegans* in einer sequentiellen Rekrutierung von drei *coiled-coil* Proteinen, SAS-5, SAS-6, SAS-4, die für den Aufbau der neuen Centriolen im Rahmen der Centriolenduplikation notwendig sind. Dabei besitzen ZYG-1, SAS-5 und SAS-6 eine elementare Bedeutung bei der Assemblierung des zentralen Centriolentubulus, während SAS-4 an der Formation der äußeren Centriolenwand beteiligt ist (Leidel *et al.*, 2005; Delattre *et al.*, 2006; Pelletier *et al.*, 2006; Dammermann *et al.*, 2008). Bis auf SAS-5 konnten alle Proteine in Form von Orthologen im Menschen und bei *Drosophila* nachgewiesen werden, so dass davon ausgegangen werden kann, dass die Centriolenformation auch in sehr unterschiedlichen Organismen konserviert ist (Loncarek *et al.*, 2007; Peel *et al.*, 2007; Nigg, 2007). Selbst für *Chlamydomonas* wurde für die Verdopplung des Centriols im Axonem ein ähnlicher Vorgang beschrieben (Nakazawa *et al.*, 2007).

Diskussion

Bei *Dictyostelium* konnten mit Cep192 und Plk, der einzigen Polokinase der Amöbe, vor kurzem zwei mögliche Orthologe der Centriolenduplikation gefunden werden. Beide sind während des gesamten Zellzyklus am Centrosom vorhanden und Plk reichert sich zudem in der Metaphase im Bereich der Spindelpole verstärkt an (Schulz *et al.*, 2009). Somit wäre es möglich, dass sie am Wiederaufbau der mittleren *Core* Struktur beteiligt sind.

Mit der Verwendung von *BlastP* konnten keine Homologie zwischen CP75 und den SAS-Proteinen gefunden werden (Schulz *et al.*, 2009). Trotzdem scheint es möglich, dass CP75 eine ähnliche Funktion wie eines der SAS-Proteine innerhalb der Duplikation des Centrosoms in *Dictyostelium* übernimmt. Es fällt dabei eine Ähnlichkeit zum SAS-6 Protein auf, da dieses wie CP75 im Rahmen von FRAP-Versuchen als struktureller Bestandteil der Centriole bestätigt werden konnte. CP75 scheint folglich nicht mobil und somit fest ins Centrosom integriert zu sein.

Die Lokalisation des CP75 in der Prometaphase in zwei nahe beieinander liegenden Punkten und das erst recht späte Verschwinden mit dem Eintritt in die Metaphase, lässt die Spekulation zu, dass das Protein sich zwar in der mittleren *Core*-Schicht befindet, aber mit den beiden äußeren *Core*-Lagen verbunden ist. Es wäre somit eines der ersten Proteine, die bei der Neubildung der zentralen Schicht wieder erscheinen müsste, was wiederum mit der frühen Rekrutierung von SAS6 vergleichbar wäre. CP39 hingegen, von dem eine Interaktion mit CP75 im "*Yeast-Two-Hybrid*"-Versuch gezeigt werden konnte, ist bereits in der Prometaphase nicht mehr nachweisbar (Meyer, unveröffentlicht). Es ist daher denkbar, dass CP39 nicht direkt, sondern nur indirekt über CP75 mit der äußeren Schicht der *Core* Struktur verbunden ist, folglich bei der Neubildung der mittleren *Core* Schicht durch CP75 wieder an das Centrosom rekrutiert wird. Auch CP91, welches auch in der Mitose vom Centrosom verschwindet, könnte in diesem Prozess beteiligt sein (Schulz *et al.*, 2009). Eine Abfolge des Wiedererscheinens der Proteine in der Telophase könnte man durch die Markierung mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen beobachten. Auch müsste man nach weiteren Interaktionen suchen, z.B. ob Plk CP75 bindet und eventuell phosphoryliert, oder ob CP39 und CP91 miteinander interagieren. Hierdurch könnten sich weitere Hinweise ergeben, ob der Wiederaufbau der zentralen *Core*-Schicht mit der Centriolenduplikation verglichen werden kann, wobei das CP75 dabei die Rolle von SAS6 übernehmen würde.

4.3 Ausblick

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass innerhalb dieser Arbeit damit begonnen wurde, die ersten strukturellen und funktionalen Charakterisierungen des NE81, im Hinblick auf eine mögliche Ähnlichkeit zu Laminen, vorzunehmen. Zahlreiche Ergebnisse die im Rahmen dieser Arbeit gewonnen wurden, bestätigten die Hypothese der Laminartigkeit des NE81. Mit der Entdeckung eines solchen Proteins in *Dictyostelium discoideum*, einem genetisch leicht manipulier- und handhabbaren Organismus, der auf der Schwelle zur Multizellularität steht, ist ein sehr wichtiger Schritt gelungen, die Amöbe auch als Modellorganismus für die Erforschung der molekularen Grundlagen von Laminopathien zu etablieren. Die erfolgreiche Anwendung von *Dictyostelium* als einfachen Modellorganismus für die Erforschung von humanen Erkrankungen wie Lissencephalie, konnte schon durch Williams *et al.* gezeigt werden (Williams *et al.*, 2006).

Auch wenn nicht alle Merkmale von Laminen auf das NE81 zutreffen, sprechen mehrere funktionelle Argumente dafür, dass *Dictyostelium* ein Protein mit der Funktion von Laminen besitzen sollte. Amöben benötigen wie exoskelettlose Metazoen auch, Proteine zur mechanischen Stabilisierung der Zelle. Bei vielen Pflanzen und einzelligen Organismen wie Trypanosomen, übernehmen filamentöse *coiled-coil* Proteine die Funktionen von Laminen innerhalb der Zelle. All diese Proteine sind in der nukleären Peripherie lokalisiert und sind vom evolutionären Standpunkt her nicht mit den Laminen verwandt. In Organismen wie Pilzen und Protisten, in denen bis heute keine laminähnlichen Proteine nachgewiesen werden konnte, sind Strukturen wie Pellicula oder Chitin vorhanden, die den Membranen eine erhöhte mechanische Festigkeit verleihen (Lenardon *et al.*, 2010). In *Dictyostelium* konnten solche Zellbestandteile bisher nicht nachgewiesen werden. Trotzdem ist der Schleimpilz *Dictyostelium discoideum* in der Lage, äußeren mechanischen Einflüssen zu widerstehen. Es liegt also nahe, dass *Dictyostelium discoideum* Proteine besitzt, die eine laminähnliche Funktion übernehmen. NE81 ist ein hervorragender Kandidat für ein solches Protein. Zukünftige Arbeiten werden sich mit der Erforschung potentieller Interaktoren wie Sun1, bzw. mit der Analyse der posttranslationalen Prozessierung beschäftigen, um weitere Belege für eine Ähnlichkeit von NE81 zu Laminen aufzuzeigen. Weiterhin werden Versuche zum Polymerisationsverhalten des NE81 im Vordergrund stehen, da die Ergebnisse in der Arbeit stark darauf hinweisen, dass NE81 ähnlich wie Lamine, eine netzwerkartige Struktur unter der Kernmembran ausbildet.

Ausblick

Mit der Identifizierung von CP75 als echten, centrosomalen Bestandteil der relativ unerforschten *Core* Struktur des *Dictyostelium* Genoms, wurde ein Fortschritt bei der Aufklärung der Zusammensetzung des Centrosoms in der sozialen Amöbe unternommen. Weitere Arbeiten, wie die Herstellung eines CP75 Antikörpers und die Suche nach Interaktionspartner werden folgen, um ein besseres Verständnis über die Funktionsweise des Centrosom in *Dictyostelium* zu bekommen.

5 Referenzen

Aebi, U., J. Cohn, L. Buhle und L. Gerace (1986). "The nuclear lamina is a meshwork of intermediate-type filaments." Nature **323**(6088): 560-4.

Alieva, I. B. und R. E. Uzbekov (2008). "The centrosome is a polyfunctional multiprotein cell complex." Biochemistry (Mosc) **73**(6): 626-43.

Alvarez-Curto, E., K. E. Weening und P. Schaap (2007). "Pharmacological profiling of the Dictyostelium adenylate cyclases ACA, ACB and ACG." Biochem J **401**(1): 309-16.

Andersen, J. S., C. J. Wilkinson, T. Mayor, P. Mortensen, E. A. Nigg und M. Mann (2003). "Proteomic characterization of the human centrosome by protein correlation profiling." Nature **426**(6966): 570-4.

Andres, V. und J. M. Gonzalez (2009). "Role of A-type lamins in signaling, transcription, and chromatin organization." J Cell Biol **187**(7): 945-57.

Annesley, S. J. und P. R. Fisher (2009). "Dictyostelium discoideum--a model for many reasons." Mol Cell Biochem **329**(1-2): 73-91.

Barrowman, J., C. Hamblet, C. M. George und S. Michaelis (2008). "Analysis of prelamin A biogenesis reveals the nucleus to be a CaaX processing compartment." Mol Biol Cell **19**(12): 5398-408.

Beck, L. A., T. J. Hosick und M. Sinensky (1988). "Incorporation of a product of mevalonic acid metabolism into proteins of Chinese hamster ovary cell nuclei." J Cell Biol **107**(4): 1307-16.

Beck, L. A., T. J. Hosick und M. Sinensky (1990). "Isoprenylation is required for the processing of the lamin A precursor." J Cell Biol **110**(5): 1489-99.

Benavente, R. und G. Krohne (1986). "Involvement of nuclear lamins in postmitotic reorganization of chromatin as demonstrated by microinjection of lamin antibodies." J Cell Biol **103**(5): 1847-54.

Bettencourt-Dias, M. und Z. Carvalho-Santos (2008). "Double life of centrioles: CP110 in the spotlight." Trends Cell Biol **18**(1): 8-11.

Bettencourt-Dias, M. und D. M. Glover (2007). "Centrosome biogenesis and function: centrosomics brings new understanding." Nat Rev Mol Cell Biol **8**(6): 451-63.

Bettencourt-Dias, M., A. Rodrigues-Martins, L. Carpenter, M. Riparbelli, L. Lehmann, M. K. Gatt, N. Carmo, F. Balloux, G. Callaini und D. M. Glover (2005). "SAK/PLK4 is required for centriole duplication and flagella development." Curr Biol **15**(24): 2199-207.

Boban, M., J. Braun und R. Foisner (2010). "Lamins: 'structure goes cycling'." Biochem Soc Trans **38**(Pt 1): 301-6.

Boyartchuk, V. L., M. N. Ashby und J. Rine (1997). "Modulation of Ras and a-factor function by carboxyl-terminal proteolysis." Science **275**(5307): 1796-800.

- Brandt, A., F. Papagiannouli, N. Wagner, M. Wilsch-Brauninger, M. Braun, E. E. Furlong, S. Loserth, C. Wenzl, F. Pilot, N. Vogt, et al. (2006).** "Developmental control of nuclear size and shape by Kugelkern and Kurzkern." *Curr Biol* **16**(6): 543-52.
- Brinkley, B. R. (2001).** "Managing the centrosome numbers game: from chaos to stability in cancer cell division." *Trends Cell Biol* **11**(1): 18-21.
- Broadhead, R., H. R. Dawe, H. Farr, S. Griffiths, S. R. Hart, N. Portman, M. K. Shaw, M. L. Ginger, S. J. Gaskell, P. G. McKean, et al. (2006).** "Flagellar motility is required for the viability of the bloodstream trypanosome." *Nature* **440**(7081): 224-7.
- Broers, J. L., B. M. Machiels, G. J. van Eys, H. J. Kuijpers, E. M. Manders, R. van Driel und F. C. Ramaekers (1999).** "Dynamics of the nuclear lamina as monitored by GFP-tagged A-type lamins." *J Cell Sci* **112** (Pt 20): 3463-75.
- Broers, J. L., E. A. Peeters, H. J. Kuijpers, J. Endert, C. V. Bouten, C. W. Oomens, F. P. Baaijens und F. C. Ramaekers (2004).** "Decreased mechanical stiffness in LMNA^{-/-} cells is caused by defective nucleo-cytoskeletal integrity: implications for the development of laminopathies." *Hum Mol Genet* **13**(21): 2567-80.
- Byers, B. und L. Goetsch (1975).** "Behavior of spindles and spindle plaques in the cell cycle and conjugation of *Saccharomyces cerevisiae*." *J Bacteriol* **124**(1): 511-23.
- Capell, B. C., M. R. Erdos, J. P. Madigan, J. J. Fiordalisi, R. Varga, K. N. Conneely, L. B. Gordon, C. J. Der, A. D. Cox und F. S. Collins (2005).** "Inhibiting farnesylation of progerin prevents the characteristic nuclear blebbing of Hutchinson-Gilford progeria syndrome." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(36): 12879-84.
- Casey, P. J. und M. C. Seabra (1996).** "Protein prenyltransferases." *J Biol Chem* **271**(10): 5289-92.
- Charette, S. J. und P. Cosson (2004).** "Preparation of genomic DNA from *Dictyostelium discoideum* for PCR analysis." *Biotechniques* **36**(4): 574-5.
- Chelsky, D., J. F. Olson und D. E. Koshland, Jr. (1987).** "Cell cycle-dependent methyl esterification of lamin B." *J Biol Chem* **262**(9): 4303-9.
- Chelsky, D., C. Sobotka und C. L. O'Neill (1989).** "Lamin B methylation and assembly into the nuclear envelope." *J Biol Chem* **264**(13): 7637-43.
- Chen, Y., K. J. McQuade, X. J. Guan, P. A. Thomason, M. S. Wert, J. B. Stock und E. C. Cox (2007).** "Isoprenylcysteine carboxy methylation is essential for development in *Dictyostelium discoideum*." *Mol Biol Cell* **18**(10): 4106-18.
- Coffinier, C., S. E. Hudon, E. A. Farber, S. Y. Chang, C. A. Hrycyna, S. G. Young und L. G. Fong (2007).** "HIV protease inhibitors block the zinc metalloproteinase ZMPSTE24 and lead to an accumulation of prelamin A in cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(33): 13432-7.
- Corrigan, D. P., D. Kuszczak, A. E. Rusinol, D. P. Thewke, C. A. Hrycyna, S. Michaelis und M. S. Sinensky (2005).** "Prelamin A endoproteolytic processing in vitro by recombinant Zmpste24." *Biochem J* **387**(Pt 1): 129-38.

Referenzen

- Dahl, K. N., A. J. Ribeiro und J. Lammerding (2008).** "Nuclear shape, mechanics, and mechanotransduction." Circ Res **102**(11): 1307-18.
- Dammermann, A., P. S. Maddox, A. Desai und K. Oegema (2008).** "SAS-4 is recruited to a dynamic structure in newly forming centrioles that is stabilized by the gamma-tubulin-mediated addition of centriolar microtubules." J Cell Biol **180**(4): 771-85.
- Dauderer, C., M. Schliwa und R. Gräf (1999).** "Dictyostelium discoideum: a promising centrosome model system." Biol Cell **91**(4-5): 313-20.
- Davies, B. S., S. H. Yang, E. Farber, R. Lee, S. B. Buck, D. A. Andres, H. P. Spielmann, B. J. Agnew, F. Tamanoi, L. G. Fong, *et al.* (2009).** "Increasing the length of progerin's isoprenyl anchor does not worsen bone disease or survival in mice with Hutchinson-Gilford progeria syndrome." J Lipid Res **50**(1): 126-34.
- De Souza, C. P. und S. A. Osmani (2007).** "Mitosis, not just open or closed." Eukaryot Cell **6**(9): 1521-7.
- Deane, C. M., L. Salwinski, I. Xenarios und D. Eisenberg (2002).** "Protein interactions: two methods for assessment of the reliability of high throughput observations." Mol Cell Proteomics **1**(5): 349-56.
- Dechat, T., S. A. Adam und R. D. Goldman (2009).** "Nuclear lamins and chromatin: when structure meets function." Adv Enzyme Regul **49**(1): 157-66.
- Dechat, T., S. A. Adam, P. Taimen, T. Shimi und R. D. Goldman (2010).** "Nuclear lamins." Cold Spring Harb Perspect Biol **2**(11): a000547.
- Delattre, M., C. Canard und P. Gonczy (2006).** "Sequential protein recruitment in *C. elegans* centriole formation." Curr Biol **16**(18): 1844-9.
- Devreotes, P. (1989).** "Dictyostelium discoideum: a model system for cell-cell interactions in development." Science **245**(4922): 1054-8.
- Eichinger, L., J. A. Pachebat, G. Glockner, M. A. Rajandream, R. Sugang, M. Berriman, J. Song, R. Olsen, K. Szafranski, Q. Xu, *et al.* (2005).** "The genome of the social amoeba *Dictyostelium discoideum*." Nature **435**(7038): 43-57.
- Euteneuer, U., R. Graf, E. Kube-Granderath und M. Schliwa (1998).** "Dictyostelium gamma-tubulin: molecular characterization and ultrastructural localization." J Cell Sci **111** (Pt 3): 405-12.
- Faix, J., L. Kreppel, G. Shaulsky, M. Schleicher und A. R. Kimmel (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**(19): e143.
- Farnsworth, C. C., S. L. Wolda, M. H. Gelb und J. A. Glomset (1989).** "Human lamin B contains a farnesylated cysteine residue." J Biol Chem **264**(34): 20422-9.
- Foisner, R. (2003).** "Cell cycle dynamics of the nuclear envelope." ScientificWorldJournal **3**: 1-20.

Referenzen

- Foisner, R. und L. Gerace (1993).** "Integral membrane proteins of the nuclear envelope interact with lamins and chromosomes, and binding is modulated by mitotic phosphorylation." Cell **73**(7): 1267-79.
- Fortunato, A., J. E. Strassmann, L. Santorelli und D. C. Queller (2003).** "Co-occurrence in nature of different clones of the social amoeba, *Dictyostelium discoideum*." Mol Ecol **12**(4): 1031-8.
- Foster, C. R., S. A. Przyborski, R. G. Wilson und C. J. Hutchison** "Lamins as cancer biomarkers." Biochem Soc Trans **38**(Pt 1): 297-300.
- Fuchs, E. und K. Weber (1994).** "Intermediate filaments: structure, dynamics, function, and disease." Annu Rev Biochem **63**: 345-82.
- Fukui, Y., S. Yumura und T. K. Yumura (1987).** "Agar-overlay immunofluorescence: high-resolution studies of cytoskeletal components and their changes during chemotaxis." Methods Cell Biol **28**: 347-56.
- Gard, D. L., S. Hafezi, T. Zhang und S. J. Doxsey (1990).** "Centrosome duplication continues in cycloheximide-treated *Xenopus* blastulae in the absence of a detectable cell cycle." J Cell Biol **110**(6): 2033-42.
- Gerace, L. und G. Blobel (1980).** "The nuclear envelope lamina is reversibly depolymerized during mitosis." Cell **19**(1): 277-87.
- Gerisch, G., D. Hulser, D. Malchow und U. Wick (1975).** "Cell communication by periodic cyclic-AMP pulses." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **272**(915): 181-92.
- Goldman, A. E., G. Maul, P. M. Steinert, H. Y. Yang und R. D. Goldman (1986).** "Keratin-like proteins that coisolate with intermediate filaments of BHK-21 cells are nuclear lamins." Proc Natl Acad Sci U S A **83**(11): 3839-43.
- Goulbourne, C. N. und D. J. Vaux (2010).** "HIV protease inhibitors inhibit FACE1/ZMPSTE24: a mechanism for acquired lipodystrophy in patients on highly active antiretroviral therapy?" Biochem Soc Trans **38**(Pt 1): 292-6.
- 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**(Pt 9): 1919-29.
- Gräf, R., C. Dauderer und M. Schliwa (1999).** "Cell cycle-dependent localization of monoclonal antibodies raised against isolated *Dictyostelium* centrosomes." Biol Cell **91**(6): 471-7.
- Gräf, R., C. Dauderer und M. Schliwa (2000).** "*Dictyostelium* DdCP224 is a microtubule-associated protein and a permanent centrosomal resident involved in centrosome duplication." J Cell Sci **113** (Pt 10): 1747-58.
- Gräf, R., C. Dauderer und I. Schulz (2004).** "Molecular and functional analysis of the *dictyostelium* centrosome." Int Rev Cytol **241**: 155-202.
- Gräf, R., U. Euteneuer, T. H. Ho und M. Rehberg (2003).** "Regulated expression of the centrosomal protein DdCP224 affects microtubule dynamics and reveals mechanisms for the control of supernumerary centrosome number." Mol Biol Cell **14**(10): 4067-74.

- Gräf, R., U. Euteneuer, M. Ueda und M. Schliwa (1998).** "Isolation of nucleation-competent centrosomes from Dictyostelium discoideum." Eur J Cell Biol **76**(3): 167-75.
- Gruenbaum, Y., R. D. Goldman, R. Meyuhas, E. Mills, A. Margalit, A. Fridkin, Y. Dayani, M. Prokocimer und A. Enosh (2003).** "The nuclear lamina and its functions in the nucleus." Int Rev Cytol **226**: 1-62.
- Hanukoglu, I. und E. Fuchs (1982).** "The cDNA sequence of a human epidermal keratin: divergence of sequence but conservation of structure among intermediate filament proteins." Cell **31**(1): 243-52.
- Hanukoglu, I. und E. Fuchs (1983).** "The cDNA sequence of a Type II cytoskeletal keratin reveals constant and variable structural domains among keratins." Cell **33**(3): 915-24.
- Haque, F., D. Mazzeo, J. T. Patel, D. T. Smallwood, J. A. Ellis, C. M. Shanahan und S. Shackleton (2010).** "Mammalian SUN protein interaction networks at the inner nuclear membrane and their role in laminopathy disease processes." J Biol Chem **285**(5): 3487-98.
- Harborth, J., S. M. Elbashir, K. Bechert, T. Tuschl und K. Weber (2001).** "Identification of essential genes in cultured mammalian cells using small interfering RNAs." J Cell Sci **114**(Pt 24): 4557-65.
- Heald, R. und F. McKeon (1990).** "Mutations of phosphorylation sites in lamin A that prevent nuclear lamina disassembly in mitosis." Cell **61**(4): 579-89.
- Hegele, R. A., H. Cao, D. M. Liu, G. A. Costain, V. Charlton-Menys, N. W. Rodger und P. N. Durrington (2006).** "Sequencing of the reannotated LMNB2 gene reveals novel mutations in patients with acquired partial lipodystrophy." Am J Hum Genet **79**(2): 383-9.
- Herrmann, H., H. Bar, L. Kreplak, S. V. Strelkov und U. Aebi (2007).** "Intermediate filaments: from cell architecture to nanomechanics." Nat Rev Mol Cell Biol **8**(7): 562-73.
- Herrmann, H., S. V. Strelkov, P. Burkhard und U. Aebi (2009).** "Intermediate filaments: primary determinants of cell architecture and plasticity." J Clin Invest **119**(7): 1772-83.
- Hinchcliffe, E. H. und G. Sluder (2001).** "'It takes two to tango': understanding how centrosome duplication is regulated throughout the cell cycle." Genes Dev **15**(10): 1167-81.
- Hofemeister, H., K. Weber und R. Stick (2000).** "Association of prenylated proteins with the plasma membrane and the inner nuclear membrane is mediated by the same membrane-targeting motifs." Mol Biol Cell **11**(9): 3233-46.
- Holtz, D., R. A. Tanaka, J. Hartwig und F. McKeon (1989).** "The CaaX motif of lamin A functions in conjunction with the nuclear localization signal to target assembly to the nuclear envelope." Cell **59**(6): 969-77.
- Hudon, S. E., C. Coffinier, S. Michaelis, L. G. Fong, S. G. Young und C. A. Hrycyna (2008).** "HIV-protease inhibitors block the enzymatic activity of purified Ste24p." Biochem Biophys Res Commun **374**(2): 365-8.
- Hübner, S., J. E. Eam, K. M. Wagstaff und D. A. Jans (2006).** "Quantitative analysis of localization and nuclear aggregate formation induced by GFP-lamin A mutant proteins in living HeLa cells." J Cell Biochem **98**(4): 810-26.

Referenzen

- Izumi, M., O. A. Vaughan, C. J. Hutchison und D. M. Gilbert (2000).** "Head and/or CaaX domain deletions of lamin proteins disrupt preformed lamin A and C but not lamin B structure in mammalian cells." Mol Biol Cell **11**(12): 4323-37.
- Jahn, D., S. Schramm, R. Benavente und M. Alsheimer** "Dynamic properties of meiosis-specific lamin C2 and its impact on nuclear envelope integrity." Nucleus **1**(3): 273-283.
- Kalt, A. und M. Schliwa (1993).** "Molecular components of the centrosome." Trends Cell Biol **3**(4): 118-28.
- Katoh, M., G. Chen, E. Roberge, G. Shaulsky und A. Kuspa (2007).** "Developmental commitment in Dictyostelium discoideum." Eukaryot Cell **6**(11): 2038-45.
- Keller, L. C. und W. F. Marshall (2008).** "Isolation and proteomic analysis of Chlamydomonas centrioles." Methods Mol Biol **432**: 289-300.
- Kilburn, C. L., C. G. Pearson, E. P. Romijn, J. B. Meehl, T. H. Giddings, Jr., B. P. Culver, J. R. Yates, 3rd und M. Winey (2007).** "New Tetrahymena basal body protein components identify basal body domain structure." J Cell Biol **178**(6): 905-12.
- Kitten, G. T. und E. A. Nigg (1991).** "The CaaX motif is required for isoprenylation, carboxyl methylation, and nuclear membrane association of lamin B2." J Cell Biol **113**(1): 13-23.
- Kleylein-Sohn, J., J. Westendorf, M. Le Clech, R. Habedanck, Y. D. Stierhof und E. A. Nigg (2007).** "Plk4-induced centriole biogenesis in human cells." Dev Cell **13**(2): 190-202.
- Koch, K. V., Y. Reinders, T. H. Ho, A. Sickmann und R. Gräf (2006).** "Identification and isolation of Dictyostelium microtubule-associated protein interactors by tandem affinity purification." Eur J Cell Biol **85**(9-10): 1079-90.
- Koegl, M. und P. Uetz (2007).** "Improving yeast two-hybrid screening systems." Brief Funct Genomic Proteomic **6**(4): 302-12.
- Kopito, R. R. (2000).** "Aggresomes, inclusion bodies and protein aggregation." Trends Cell Biol **10**(12): 524-30.
- Kuspa, A., T. Dingermann und W. Nellen (1995).** "Analysis of gene function in Dictyostelium." Experientia **51**(12): 1116-23.
- Kuspa, A. und W. F. Loomis (1992).** "Tagging developmental genes in Dictyostelium by restriction enzyme-mediated integration of plasmid DNA." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(18): 8803-7.
- Lammerding, J., L. G. Fong, J. Y. Ji, K. Reue, C. L. Stewart, S. G. Young und R. T. Lee (2006).** "Lamins A and C but not lamin B1 regulate nuclear mechanics." J Biol Chem **281**(35): 25768-80.
- Lammerding, J., J. Hsiao, P. C. Schulze, S. Kozlov, C. L. Stewart und R. T. Lee (2005).** "Abnormal nuclear shape and impaired mechanotransduction in emerin-deficient cells." J Cell Biol **170**(5): 781-91.

Referenzen

- Lammerding, J., P. C. Schulze, T. Takahashi, S. Kozlov, T. Sullivan, R. D. Kamm, C. L. Stewart und R. T. Lee (2004).** "Lamin A/C deficiency causes defective nuclear mechanics and mechanotransduction." J Clin Invest **113**(3): 370-8.
- Lange, B. M. (2002).** "Integration of the centrosome in cell cycle control, stress response and signal transduction pathways." Curr Opin Cell Biol **14**(1): 35-43.
- Leidel, S., M. Delattre, L. Cerutti, K. Baumer und P. Gönczy (2005).** "SAS-6 defines a protein family required for centrosome duplication in *C. elegans* and in human cells." Nat Cell Biol **7**(2): 115-25.
- Lenardon, M. D., C. A. Munro und N. A. Gow (2010).** "Chitin synthesis and fungal pathogenesis." Curr Opin Microbiol **13**(4): 416-23.
- Li, J. B., J. M. Gerdes, C. J. Haycraft, Y. Fan, T. M. Teslovich, H. May-Simera, H. Li, O. E. Blacque, L. Li, C. C. Leitch, *et al.* (2004).** "Comparative genomics identifies a flagellar and basal body proteome that includes the BBS5 human disease gene." Cell **117**(4): 541-52.
- Lingle, W. L., W. H. Lutz, J. N. Ingle, N. J. Maihle und J. L. Salisbury (1998).** "Centrosome hypertrophy in human breast tumors: implications for genomic stability and cell polarity." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(6): 2950-5.
- Liu, J., T. Rolef Ben-Shahar, D. Riemer, M. Treinin, P. Spann, K. Weber, A. Fire und Y. Gruenbaum (2000).** "Essential roles for *Caenorhabditis elegans* lamin gene in nuclear organization, cell cycle progression, and spatial organization of nuclear pore complexes." Mol Biol Cell **11**(11): 3937-47.
- Loewinger, L. und F. McKeon (1988).** "Mutations in the nuclear lamin proteins resulting in their aberrant assembly in the cytoplasm." Embo J **7**(8): 2301-9.
- Loncarek, J., G. Sluder und A. Khodjakov (2007).** "Centriole biogenesis: a tale of two pathways." Nat Cell Biol **9**(7): 736-8.
- Lutz, R. J., M. A. Trujillo, K. S. Denham, L. Wenger und M. Sinensky (1992).** "Nucleoplasmic localization of prelamin A: implications for prenylation-dependent lamin A assembly into the nuclear lamina." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(7): 3000-4.
- Maniotis, A. und M. Schliwa (1991).** "Microsurgical removal of centrosomes blocks cell reproduction and centriole generation in BSC-1 cells." Cell **67**(3): 495-504.
- Martens, H., J. Novotny, J. Oberstrass, T. L. Steck, P. Postlethwait und W. Nellen (2002).** "RNAi in *Dictyostelium*: the role of RNA-directed RNA polymerases and double-stranded RNase." Mol Biol Cell **13**(2): 445-53.
- Maske, C. P., M. S. Hollinshead, N. C. Higbee, M. O. Bergo, S. G. Young und D. J. Vaux (2003).** "A carboxyl-terminal interaction of lamin B1 is dependent on the CAAX endoprotease Rce1 and carboxymethylation." J Cell Biol **162**(7): 1223-32.
- Mattout, A., T. Dechat, S. A. Adam, R. D. Goldman und Y. Gruenbaum (2006).** "Nuclear lamins, diseases and aging." Curr Opin Cell Biol **18**(3): 335-41.

Referenzen

- McKeon, F. D. (1987).** "Nuclear lamin proteins and the structure of the nuclear envelope: where is the function?" Bioessays 7(4): 169-73.
- Melcer, S. und Y. Gruenbaum (2006).** "Nuclear morphology: when round kernels do the Charleston." Curr Biol 16(6): R195-7.
- Melcer, S., Y. Gruenbaum und G. Krohne (2007).** "Invertebrate lamins." Exp Cell Res 313(10): 2157-66.
- Michaelson, D., W. Ali, V. K. Chiu, M. Bergo, J. Silletti, L. Wright, S. G. Young und M. Philips (2005).** "Postprenylation CAAX processing is required for proper localization of Ras but not Rho GTPases." Mol Biol Cell 16(4): 1606-16.
- Minn, I. L., M. M. Rolls, W. Hanna-Rose und C. J. Malone (2009).** "SUN-1 and ZYG-12, mediators of centrosome-nucleus attachment, are a functional SUN/KASH pair in *Caenorhabditis elegans*." Mol Biol Cell 20(21): 4586-95.
- Moens, P. B. (1976).** "Spindle and kinetochore morphology of *Dictyostelium discoideum*." J Cell Biol 68(1): 113-22.
- Moir, R. D., M. Yoon, S. Khuon und R. D. Goldman (2000).** "Nuclear lamins A and B1: different pathways of assembly during nuclear envelope formation in living cells." J Cell Biol 151(6): 1155-68.
- Nakazawa, Y., M. Hiraki, R. Kamiya und M. Hirono (2007).** "SAS-6 is a cartwheel protein that establishes the 9-fold symmetry of the centriole." Curr Biol 17(24): 2169-74.
- Niedner, H., R. Christen, X. Lin, A. Kondo und S. B. Howell (2001).** "Identification of genes that mediate sensitivity to cisplatin." Mol Pharmacol 60(6): 1153-60.
- Nigg, E. A. (1992).** "Assembly-disassembly of the nuclear lamina." Curr Opin Cell Biol 4(1): 105-9.
- Nigg, E. A. (1992).** "Assembly and cell cycle dynamics of the nuclear lamina." Semin Cell Biol 3(4): 245-53.
- Nigg, E. A. (2006).** "Origins and consequences of centrosome aberrations in human cancers." Int J Cancer 119(12): 2717-23.
- Nigg, E. A. (2007).** "Centrosome duplication: of rules and licenses." Trends Cell Biol 17(5): 215-21.
- Östlund, C., E. S. Folker, J. C. Choi, E. R. Gomes, G. G. Gundersen und H. J. Worman (2009).** "Dynamics and molecular interactions of linker of nucleoskeleton and cytoskeleton (LINC) complex proteins." J Cell Sci 122(Pt 22): 4099-108.
- Parnaik, V. K. und K. Manju (2006).** "Laminopathies: multiple disorders arising from defects in nuclear architecture." J Biosci 31(3): 405-21.
- Parry, D. A., J. F. Conway und P. M. Steinert (1986).** "Structural studies on lamin. Similarities and differences between lamin and intermediate-filament proteins." Biochem J 238(1): 305-8.

Referenzen

- Peel, N., N. R. Stevens, R. Basto und J. W. Raff (2007).** "Overexpressing centriole-replication proteins in vivo induces centriole overduplication and de novo formation." Curr Biol **17**(10): 834-43.
- Pelletier, L., E. O'Toole, A. Schwager, A. A. Hyman und T. Muller-Reichert (2006).** "Centriole assembly in *Caenorhabditis elegans*." Nature **444**(7119): 619-23.
- Peter, M., E. Heitlinger, M. Haner, U. Aebi und E. A. Nigg (1991).** "Disassembly of in vitro formed lamin head-to-tail polymers by CDC2 kinase." Embo J **10**(6): 1535-44.
- Piel, M., J. Nordberg, U. Euteneuer und M. Bornens (2001).** "Centrosome-dependent exit of cytokinesis in animal cells." Science **291**(5508): 1550-3.
- Pihan, G. A., A. Purohit, J. Wallace, H. Knecht, B. Woda, P. Quesenberry und S. J. Doxsey (1998).** "Centrosome defects and genetic instability in malignant tumors." Cancer Res **58**(17): 3974-85.
- Polychronidou, M., A. Hellwig und J. Grosshans** "Farnesylated nuclear proteins Kugelkern and lamin Dm0 affect nuclear morphology by directly interacting with the nuclear membrane." Mol Biol Cell **21**(19): 3409-20.
- Polychronidou, M., A. Hellwig und J. Grosshans (2010).** "Farnesylated nuclear proteins Kugelkern and lamin Dm0 affect nuclear morphology by directly interacting with the nuclear membrane." Mol Biol Cell **21**(19): 3409-20.
- Prüfert, K., A. Vogel und G. Krohne (2004).** "The lamin CxxM motif promotes nuclear membrane growth." J Cell Sci **117**(Pt 25): 6105-16.
- Ralle, T., C. Grund, W. W. Franke und R. Stick (2004).** "Intranuclear membrane structure formations by CaaX-containing nuclear proteins." J Cell Sci **117**(Pt 25): 6095-104.
- Razafsky, D. und D. Hodzic (2009).** "Bringing KASH under the SUN: the many faces of nucleo-cytoskeletal connections." J Cell Biol **186**(4): 461-72.
- Rehberg, M. und R. Gräf (2002).** "Dictyostelium EB1 is a genuine centrosomal component required for proper spindle formation." Mol Biol Cell **13**(7): 2301-10.
- Reinders, Y., I. Schulz, R. Gräf und A. Sickmann (2006).** "Identification of novel centrosomal proteins in *Dictyostelium discoideum* by comparative proteomic approaches." J Proteome Res **5**(3): 589-98.
- Rieder, C. L., S. Faruki und A. Khodjakov (2001).** "The centrosome in vertebrates: more than a microtubule-organizing center." Trends Cell Biol **11**(10): 413-9.
- Riemer, D., J. Wang, A. Zimek, B. J. Swalla und K. Weber (2000).** "Tunicates have unusual nuclear lamins with a large deletion in the carboxyterminal tail domain." Gene **255**(2): 317-25.
- Robertson, A. D. und J. F. Grutsch (1981).** "Aggregation in *Dictyostelium discoideum*." Cell **24**(3): 603-11.
- Roos, W., V. Nanjundiah, D. Malchow und G. Gerisch (1975).** "Amplification of cyclic-AMP signals in aggregating cells of *Dictyostelium discoideum*." FEBS Lett **53**(2): 139-42.

Referenzen

- Rusinol, A. E. und M. S. Sinensky (2006).** "Farnesylated lamins, progeroid syndromes and farnesyl transferase inhibitors." J Cell Sci **119**(Pt 16): 3265-72.
- Sakamoto, T., A. Uezu, S. Kawauchi, T. Kuramoto, K. Makino, K. Umeda, N. Araki, H. Baba und H. Nakanishi (2008).** "Mass spectrometric analysis of microtubule co-sedimented proteins from rat brain." Genes Cells **13**(4): 295-312.
- Salisbury, J. L., C. M. Whitehead, W. L. Lingle und S. L. Barrett (1999).** "Centrosomes and cancer." Biol Cell **91**(6): 451-60.
- Samereier, M., I. Meyer, M. P. Koonce und R. Gräf (2010).** "Live cell-imaging techniques for analyses of microtubules in Dictyostelium." Methods Cell Biol **97**: 341-57.
- Schliwa, M. und J. van Blerkom (1981).** "Structural interaction of cytoskeletal components." J Cell Biol **90**(1): 222-35.
- Schnackenberg, B. J. und R. E. Palazzo (1999).** "Identification and function of the centrosome centromatrix." Biol Cell **91**(6): 429-38.
- Schulz, I., O. Baumann, M. Samereier, C. Zoglmeier und R. Gräf (2009).** "Dictyostelium Sun1 is a dynamic membrane protein of both nuclear membranes and required for centrosomal association with clustered centromeres." Eur J Cell Biol **88**(11): 621-38.
- Schulz, I., A. Erle, R. Gräf, A. Krüger, H. Lohmeier, S. Putzler, M. Samereier und S. Weidenthaler (2009).** "Identification and cell cycle-dependent localization of nine novel, genuine centrosomal components in Dictyostelium discoideum." Cell Motil Cytoskeleton **66**(11): 915-28.
- Schulz, I., Y. Reinders, A. Sickmann und R. Gräf (2006).** "An improved method for Dictyostelium centrosome isolation." Methods Mol Biol **346**: 479-89.
- Schulze, S. R., B. Curio-Penny, S. Speese, G. Dialynas, D. E. Cryderman, C. W. McDonough, D. Nalbant, M. Petersen, V. Budnik, P. K. Geyer, *et al.* (2009).** "A comparative study of Drosophila and human A-type lamins." PLoS One **4**(10): e7564.
- Senior, A. und L. Gerace (1988).** "Integral membrane proteins specific to the inner nuclear membrane and associated with the nuclear lamina." J Cell Biol **107**(6 Pt 1): 2029-36.
- Shimi, T., K. Pfliegerhaer, S. Kojima, C. G. Pack, I. Solovei, A. E. Goldman, S. A. Adam, D. K. Shumaker, M. Kinjo, T. Cremer, *et al.* (2008).** "The A- and B-type nuclear lamin networks: microdomains involved in chromatin organization and transcription." Genes Dev **22**(24): 3409-21.
- Sluder, G., F. J. Miller und C. L. Rieder (1986).** "Centrosomes are required for the assembly of a bipolar spindle in animal cells." Ann N Y Acad Sci **466**: 669-73.
- Starr, D. A. und H. N. Fridolfsson (2010).** "Interactions between nuclei and the cytoskeleton are mediated by SUN-KASH nuclear-envelope bridges." Annu Rev Cell Dev Biol **26**: 421-44.
- Steinert, P. M. und D. R. Roop (1988).** "Molecular and cellular biology of intermediate filaments." Annu Rev Biochem **57**: 593-625.

Referenzen

- Stewart-Hutchinson, P. J., C. M. Hale, D. Wirtz und D. Hodzic (2008).** "Structural requirements for the assembly of LINC complexes and their function in cellular mechanical stiffness." Exp Cell Res **314**(8): 1892-905.
- Stierle, V., J. Couprie, C. Ostlund, I. Krimm, S. Zinn-Justin, P. Hossenlopp, H. J. Worman, J. C. Courvalin und I. Duband-Goulet (2003).** "The carboxyl-terminal region common to lamins A and C contains a DNA binding domain." Biochemistry **42**(17): 4819-28.
- Stuurman, N., M. Haner, B. Sasse, W. Hubner, B. Suter und U. Aebi (1999).** "Interactions between coiled-coil proteins: Drosophila lamin Dm0 binds to the bicaudal-D protein." Eur J Cell Biol **78**(4): 278-87.
- Sullivan, T., D. Escalante-Alcalde, H. Bhatt, M. Anver, N. Bhat, K. Nagashima, C. L. Stewart und B. Burke (1999).** "Loss of A-type lamin expression compromises nuclear envelope integrity leading to muscular dystrophy." J Cell Biol **147**(5): 913-20.
- Ueda, M., M. Schliwa und U. Euteneuer (1999).** "Unusual centrosome cycle in Dictyostelium: correlation of dynamic behavior and structural changes." Mol Biol Cell **10**(1): 151-60.
- Vergnes, L., M. Peterfy, M. O. Bergo, S. G. Young und K. Reue (2004).** "Lamin B1 is required for mouse development and nuclear integrity." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(28): 10428-33.
- Vlcek, S. und R. Foisner (2007).** "A-type lamin networks in light of laminopathic diseases." Biochim Biophys Acta **1773**(5): 661-74.
- Vorburger, K., G. T. Kitten und E. A. Nigg (1989).** "Modification of nuclear lamin proteins by a mevalonic acid derivative occurs in reticulocyte lysates and requires the cysteine residue of the C-terminal CXXM motif." Embo J **8**(13): 4007-13.
- Wang, N. und D. Stamenovic (2000).** "Contribution of intermediate filaments to cell stiffness, stiffening, and growth." Am J Physiol Cell Physiol **279**(1): C188-94.
- Wheatley, S. P., E. H. Hinchcliffe, M. Glotzer, A. A. Hyman, G. Sluder und Y. Wang (1997).** "CDK1 inactivation regulates anaphase spindle dynamics and cytokinesis in vivo." J Cell Biol **138**(2): 385-93.
- Wigge, P. A., O. N. Jensen, S. Holmes, S. Soues, M. Mann und J. V. Kilmartin (1998).** "Analysis of the Saccharomyces spindle pole by matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI) mass spectrometry." J Cell Biol **141**(4): 967-77.
- Williams, R. S., K. Boeckeler, R. Gräf, A. Müller-Taubenberger, Z. Li, R. R. Isberg, D. Wessels, D. R. Soll, H. Alexander und S. Alexander (2006).** "Towards a molecular understanding of human diseases using Dictyostelium discoideum." Trends Mol Med **12**(9): 415-24.
- Wilson, K. L. und R. Foisner (2010).** "Lamin-binding Proteins." Cold Spring Harb Perspect Biol **2**(4): a000554.
- Winsor, B. und E. Schiebel (1997).** "Review: an overview of the Saccharomyces cerevisiae microtubule and microfilament cytoskeleton." Yeast **13**(5): 399-434.

Referenzen

Winter-Vann, A. M. und P. J. Casey (2005). "Post-prenylation-processing enzymes as new targets in oncogenesis." Nat Rev Cancer **5**(5): 405-12.

Wolda, S. L. und J. A. Glomset (1988). "Evidence for modification of lamin B by a product of mevalonic acid." J Biol Chem **263**(13): 5997-6000.

Worman, H. J., C. Ostlund und Y. Wang (2010). "Diseases of the nuclear envelope." Cold Spring Harb Perspect Biol **2**(2): a000760.

Xiong, H., F. Rivero, U. Euteneuer, S. Mondal, S. Mana-Capelli, D. Larochelle, A. Vogel, B. Gassen und A. A. Noegel (2008). "Dictyostelium Sun-1 connects the centrosome to chromatin and ensures genome stability." Traffic **9**(5): 708-24.

Zaremba-Czogalla, M., M. Dubinska-Magiera und R. Rzepecki (2010). "Laminopathies: the molecular background of the disease and the prospects for its treatment." Cell Mol Biol Lett **16**(1): 114-48.

Zastrow, M. S., D. B. Flaherty, G. M. Benian und K. L. Wilson (2006). "Nuclear titin interacts with A- and B-type lamins in vitro and in vivo." J Cell Sci **119**(Pt 2): 239-49.

Zhang, F. L. und P. J. Casey (1996). "Protein prenylation: molecular mechanisms and functional consequences." Annu Rev Biochem **65**: 241-69.

Zizlsperger, N., V. N. Malashkevich, S. Pillay und A. E. Keating (2008). "Analysis of coiled-coil interactions between core proteins of the spindle pole body." Biochemistry **47**(45): 11858-68.

6 Abkürzungen

AD	Aktivierungsdomäne
AS	Aminosäuren
BG	<i>background</i>
bp	Basenpaare
C	Carboxy terminal
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CDK1	<i>cyclin-dependent kinase</i>
cDNA	kodierende DNA
CHIP	<i>chromatin immunoprecipitation</i>
CHO-Zellen	<i>Chinese Hamster Ovary</i>
DAPI	4', 6-Diamidino-2-phenylindol – Dihydrochlorid
d.h.	das heißt
DNA-BH	DNA-Bindedomäne
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethyleneglykol-bis(2-aminoethylether)-N,N`-tetraessigsäure
EST	<i>expressed sequence tags</i>
et al.	und weitere
fdft	Farnesyl-Diphosphatfarnesyltransferase
fntA	Farnesyltransferase Untereinheit A
fntB	Farnesyltransferase Untereinheit B
FRAP	<i>fluorescence recovery after photobleaching</i>
FTI	Farnesyltransferaseinhibitor
h	Stunden
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
HCL	Chlorwasserstoff
HMW	<i>High Molecular Weight</i>
ICMT	Isoprenylcystein Methyl Transferase
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
Kb	Kilobasen

Abkürzungen

kDA	Kilo-Daltons
l	Liter
Mb	Milliarden Basenpaare
MBP	Maltose-bindendes Protein
Min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
N	Amino terminal
Na-ATP	Natrium- Adenosine-5'-trisphosphat
NE81	<i>nuclear envelope</i> / Kernhülle
NHS	N-hydroxysuccinimid
NIH	<i>National Institutes of Health</i>
NLS	<i>nuclear localization sequence</i> / Kernlokalisationssequenz
OD	optische Dichte
PCR	Polymerasekettenreaktion
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen-Aktivität
PIPES	1,4-Piperazindiethan-Sulfonsäure
RNAi	RNA Interferenz
ROI	<i>region of interest</i>
rpm	rotations per minute
RT-PCR	Reverse Transkriptions Polymerase Kettenreaktion
sec	Sekunden
SDS	Sodium (Natrium)-dodecylsulfat
SPB	<i>spindle pole body</i>
TEMED	N,N,N,N'-tetramethylenediamine
Tris	Tris-hydroxymethyl-ammoniumethan
Triton-X-100	T-Octylphenoxypolyethoxethanol
Tween 20	Polyoxyethylene-sorbianemonolaureat
U	<i>Units</i>
u.a.	und andere
utr	untranslatiert
w/v	Masse pro Volumen
x	mal, -fach konzentriert
µg/ml	Mikrogramm/Milliliter

7 Curriculum Vitae

Persönliche Daten

Anne Krüger
geboren am 28.04.1981 in Neubrandenburg
Staatsangehörigkeit: Deutsch
Familienstand: ledig, keine Kinder

Schulbildung

09/1987 bis 07/1991 Grundschule Friedrich-Ludwig-Jahn in Neubrandenburg
09/1991 bis 07/1999 Curie-Gymnasium Neubrandenburg
Allgemeine Hochschulreife

Ausbildung

09/1999 bis 08/2002 Ausbildung zur Krankenschwester
Klinikum Neubrandenburg

Universitätsausbildung

10/2002 bis 07/2007 Universität Ernst-Moritz-Arndt Greifswald
Studium der Humanbiologie
09/2004 Vordiplom
09/2007 Diplom in den Fächern:
 Pharmakologie / Wirkstoffkunde (Hauptfach)
 Immunologie (Nebenfach)
 Virologie (Nebenfach)
Gesamtnote: 1

Promotion

11/2007 bis 06/2011 Doktorarbeit Professor Ralph Gräf
 (Universität Potsdam)
mit dem Titel „Molekulare Charakterisierung von NE 81
und CP75, zwei kernhüllen- und centrosomassoziierten
Proteinen in *Dictyostelium discoideum*“

8 Das Wichtigste zum Schluss - Danksagung

Zuerst möchte ich mich natürlich bei Prof. Dr. Ralph Gräf bedanken, der wirklich ein Doktorvater war wie man ihn sich nicht besser wünschen kann. Er hatte jederzeit ein offenes Ohr für Fragen und Probleme und hat mich auch angetrieben, wenn die Motivation mal komplett im Keller war. Danke für die Überlassung dieses tollen Themas!

Dann muss ich mich auch ganz doll bei Frau Dr. Irene Meyer bedanken. Nicht nur für das fleissige Korrekturlesen meiner Arbeit, sondern auch weil sie bei Problemen immer da war und mir zur Seite gestanden hat. Weiterhin für die tollen Anregungen bezüglich meiner Arbeit.

Außerdem möchte ich mich sehr herzlich bei Prof. Dr. Reinhard Fischer und Prof. Dr. Reimer Stick für die Bereitschaft bedanken, meine Arbeit zu lesen.

Danke an Frau Krause/ Schmidt/Lehmann/Guhlan- du weißt wofür!!! Du hast mich tatkräftig im Labor unterstützt und mir viele Sachen abgenommen. Immer warst du da, wenn ich dich gebraucht habe. Ohne dich wäre die Zeit nur halb so schön gewesen. Ich danke dir wirklich für alles.

Auch Sandra darf ich nicht vergessen zu erwähnen. Mit ihren nie enden wollenden Schokoladenvorräten und ihrer Hilfe bei allen Sorgen des Arbeitsalltages war sie immer sofort zur Stelle.

Dann darf ich natürlich meine lieben zellbiologischen Kollegen nicht vergessen (Matthias, Oli, Sascha, Tatjana, Petros und die Dictys), die ein tolles Arbeitsklima geschaffen haben und immer für ein reichhaltiges Frühstücksbuffett gesorgt haben. Lecker kann ich nur sagen.

Bei Antje, Adeline, Fredel, Elisabeth und Anne bedanke und entschuldige ich mich für stundenlange Telefonate und eventuell entstandene Druckgeschwüre am Ohr. Danke fürs Zuhören und das Ertragen meiner Launen.

Die fleissigen Wichtel Antje und Robert dürfen auch nicht unerwähnt bleiben. Danke für eure Hilfe und für anregende Gespräche über Satzbau und Formatvorlagen.

Meine Zweitkollegen im Haus Abendstern darf ich nicht vergessen. Auch wenn ich euch mit meiner Hektik in den Wahnsinn getrieben habe, habt ihr mich immer tatkräftig unterstützt und euch nach meinen Dienstplanwünschen gerichtet. Danke für die schöne Zusammenarbeit. Es hat wirklich Spass mit euch gemacht. Die appetitlichen Gespräche beim Frühstück werde ich sehr vermissen.

Der allergrößte Dank gilt meinen Eltern. Ohne euch hätte ich das alles nicht geschafft. Ich bin so froh euch zu haben!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!