

Institut für Biochemie und Biologie
Abteilung Zellbiologie

**Charakterisierung der neuen centrosomalen Proteine CP148 und
CP55 in *Dictyostelium discoideum***

-Dissertation-

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

Vorgelegt der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Potsdam von
Oliver Kuhnert



März 2012

Online veröffentlicht auf dem
Publikationsserver der Universität Potsdam:
URL <http://opus.kobv.de/ubp/volltexte/2012/5994/>
URN <urn:nbn:de:kobv:517-opus-59949>
<http://nbn-resolving.de/urn:nbn:de:kobv:517-opus-59949>

Ehrenwörtliche Versicherung

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

Oliver Kuhnert

Potsdam, März 2012

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht oder sind eingereicht

1. **Oliver Kuhnert, Otto Baumann, Irene Meyer and Ralph Gräf: *Functional characterization of CPI48, a novel key component for centrosome integrity in Dictyostelium***. Cell Mol Life Sci, 2012, published electronically ahead of print.
2. **Oliver Kuhnert, Otto Baumann, Irene Meyer and Ralph Gräf: *CP55, a novel key component of centrosomal organization in Dictyostelium*** eingereicht bei Cell Mol Life Sci, 2012
3. **Irene Meyer, Oliver Kuhnert and Ralph Gräf: *Functional analyses of lissencephaly-related proteins in Dictyostelium***. Semin Cell Dev Biol, 2011. 22(1): p. 89-96.

Zusätzliches Material das die beigefügte CD enthält

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

Film 1: GFP-CP148CherryH2B

Film 2: GFP-CP148_FRAP

Film 3: CP148RNAi_Mitose

Film 4: GFP-CP55_FRAP

Film 5: Mitose_CP55ko

Film 6: Mitose_CP55ko_monoSP

Film 7: Mitose_CP55ko_biSP

Film 8: Phago_Hefe_CP55ko

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

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	6
Zusammenfassung.....	11
Summary.....	12
1 Einleitung.....	13
1.1 Dictyostelium als Modellorganismus in der Zellbiologie.....	13
1.2 Die Organisation der Mikrotubuli bei Dictyostelium.....	14
1.3 Biogenese des Centrosoms bei Tieren und Dictyostelium.....	16
1.4 Der Golgi Apparat.....	19
1.5 Endozytose: Phagozytose und die Reifung der Phagosomen.....	20
1.6 Ziel dieser Arbeit.....	21
2 Charakterisierung der centrosomalen Proteine CP148 und CP55 in <i>Dictyostelium</i>	23
2.1 Ergebnisse zu CP148.....	23
2.1.1 <i>In Silico</i> Analyse der CP148 Sequenz.....	23
2.1.2 Verhalten des endogenen CP148 im Zellzyklus.....	24
2.1.3 GFP-CP148 bildet in der Telophase cytosolische Cluster, die zum Centrosom.....wandern.....	26
2.1.4 GFP-CP148 Überexpression führt zur Hypertrophie der Dictyostelium Corona.....	28
2.1.5 GFP-CP148 zeigt keine signifikante Mobilität am Centrosom.....	31
2.1.6 Eine verminderte CP148 Expression resultiert im Verlust des radialen Interphase..... Mikrotubuli Cytoskeletts.....	32
2.1.7 Der CP148 Knockdown verursacht eine höhere Ploidie und unterbricht die.....Verbindung vom Centrosom zu den geclusterten Centromeren.....	36
2.1.8 CP148 RNAi hat keinen Einfluss auf die Ausbildung einer zentralen Spindel undastraler Mikrotubuli.....	39
2.1.9 GFP-CP148 Δ N kompensiert den Phänotyp der ungeordneten Mikrotubuli.....	40
2.2 Ergebnisse CP55.....	42
2.2.1 CP55 ist ein neues centrosomales Protein der Core-Region und Spindelpole.....	43

2.2.2 Das GFP-Fusionsprotein zeigt dieselbe Dynamik im Zellzyklus wie das endogeneCP55	44
2.2.3 Die Überexpression von GFP-CP55 erzeugt überzählige Centrosomen.....	45
2.2.4 GFP-CP55 zeigt eine geringe Mobilität am Centrosom.....	49
2.2.5 Herstellung eines CP55 k/o in AX2	50
2.2.6 Der CP55 k/o resultiert in überzähligen, nicht-centrosomalen MTOCs	51
2.2.7 Die überzähligen MTOCs entstehen in der Mitose	54
2.2.8 Die CP55 k/o Zellen zeigen eine erhöhte Ploidie	57
2.2.9 Der Knockout von CP55 verursacht starke Wachstumsdefekte.....	59
2.2.10 CP55 k/o Zellen zeigen eine Dispersion des Interphase Golgi-Apparats	61
2.2.11 Die Transformation der CP55 k/o Zellen mit GFP-CP55 Konstrukt rettet den CP55k/o Phänotyp.....	62
2.2.12 Ohne CP55 erfolgt eine frühzeitige Re-Rekrutierung von CP148 an den Spindelpol	63
3 Diskussion	65
3.1 Das neue Corona-Protein CP148.....	65
3.1.1 Mikrotubuli sind mit den centrosomalen Core-Komponenten über verschiedene Wegewährend der Interphase und Mitose assoziiert	65
3.1.2 Astrale Mikrotubuli und mitotische Kinasen spielen eine Rolle bei der Corona.....Biogenese	67
3.1.3 Ähnlichkeiten von CP148 als Corona organisierendes Protein zu anderen bekannten -Gerüstproteinen der PCM.....	69
3.1.4 CP148 ist an der Centrosom-Zellkern Verbindung und der Clusterung der Centromerebeteiligt.....	70
3.2 Das neue Core-Protein CP55.....	73
3.2.1 CP55 spielt eine wichtige Rolle in der Stabilisierung und Regulierung der Corona ..	73
3.2.2 CP55 spielt eine Rolle in der Reorganisation des Golgi-Apparates und damit in derPhagozytose.....	75
3.2.3 CP55 ist mit verantwortlich für die Ausbildung einer bipolaren Spindel in der Mitoseund für die Erhaltung der Ploidie	77

3.2.4 CP55 hat eine SAS-6-ähnliche Funktion in der Mitose	78
3.3 Schlussfolgerungen	80
4. Material und Methoden	82
4.1 Reagenzien, Antikörper und andere Materialien.....	82
4.1.1 Chemikalien, Reagenzien, Antibiotika.....	82
4.1.2 Antikörper	82
4.1.3 Enzyme / Polymerasen	83
4.1.4 Allgemeine Puffer und Lösungen	83
4.1.5 Verwendete Plasmide	84
4.1.6 Verwendete Software und Online Programme zu <i>in silico</i> Analyse.....	85
4.2 Biologische Stämme.....	85
4.2.1 Bakterien Stämme:	85
4.2.2 Dictyostelium Stämme	85
4.3 Molekularbiologische Methoden.....	86
4.3.1 Verwendete Oligonukleotide.....	86
4.3.2 Polymerase Kettenreaktion (PCR)	86
4.3.3 RNA Präparation aus Dictyostelium-Zellen	87
4.3.4 Reverse-Transkriptions-PCR (RT-PCR).....	87
4.3.5 Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA Fragmenten	88
4.3.6 Aufreinigung von PCR Produkten, DNA-Fragmenten nach Restriktionsverdau.....sowie die Gelextraktion von DNA aus Agarosegelen.....	88
4.3.7 DNA-Verdau durch Restriktionsendonukleasen	89
4.3.8 Dephosphorylierung von DNA-Enden.....	89
4.3.9 Ligation und Transformation von DNA-Fragmenten in <i>E. coli</i>	89
4.3.10 Mini-Plasmid Präparation aus <i>E. coli</i> Zellen	90
4.3.11 Midi-Plasmid Präparation aus <i>E. coli</i>	90
4.3.12 Bestimmung der DNA Konzentration.....	90
4.3.13 Präparation genomischer DNA aus Dictyostelium	90

4.3.14 Herstellung chemisch kompetenter <i>E. coli</i>	90
4.3.15 Retransformation eines Plasmids in <i>E. coli</i>	91
4.3.16 Transformation von DNA in Dictyostelium (Elektroporation).....	91
4.3.17 Herstellung der in dieser Arbeit verwendeten Plasmide und Dictyostelium.....	
.....Stämme.....	92
4.4 Biochemische Methoden.....	95
4.4.1 Gewinnung von Proteinproben aus Dictyostelium-Zellen.....	95
4.4.2 Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Amidoschwarz-Test.....	96
4.4.3 Proteinpräzipitation mit Methanol / Chloroform und Trichloressigsäure.....	96
4.4.4 Proteinauftrennung mit Hilfe von SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-.....	
.....PAGE).....	97
4.4.5 Coomassie R250 Färbung von SDS-Gelen.....	98
4.4.6 Westernblot und Immundetektion von Proteinen.....	98
4.4.7 Densitometrische Bestimmung der Expressionsstärke von Proteinen.....	99
4.4.8 Isolierung von Dictyostelium Kernen und Centrosomen.....	99
4.4.9 Expression von Fusionsproteinen in Bakterien.....	101
4.4.10 Aufreinigung bakteriell exprimierter Proteine (MBP-Fusionsproteine).....	101
4.4.11 Aufreinigung von Antikörpern.....	102
4.5 Zellbiologische Methoden.....	103
4.5.1 Kultivierung und Konservierung von <i>E.coli</i>	103
4.5.2 Kultivierung und Konservierung von <i>K. aerogenes</i>	103
4.5.3 Kultivierung und Konservierung von Dictyostelium Zellen.....	103
4.5.4 Herstellung TRITC markierter Hefen.....	104
4.5.5 Wachstumsversuch.....	105
4.5.6 Überprüfung der Phagozytose von <i>K. aerogenes</i> durch Dictyostelium.....	105
4.6 Mikroskopische Methoden.....	105
4.6.1 Fixierung und indirekte Immunfluoreszenz von Dictyostelium Zellen.....	105
4.6.2 Weitfeld- und konfokale-Spinning-Disk-Mikroskopie.....	107

4.6.3 Bestimmung des DNA Gehalts von Dictyostelium Zellen	109
4.6.4 Bestimmung der Zellfläche von Dictyostelium-Zellen.....	109
4.6.5 Elektronenmikroskopie von Dictyostelium-Zellen (apl. Prof. Dr. Otto Baumann)	109
5. Literaturverzeichnis.....	110
Abkürzungen	116
Danksagungen	117

Zusammenfassung

Das im Cytosol liegende Dictyostelium Centrosom ist aus einer geschichteten Core-Region aufgebaut, die von einer Mikrotubuli-nukleierenden Corona umgeben ist. Zudem ist es über eine spezifische Verbindung eng an den Kern geknüpft und durch die Kernmembran hindurch mit den geclusterten Centromeren verbunden. Beim G2/M Übergang dissoziiert die Corona vom Centrosom und der Core verdoppelt sich so dass zwei Spindelpole entstehen. CP55 und CP148 wurden in einer Proteom-Analyse des Centrosoms identifiziert. CP148 ist ein neues coiled-coil Protein der centrosomalen Corona. Es zeigt eine zellzyklusabhängige An- und Abwesenheit am Centrosom, die mit der Dissoziation der Corona in der Prophase und ihrer Neubildung in der Telophase korreliert. Während der Telophase erschienen in GFP-CP148 exprimierenden Zellen viele, kleine GFP-CP148-Foci im Cytoplasma, die zum Teil miteinander fusionierten und zum Centrosom wanderten. Daraus resultierte eine hypertrophe Corona in Zellen mit starker GFP-CP148 Überexpression. Ein Knockdown von CP148 durch RNAi führte zu einem Verlust der Corona und einem ungeordneten Interphase Mikrotubuli-Cytoskelett. Die Bildung der mitotischen Spindel und der astralen Mikrotubuli blieb davon unbeeinflusst. Das bedeutet, dass die Mikrotubuli-Nukleationskomplexe während der Interphase und Mitose über verschiedene Wege mit dem Core assoziiert sind. Des Weiteren bewirkte der Knockdown eine Dispersion der Centromere sowie eine veränderte Sun1 Lokalisation in der Kernhülle. Somit spielt CP148 ebenso eine Rolle in der Centrosomen-Centromer-Verbindung. Zusammengefasst ist CP148 ein essentielles Protein für die Bildung und Organisation der Corona, welche wiederum für die Centrosom/Centromer Verbindung benötigt wird. CP55 wurde als Protein der Core-Region identifiziert und verbleibt während des Zellzyklus am Centrosom. Dort besitzt es strukturelle Aufgaben, da die Mehrheit der GFP-CP55 Moleküle in der Interphase keine Mobilität zeigten. Die GFP-CP55 Überexpression führte zur Bildung von überzähligen Centrosomen mit der üblichen Ausstattung an Markerproteinen der Corona und des Cores. CP55 Knockout-Zellen waren durch eine erhöhte Ploidie, eine weniger strukturierte und leicht vergrößerte Corona sowie zusätzliche cytosolische Mikrotubuli-organisierende Zentren charakterisiert. Letztere entstanden in der Telophase und enthielten nur Corona- aber keine Core-Proteine. In CP55 k/o Zellen erfolgte die Rekrutierung des Corona-Organisators CP148 an den Spindelpol bereits in der frühen Metaphase anstatt, wie üblich, erst in der Telophase. Außerdem zeigten die Knockout-Zellen Wachstumsdefekte, deren Grund vermutlich Schwierigkeiten bei der Centrosomenverdopplung in der Prophase durch das Fehlen von CP55 waren. Darüber hinaus konnten die Knockout-Zellen phagozytiertes Material nicht verwerten, obwohl der Vorgang der Phagozytose nicht beeinträchtigt war. Dieser Defekt kann dem im CP55 k/o auftretenden dispergierten Golgi-Apparat zugeschrieben werden.

Summary

The Dictyostelium centrosome consists of a layered core structure surrounded by a microtubule-nucleating corona. A tight linkage through the nuclear envelope connects the cytosolic centrosome with the clustered centromeres within the nuclear matrix. At G2/M the corona dissociates, and the core structure duplicates yielding two spindle poles. The two proteins CP148 and CP55 were discovered in a proteomic analysis of Dictyostelium centrosomes. CP148 is a novel coiled-coil protein of the centrosomal corona. GFP-CP148 exhibited cell cycle dependent presence and absence at the centrosome, which correlates with dissociation of the corona in prophase and its reformation in late telophase. During telophase, GFP-CP148 formed cytosolic foci, which coalesced and joined the centrosome. This explains the hypertrophic appearance of the corona upon strong overexpression of GFP-CP148. Depletion of CP148 by RNAi caused virtual loss of the corona and disorganization of interphase microtubules. Surprisingly, formation of the mitotic spindle and astral microtubules was unaffected. Thus, microtubule nucleation complexes associate with centrosomal core components through different means during interphase and mitosis. Furthermore, CP148 RNAi caused dispersal of centromeres and altered Sun1 distribution at the nuclear envelope, suggesting a role of CP148 in the linkage between centrosomes and centromeres. Taken together, CP148 is an essential factor for the formation of the centrosomal corona, which in turn is required for centrosome/centromere linkage.

As CP148, CP55 was also identified in a centrosomal proteome analysis. It is a component of the centrosomal core structure, and persists at the centrosome throughout the entire cell cycle. FRAP experiments revealed the majority of centrosomal GFP-CP55 is immobile indicating a structural task of CP55 at the centrosome. GFP-CP55 overexpression elicits supernumerary centrosomes containing the usual set of corona and core marker proteins. The CP55 null mutant is characterized by increased ploidy, a less structured, slightly enlarged corona, and by supernumerary, cytosolic MTOCs, containing only corona proteins and lacking a core structure. Live cell imaging showed that supernumerary MTOCs arise in telophase. Lack of CP55 also caused premature recruitment of the corona organizer CP148 to mitotic spindle poles, already in metaphase instead of telophase. Forces transmitted through astral microtubules may expel prematurely acquired or loosely attached corona fragments into the cytosol, where they act as independent MTOCs. CP55null cells were also impaired in growth, most probably due to difficulties in centrosome splitting during prophase. Furthermore, although they were still capable of phagocytosis, they appeared unable to utilize phagocytosed nutrients. This inability may be attributed to their disorganized Golgi apparatus.

1 Einleitung

1.1 Dictyostelium als Modellorganismus in der Zellbiologie

Dictyostelium discoideum ist ein einzelliger, amöboider Organismus, der in seiner ursprünglichen Form ein Bewohner des Waldbodens ist und taxonomisch zu den Amöbozoa gehört [1]. Dictyostelium ernährt sich hauptsächlich von Bakterien. Die Vermehrung erfolgt in seinem vegetativen Stadium durch eine symmetrische, mitotische Teilung. Bei Nahrungsmangel erfolgt eine cAMP gesteuerte Entwicklung des unizellulären Organismus zu einem multizellulären Fruchtkörper. Dieser bei Nahrungsmangel initiierte Entwicklungszyklus kann in drei Abschnitte eingeteilt werden: Aggregation, Migration und Kulmination. Die durch Nahrungsmangel aktivierte Aggregation ist cAMP gesteuert. Individuelle Dictyostelium Zellen starten mit einer pulsartigen Freisetzung von cAMP, was von benachbarten Amöben registriert werden kann. Diese wandern in Richtung des cAMP Signals und setzen dabei selbst pulsartig cAMP frei, so dass sich letztendlich aus bis zu 10^5 Zellen ein beweglicher sogenannter Slug entwickelt. Dieser differenziert sich in zwei Zelltypen, die keimungsfähigen Sporen- und später absterbenden Stielzellen, welche zusammen den Fruchtkörper bilden. Somit steht Dictyostelium an der evolutionären Basis der heutigen Vielzeller. Bei günstigen Umweltbedingungen, wie einem ausreichenden Nahrungsangebot und einer optimalen Wachstumstemperatur entstehen aus Sporen neue, einzellige Dictyostelium Amöben [2].

Bereits in den 1950er Jahren begann die Karriere von Dictyostelium als Modellorganismus in der Zellbiologie [3]. Das Wachstum bei Raumtemperatur unter normalen atmosphärischen Bedingungen in einem einfachen, günstigen Medium in Schüttelkultur und Zellkulturflaschen oder in der Anwesenheit von Bakterien sind für Dictyostelium als Modellorganismus ebenso entscheidend gewesen wie seine relativ kurze Generationszeit von acht Stunden in axenischem Medium. Des Weiteren können die Sporen generierter Dictyostelium Mutanten leicht geerntet und so über Jahrzehnte aufbewahrt werden. Somit wurde Dictyostelium zu einem weit verbreiteten Modellorganismus für Untersuchungen in der Grundlagenforschung wie Chemotaxis, Zellbewegung und Entwicklung, Zell-Zell-Kommunikation und Differenzierung. Außerhalb der Grundlagenforschung diente Dictyostelium bisher auch zum besseren Verständnis humaner Erkrankungen wie Lissenzephalie, Erkrankungen der weißen Blutkörperchen und Krebs [4]. Außerdem wurde Dictyostelium auch für Tests der Zytotoxizität von pharmazeutischen Präparaten [5] oder neuen Polymeren für medizinische

Implantate genutzt [6]. Im Laufe der Jahre konnten verschiedenste genetische, zellbiologische und biochemische Methoden für *Dictyostelium* erfolgreich etabliert werden. Dazu gehören z.B. die spezifische Regulation der Expression bestimmter Gene durch RNAi oder Gen Knockout, Protein-Protein Interaktionsstudien mittels TAP-tag und die Expression verschiedenster fluoreszierender Fusionsproteine [7-9]. Mit der vollständigen Sequenzierung des mit 34 Mb sehr kleinen und aus sechs Chromosomen bestehenden haploiden Genoms wurde eine sehr gute Grundlage für proteomische Studien geschaffen. Viele der ca. 12500 *Dictyostelium* Gene zeigen zudem Homologien zu Genen in tierischen Zellen [7]. Innerhalb des letzten Jahrzehnts erlangte *Dictyostelium* ebenfalls an Bedeutung als Modellorganismus für die Centrosomenforschung. Der Grundstein dafür wurde durch die Etablierung eines Protokolls zur mikrotubulifreien Isolation von *Dictyostelium* Centrosomen gelegt [10]. In weiteren Experimenten konnten dann mit Hilfe verschiedenster biochemischer Analysen neue centrosomale *Dictyostelium*-Proteine bestimmt werden [11]. Zusammen mit den zur Verfügung stehenden Antikörpern und verschiedenster etablierter Techniken zur Proteinuntersuchung bildete dies eine sehr gute Grundlage für genauere Analysen des *Dictyostelium* Centrosoms.

1.2 Die Organisation der Mikrotubuli bei *Dictyostelium*

In eukaryotischen Zellen sind Mikrotubuli neben Actin- und Intermediärfilamenten eines der Hauptbestandteile des Cytoskeletts. Mikrotubuli sind dynamische Polymere die fortlaufend einem Wechsel zwischen Polymerisation und Depolymerisation unterliegen. Diese dynamische Instabilität bedarf einer strengen Regulation, welche *in vivo* über die Bindung von Mikrotubuli-assoziierten Proteinen (MAPs) erfolgt. Die Ausbildung eines Mikrotubuli Cytoskeletts erfordert das Vorhandensein eines Mikrotubuli-organisierenden Zentrums (MTOC), welches als Kristallisationskeim für die Mikrotubulipolymerisation dient und so die Nukleation von Mikrotubuli auch unterhalb der kritischen Konzentration für eine spontane Polymerisierung ermöglicht. Die Mikrotubuli sind bei undifferenzierten Zellen in einer radialen Form ausgehend vom Centrosom angeordnet. Bei vielen differenzierten polarisierten Zellen wie Epithelzellen oder Neuronen oder auch den Zellen höherer Pflanzen finden sich auch andere Anordnungen wie zum Beispiel die parallele Anordnung der Mikrotubuli zur Längsachse in Epithelzellen [12] oder wie in höheren Pflanzen ohne organisierendes Zentrum in Bündeln [13]. Der Mikrotubulus ist röhrenförmig, besitzt einen Außendurchmesser von ca. 25 nm und besteht meist aus 13 parallel angeordneten Tubulin Protofilamenten. Diese

Protofilamente sind aus α - und β -Tubulin Heterodimeren, welche GTP-abhängig miteinander verbunden sind, aufgebaut. In einem radialen Mikrotubuli-Array wird die dem Centrosomen nahe α -Tubulin Untereinheit eines einzelnen Mikrotubulus als (-)- und die zum Zellcortex orientierte β -Tubulin Untereinheit als (+)-Ende bezeichnet [3, 14-15]. Die Verbindung und damit Verankerung des Protofilaments erfolgt über eine Interaktion von α - und γ -Tubulin in der pericentriolären Matrix (PCM). α -Tubulin befindet sich demnach am (-)-Ende eines jeden Protofilaments. Die Schlüsselfunktion in der Mikrotubuli-Nukleation besitzt γ -Tubulin, ein Homologes zu α - und β -Tubulin. Es wurde erstmals in *Aspergillus nidulans* entdeckt und ist essentiell für die Nukleation von Mikrotubuli in jedem Organismus [15]. Zwei Arten von γ -Tubulin Komplexen konnten identifiziert werden. Der γ -TuRC (γ -Tubulin-Ring-Komplex) ist ein großer, ringförmiger Komplex, bestehend aus acht verschiedenen Untereinheiten γ -Tubulin, GCP2, GCP3, GCP4, GCP5, GCP6, GDP-WD/NEDD1 und GCP8. Der kleinere Komplex wird auch als γ -TuSC (γ -Tubulin-Small-Komplex) bezeichnet und besteht aus γ -Tubulin, GCP2, GCP3. Beide γ -Tubulin Komplexe sind in Tieren [15-16] und höheren Pflanzen [17] zu finden. In niederen Eukaryoten wie Hefen oder Dictyostelium hingegen fehlt der γ -TuRC, so dass das Template ausschließlich aus γ -TuSCs und damit assoziierten Proteinen besteht [18-19].

Die Organisation der Mikrotubuli in Dictyostelium unterscheidet sich in einigen Punkten von der in anderen Zelltypen. In der Interphase erfolgt die Ausbildung des radialen Mikrotubuli Cytoskeletts ähnlich wie in anderen Zellen. Mit 30 bis 70 Mikrotubuli werden aber relativ wenige im Vergleich zu anderen Centrosomen nukleiert [20]. Die Interphase-Mikrotubuli sind außerdem durch einen hohen Grad an Flexibilität gekennzeichnet, was an weit ausladenden Biege- und Wiegebewegungen erkennbar ist [21]. Im Gegensatz zu Säugerzellen sind die Mikrotubuli in Dictyostelium relativ stabil, d.h. es erfolgt keine vollständige Depolymerisation bis zum Ursprung [22]. Bei *in vivo* Untersuchungen von mRFP- α -Tubulin und GFP-TACCdom (TACC ist ein (+)-Ende Markerprotein) exprimierenden Zellen wurde eine starke Dynamik der Mikrotubuli in der Zellperipherie und eine hohe Stabilität der Mikrotubuli im pericentrosomalen Bereich beobachtet [22]. In Dictyostelium existieren demnach zwei verschiedene Pools von Tubulin Dimeren, einmal diejenigen für den stabilen pericentrosomalen Bereich und die anderen für schnelle Aufbau und Abbauprozesse. Die Proteine, die das Cytoskelett im pericentrosomalen Bereich stabilisieren sind bisher unbekannt. CP224 und TACC sind zwei Komponenten, die für das Wachstum der Mikrotubuli essentiell sind [22]. Für die Stabilität der Mikrotubuli ist die Interaktion des (-)-

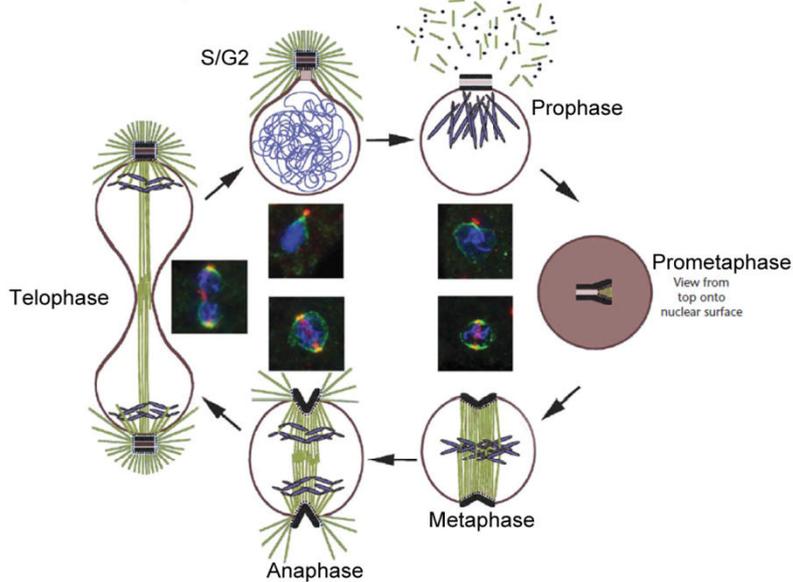
Ende mit γ -Tubulin in der Corona von großer Bedeutung (Corona = PCM, Erklärung folgt). In der Prophase, in der die Corona mit ihren γ -Tubulin Ring Komplexen abdissoziiert, erfolgt eine rasche Depolymerisation des Mikrotubuli Cytoskeletts. Ähnliches konnte auch durch die Freilegung von Mikrotubuli (-)-Enden durch Laser-Ablation des Centrosoms gezeigt werden [20]. Die in der Mitose gebildete, bipolare Spindel wird von beiden Spindelpolen organisiert. Im Gegensatz zur Interphase ist die Anzahl einzelner Mikrotubuli, die von einem Spindelpol/Centrosom ausgebildet werden, mit 140 bis 160 in der Metaphase und frühen Anaphase bedeutend höher [23]. Die sechs Chromosomen werden über ihre Kinetochore, welche wie in höheren Eukaryoten eine trilaminare Struktur besitzen, mit Spindelmikrotubuli verbunden [20]. In der Telophase erfolgt ein signifikantes Längenwachstum der Spindel, was einen schnellen und koordinierten Mikrotubuliaufbau erfordert. Die Ausbildung von astralen Mikrotubuli beginnt in der späten Metaphase. Erst in der Telophase sind die astralen Mikrotubuli deutlich ausgebildet und erkennbar. Man nimmt an, dass aus den astralen Mikrotubuli nach der Zellteilung das neue Interphase Mikrotubulisystem hervorgeht [20]. Bisher ging man davon aus, dass die Mikrotubuli-Nukleationskomplexe in der Interphase und Mitose demselben Pool entstammen. Das Ergebnis dieser Arbeit gibt einen Hinweis darauf, dass es in Dictyostelium einen Unterschied in der Rekrutierung von Interphase Nukleationskomplexen und denen in der Mitose gibt.

1.3 Biogenese des Centrosoms bei Tieren und Dictyostelium

Centrosomen, Spindelpolkörper und verwandte Strukturen sind die wichtigsten Mikrotubuli-organisierenden Zentren (MTOC) in Tieren, Pilzen und niederen Eukaryoten. Mit einer Größe von mehreren hundert Nanometern und einer Zusammensetzung aus etwa 100 verschiedenen Proteinen gehört dieses in der Regel Zellkern-assoziierte Organell zu einem der größten bekannten, nicht-membranumhüllten Protein-Komplexen in einer eukaryotischen Zelle. Einige dieser vielen Proteine werden entlang von Mikrotubuli transportiert und verwenden das Centrosom nur als zentrale Verteilerstation. Andere Proteine besitzen dagegen echte centrosomale Funktionen wie Mikrotubuli-Nukleation, Kontrolle des Zellzyklus, Regulation der Cytokinese und Centrosomenverdopplung. Diese Verdopplung ist zugleich bedeutend für die Bipolarität des Spindelapparates, sowie für die gleiche Segregation der Chromatiden auf die neuen Kerne der Tochterzellen. Daher darf die Verdopplung nur genau einmal pro Zellzyklus stattfinden und muss somit streng reguliert werden. Trotz ihrer universellen

Funktionen ist die Morphologie der Centrosomen zwischen verschiedenen Organismen teilweise sehr unterschiedlich [3].

A Centrosomen Zyklus



B Centrosomen Typen

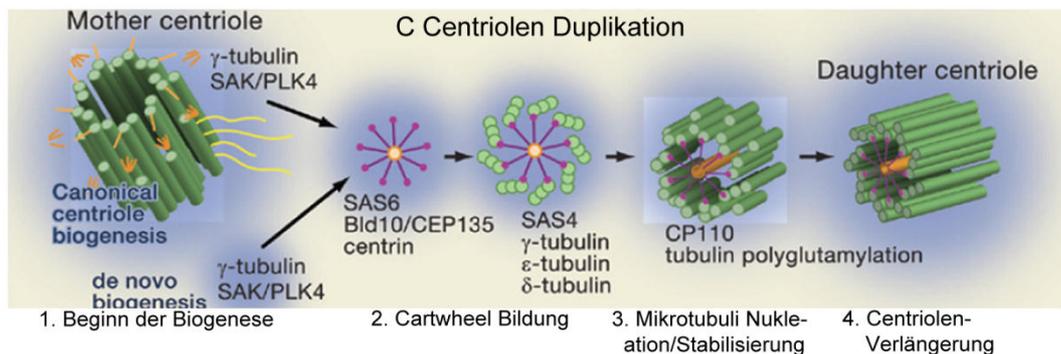
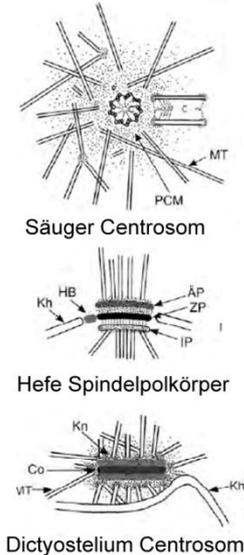


Abbildung 1: Der Centrosomen Zyklus in Dictyostelium (A) und die Grundbautypen von Centrosomen (B). (C) zeigt die schematische Darstellung der Centriolen-Duplikation. Die PCM ist in blau, Mikrotubuli in grün, der zentrale „Hub“ der Centriolen in orange und die Speichen mit ihren „Pinheads“ in rot dargestellt. Geändert [3, 24-25].

Die Centrosomen tierischer Zellen und von begeißelten Algen sind durch ein Paar von Centriolen gekennzeichnet, welche in die sogenannte pericentriolare Matrix (PCM) eingebettet sind (Abbildung 1 B, verschiedene Typen von Centrosomen in der Gegenüberstellung). Die PCM enthält γ -Tubulin-Ring-Komplexe und andere Proteine die für die Mikrotubuli-Nukleation benötigt werden. Die Centrosomenverdopplung (Centriolenverdopplung) beginnt in tierischen Zellen mit dem Wachstum der Tochter-Centriolen in der S-Phase (Schematische Darstellung siehe Abbildung 1 C) [26]. Dieser Vorgang wird durch Cdk2 und Polo-like Kinase 4 (Plk4) reguliert und umfasst eine sequentielle Rekrutierung verschiedenster Proteine einschließlich Cep152, Plk4, Cep135, hSAS-6 und CPAP an der proximalen Seite von jeder der zwei älteren Mutter-Centriolen. SAS6, BLd10/Cep135 und

Centrin bilden hier die Cartwheel-Struktur, welche aus einem zentralen „Hub“ und den neun Speichen mit den am Ende befindlichen „Pinheads“ besteht [25, 27]. An letzteren lokalisiert SAS-4, das wiederum γ -Tubulin-Ring-Komplexe, in einigen Organismen zusätzlich auch ϵ - und δ -Tubulin, bindet [25, 27] und es erfolgt die Nukleation der meist im Triplet angeordneten Centriol-Mikrotubuli. Das anschließende Längenwachstum der Centriol-Mikrotubuli wird durch CP110 limitiert [25]. Die für Centriolen und Basalkörper typische, neunfache radialsymmetrische Anordnung der Mikrotubuli ist hoch konserviert [18, 25, 28-29], wogegen die Anzahl der Centriol-Mikrotubuli von einem [30] bis zu drei (Triplet) [25] variieren kann. Die Centriolen sind für die Rekrutierung von PCM erforderlich [31]. Am Ende der G2 erlangt die Rekrutierung von PCM durch die Centriolen besonders an Bedeutung, da die Aktivität der Mikrotubuli-Nukleation in Vorbereitung auf die Mitose zusammen mit dem Wachstum der PCM erhöht wird. γ -Tubulin-Ringkomplexe werden durch NEDD1/GCP-WD an Gerüstproteine in der PCM gebunden [32]. Drei Gerüstproteine sind in diesem Zusammenhang bislang untersucht worden, D-PLP/Pericentrin, D-SPD-2/Cep192 und Cnn/Cep215/Cdk5Rap2 [32-34].

Zellen von Pilzen und niederen Eukaryoten enthalten keine Centriolen, sondern sind oft durch eine geschichtete, Plaque-ähnliche Struktur gekennzeichnet. Diese ist mit Mikrotubulinukleierenden γ -Tubulin-Komplexen assoziiert. Im Gegensatz zum tierischen Centrosom besitzt das Dictyostelium Centrosom keine Centriolen, sondern eine zentrale, geschichtete Core-Region die von einem elektronendichten, amorphen Material umgeben ist. Dieses amorphe Material bildet das funktionelle Äquivalent zur tierischen PCM und wird als Corona bezeichnet. Unter den centrosomalen Proteinen in Dictyostelium gibt es bisher mehrere bekannte Corona-Komponenten wie Centrin-A, γ -Tubulin-Ring-Komplex-Proteine (γ -Tubulin, Spc97, Spc98), CP224 - ein Protein der XMAP215 Proteinfamilie, TACC, EB1, LIS1, CP248/250 und CP148 [19, 22, 35-41]. Bisher bekannte Proteine der centrosomalen Core-Region umfassen die Nek2 Kinase [42] und die vier neuen Komponenten CP39, CP55, CP75 und CP91, die durch einen Proteom-Screen identifiziert wurden. Als GFP-Fusionsprotein exprimiert lokalisieren sie alle in der centrosomalen Core-Region [41]. Während der Interphase ist das Dictyostelium Centrosom eng an die cytosolische Seite des Kerns über eine Struktur verbunden, die eine Verbindung zwischen dem Centrosom und den geclusterten Centromeren innerhalb der Kernmatrix herstellt. Diese Struktur erfordert für ihre Stabilität unter anderem das Kernmembran Protein Sun1 und das Lamin-ähnliche Protein NE81 [43-44]. Im Gegensatz zu *Saccharomyces cerevisiae* und centriolhaltigen Centrosomen erfolgt die Verdopplung des Dictyostelium Centrosoms nicht synchron mit der S-Phase,

sondern beginnt ähnlich wie in *Schizosaccharomyces pombe* beim Übergang der G2 Phase zur Mitose [45]. In einem ersten Schritt der Centrosomenverdopplung erfolgt ein Anwachsen der Core-Region mit einem gleichzeitigen Abbau der Corona und, damit verbunden, des radialen Mikrotubuli Cytoskeletts [46]. Somit ist die frühe Prophase in Dictyostelium durch das Fehlen von Mikrotubuli gekennzeichnet. Anschließend erfolgt eine noch nicht genau charakterisierte Umstrukturierung und damit einhergehend ein Verschwinden der zentralen Schicht der Core-Region. Die beiden äußeren Schichten trennen sich, werden in die Kernhülle integriert und bilden dort die Spindelpole. Dabei bleibt die Kernhülle intakt. Es findet bei Dictyostelium also eine Form von geschlossener Mitose, dass heißt ohne Zerfall der Kernhülle, statt. Ausgehend von den ehemaligen inneren Seiten der beiden äußeren Core-Schichten werden nun Spindelmikrotubuli ausgebildet. Dadurch vergrößert sich der Abstand der beiden Spindelpole, so dass sie sich in der Metaphase an den gegenüber liegenden Polen des Zellkerns befinden. Bisher ist es noch unklar wie die Tubulindimere und Mikrotubuli-assoziierte Proteine (MAPs), die in die Spindelbildung involviert sind, in den Zellkern gelangen. Eine Möglichkeit wäre, ähnlich wie bei *A. nidulans* eine durch mitotische Kinasen wie NIMA regulierte, zeitweise Disassemblierung der Kernporenkomplexe (NPC) [47]. Dictyostelium besitzt mit DdNek2 eine NIMA Kinase. Zudem ist DdNek2 während der Mitose aktiv, so dass ein zeitweises Auflösen der NPCs und ein damit verbundener Transport von Proteinen für die Spindelbildung in den Zellkern erfolgen könnte [42]. Astrale Mikrotubuli, die mit dem Cytoplasma in Kontakt stehen, werden für den Separationsvorgang nicht benötigt und sind auch erst ab der Metaphase erkennbar. Mit dem Fortschreiten der Mitose und der damit verbundenen Verlängerung der Spindel beginnt gleichzeitig ein Faltungsprozess der Spindelpole. Dieser Prozess ist in der späten Telophase abgeschlossen, so dass die cytosolische Seite der Spindelpole innen liegt. Die ehemals innere Schicht der Spindelpole ist nun nach außen gekehrt und rekrutiert anschließend neues Corona-Material. Gleichzeitig erfolgt auch auf unbekannte Weise der Aufbau einer neuen zentralen Schicht der centrosomalen Core-Region und somit die Vervollständigung des neuen Centrosoms.

1.4 Der Golgi Apparat

Der Golgi Apparat sitzt im Zentrum des sekretorischen Signalweges, in dem er Proteine vom ER empfängt, modifiziert und als Fracht zu den korrekten intra- oder extrazellulären Zielen sortiert. Die Grundfunktion der post-translationalen Modifikation von sekretorischen- und Membran-Proteinen, die vom Endoplasmatischen Reticulum (ER) gebildet werden, ist im

Reich der Eukaryoten hoch konserviert. Dagegen variiert die morphologische Organisation des Golgi-Apparates zwischen verschiedenen Zelltypen und Spezies. In der Mehrheit der Eukaryoten ist der Golgi in Form von kompakten Stapeln, die aus scheibenförmigen, parallel übereinander gelagerten, abgeflachten Zisternen bestehen, aufgebaut [48]. In einigen Protozoen, Pilzen (wie *Schizosaccharomyces pombe* und *Pichia pastoris*), Pflanzen und Wirbellosen sind die Stapel im Cytoplasma zerstreut und häufig in der Nähe von ER-Exit-Sites zu finden. In bestimmten einzelligen Eukaryoten einschließlich einiger parasitärer Einzeller und der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*, sind die Golgi-Membranen als einzelne, isolierte Zisternen im Cytoplasma lokalisiert [48]. Der Golgi Apparat ist in Dictyostelium wie bei Säugern aus einem kompakten Stapel aufgebaut, der sich in der pericentrosomalen Region befindet [48-49]. Diese Lokalisation beruht auf einer Interaktion mit dem Mikrotubuli- und Aktin-Cytoskelett. Mikrotubuli haben eine duale Funktion in der Organisation des pericentriolären Golgi-Stapels. Erstens sind Mikrotubuli, die direkt am Golgi ausgebildet werden, essentiell für den Zusammenhalt der Golgi-Stapel. Zweitens wird das centrosomale Mikrotubuli Cytoskelett zur zentralen Positionierung des Golgi-Apparates und zum Transport von Golgi-Membranen über Dynein-Motorproteine zum Centrosom benötigt. Beim Eintritt in die Mitose erfolgt über Phosphorylierungen eine Fragmentierung des Stapels und in einem zweiten Schritt die Bildung von Golgi Vesikeln, welche gleichzeitig mit einer Monoubiquitinierung einhergeht [50-51]. Die Vesikel liegen verteilt im Cytoplasma vor, so dass eine gleichmäßige Verteilung auf die Tochterzellen gewährleistet ist. In der Telophase erfolgt über Fusionierungen der Vesikel die erneute Ausbildung der Stapelstruktur. Diesem Vorgang geht eine Dephosphorylierung und Deubiquitinierung von Proteinen, die in die Vesikelfusionierung involviert sind, voraus [50]. Bei Dictyostelium wurde der Golgi-Apparat während der Mitose bislang noch nicht näher untersucht. Aufgrund der ähnlichen Morphologie zum Säuger Golgi könnte die Regulation hier ähnlich erfolgen.

1.5 Endozytose: Phagozytose und die Reifung der Phagosomen

Der Vorgang der Phagozytose, ein Teil des endosomalen Weges, ist ein sehr komplexer und in der Evolution hoch konservierter Mechanismus. In höheren Eukaryoten dient er unter anderem zur Entsorgung abgestorbener Zellen oder Zelltrümmer sowie der Abwehr von Pathogenen. Dafür existieren in höhere Organismen spezialisierte Zellen wie etwa Makrophagen, Neutrophile oder dendritische Zellen. Sie besitzen die Fähigkeit, verschiedenste Organismen und Partikel schnell und effizient aufzunehmen sowie diese auch

abzubauen. Als professionelle Phagozyten sind diese Zellen wichtig für die angeborene und adaptive Immunität in Metazoen [52]. Für niedere Eukaryoten wie *Dictyostelium* ist die Phagozytose eine Methode zur Internalisierung von Bakterien, welche als Nahrungsquelle verwendet werden. Der so aufgenommene Mikroorganismus wird in einem Phagosom (Endosom) eingeschlossen [52-53]. Der Transport erfolgt anschließend über einen phago-lysosomal Weg zum Lysosom, wo er durch einen Cocktail von hydrolytischen Enzymen abgebaut wird. Eine effiziente Phagozytose ist abhängig von Signalprozessen, Vesikeltransport und Vesikelfusion sowie einem funktionierenden Cytoskelett, vor allem Aktin und aktinbindenden Proteinen. *Dictyostelium* Zellen sind aufgrund ihrer natürlichen Lebensweise ebenfalls professionelle Phagozyten mit sehr gut entwickelten post-Golgi Kompartimenten wie dem endosomalen System und der kontraktile Vakuole [54]. Die Aufnahme von Partikeln erfolgt über die Ausbildung des "phagocytic cup", durch den der Partikel vollständig umschlossen und aufgenommen wird. Dieser Prozess ist von Aktin abhängig und nach zwei bis drei Minuten abgeschlossen. Das so entstandene frühe Phagosom (Endosom) wird anschließend über Mikrotubuli in Richtung des Centrosoms transportiert. Während dessen erfolgt nach bereits fünf Minuten eine Fusionierung mit sauren Vesikeln [55], die dem post-Golgi Kompartiment entstammen. Außerdem kommt es zu einer direkten Interaktion der Phagosomen mit Golgi-Tubuli, so dass im Golgi prozessierte Proteine, z.B. zur Verarbeitung des phagozytierten Materials, direkt auf die Phagosomen übertragen werden [49, 56]. Das Phagosom durchläuft einen Vorgang der Reifung durch ständige homotypische Fusion und Abspaltung von Vesikeln. Die Neutralisierung des Phagosoms beginnt ca. 30 Minuten nach der Phagozytose. Durch eine sich anschließende Exozytose wird nicht verwertbares Material wieder ausgeschieden.

1.6 Ziel dieser Arbeit

Das Centrosom ist das Schlüsselorganell für viele zelluläre Prozesse. Mutationen centrosomaler Proteine resultieren in einer Reihe von Krankheiten wie z.B. Lissenzephalie, Mikrozephalie und Krebs. *Dictyostelium* ist nicht das klassische Model zur Erforschung von z.B. Krebs. Aufgrund vieler Homologien zu höheren Zellen ist das *Dictyostelium* Centrosom dennoch sehr interessant für die Grundlagenforschung. Das *Dictyostelium* Centrosomen Projekt wurde ursprünglich von Prof. Dr. Ralph Gräf gestartet. Nachdem es gelang Centrosomen kernfrei und funktionsfähig zu isolieren, konnte es mit verschiedensten proteinbiochemischen Techniken, u.a. auch Massenspektrometrie-Analysen, untersucht

werden [11, 57]. Die Ergebnisse waren mehr als 70 neuidentifizierte mögliche centrosomale Proteine, von denen einige bereits als centrosomale Proteine mit zellbiologischen und biochemischen Methoden bestätigt werden konnten. CP148 und CP55 sind Proteine, deren centrosomale Lokalisation durch ein GFP-Fusionsprotein bestätigt wurde [58]. In meiner Arbeit erfolgten nun genauere Untersuchungen der subzellularen Lokalisation des endogen Proteins, das Verhalten während des Zellzyklus, die Generierung von Knockout bzw. Knockdown Stämmen sowie die Überprüfung der Proteine auf Homologien zu anderen centrosomalen Proteinen in höheren Organismen. Des Weiteren sollen meine Ergebnisse neue, interessante Fragestellungen liefern, die nach erneuter Untersuchung letztendlich zum besseren Verständnis des Dictyostelium Centrosoms beitragen.

2 Charakterisierung der centrosomalen Proteine CP148 und CP55 in *Dictyostelium*

Auf der beigegefügten CD befindet sich neben den Filmen auch ein PDF-Dokument meiner Arbeit mit allen Abbildungen in hoher Auflösung. Außerdem möchte ich darauf hinweisen, das CP55 als centrosomales Core-Protein sehr schwach exprimiert wird und das Signal im Westernblot von Gesamtzellextrakten deshalb eher schwach erscheint.

2.1 Ergebnisse zu CP148

CP148 wurde nach einer Untersuchung isolierter *Dictyostelium* Centrosomen durch Massenspektrometrie als neues centrosomales Protein gefunden. An isolierten, Mikrotubuli freien Centrosomen lokalisierte das GFP-CP148 Fusionsprotein nicht in der centrosomalen Core-Region, sondern zeigte ein ringförmiges Signal, das aber kleiner als das der bisherigen Corona Proteine war [41].

2.1.1 *In Silico* Analyse der CP148 Sequenz

CP148 (Dictybase ID *DDB_G0278809*) besitzt ein Molekulargewicht von 148.7 kDa und eine Länge von 1287 Aminosäuren. Nahezu 50 % der Aminosäuren (AS) sind befähigt in ihrer Tertiärstruktur coiled-coil Regionen zu bilden (Abbildung 2). Die Vorhersage der möglichen coiled-coil Strukturen erfolgte durch das „COILS Programm“ mit einer Fenstergröße von 28 Aminosäuren. CP148 zeigt beim Vergleich der Aminosäuresequenzen mittels BLASTp keine Homologien zu Proteinen anderer Organismen. Eine Untersuchung der Proteinsequenz auf konservierte Domänen, Signalsequenzen oder speziellen Substratbindungsstellen gestaltete sich ebenfalls sehr schwierig. Unter Verwendung des CELLULAR CALCIUM INFORMATION SERVER (<http://calcium.uhnres.utoronto.ca>) konnte dennoch eine Calmodulin Bindungsstelle (CaM) vorhergesagt werden, die sich im Bereich von AS 533 bis AS 552 befindet. Calmodulin ist ein weit verbreitetes Protein, welches als primärer Ca^{2+} Sensor in eukaryotischen Zellen dient. Eine Bindung von Calmodulin kann zugleich ein centrosomales Targeting bewirken [59]. Außerdem sagte das Programm PROSITE (<http://prosite.expasy.org>) eine mögliche EF-hand1 Region im Bereich von AS 1127 bis AS 1139 vorher. EF-hand Motive besitzen zwei α -Helices die durch eine Schleife von 12 Aminosäuren miteinander verbunden sind und damit eine Helix-Loop-Helix Struktur bilden. Calcium-Ionen binden an spezifischen Positionen der Schleife und bewirken damit eine

Konformationsänderung der Helices [60]. Dies kann eine Aktivierung oder Inaktivierung des Proteins zu Folge haben. Eine nähere Untersuchung der Calmodulin-Bindungsstelle und der EF-hand Region konnten im Zeitrahmen dieser Arbeit noch nicht fertiggestellt werden. Des Weiteren existieren fünf mögliche CDK1 sowie fünf PLK4-Phosphorylierungsstellen, welche mit dem Programm ELM (Eukaryotic Linear Motif resource for functional sites in proteins) identifiziert wurden.

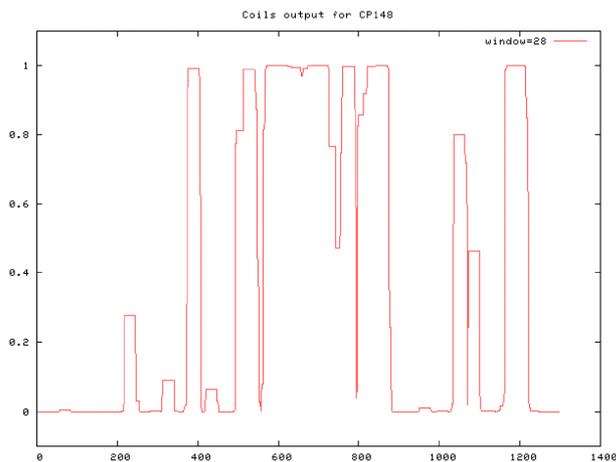


Abbildung 2: Vorhersage der coiled-coil Regionen von CP148 basierend auf der Aminosäuresequenz. Die X-Achse zeigt die Anzahl der Aminosäuren, die Y-Achse die Wahrscheinlichkeit einer coiled-coil Region. Nahezu 50 % der Aminosäuren können in der Faltung ihrer Tertiärstruktur coiled-coil Regionen ausbilden. Vorhersage mittels www.ch.embnet.org.

2.1.2 Verhalten des endogenen CP148 im Zellzyklus

Um die Lokalisation des endogenen CP148 in *Dictyostelium discoideum* bestimmen zu können, wurde ein polyklonaler Antikörper gegen MBP-CP148 Fusionsprotein mit einer Länge von 1074 bp, beginnend bei AS 940 bis AS 1297 angefertigt (pab productions GmbH, Herbertshausen und preclinics GmbH, Potsdam). Das dadurch gewonnene Serum wurde aufgereinigt und zusammen mit einem anti-Tubulin-Antikörper als Gegenfärbung zur Markierung von Dictyostelium Zellen (AX2) in einer Immunfluoreszenzanalyse verwendet (Abbildung 3). Wie in Abbildung 3 erkennbar ist, zeigt CP148 eine Zellzyklus-abhängige, centrosomale Lokalisation. In der Interphase ist das endogene Protein ein Bestandteil der centrosomalen Corona. Zu Beginn der Mitose in der Prophase ist CP148 bereits nicht mehr am sich bildenden Spindelpol nachweisbar (Abbildung 1 Prophase) und wird erst in der Telophase wieder sichtbar. In der Prophase erfolgt ein abdissoziieren der Corona-Komponenten und daraus resultierend der Zerfall des Interphase Mikrotubuli Cytoskeletts. Dieses Verhalten stimmt exakt mit dem Zerfall und der Reorganisation der Corona während der Centrosomenverdopplung überein. CP148 ist somit zellzyklusreguliert.

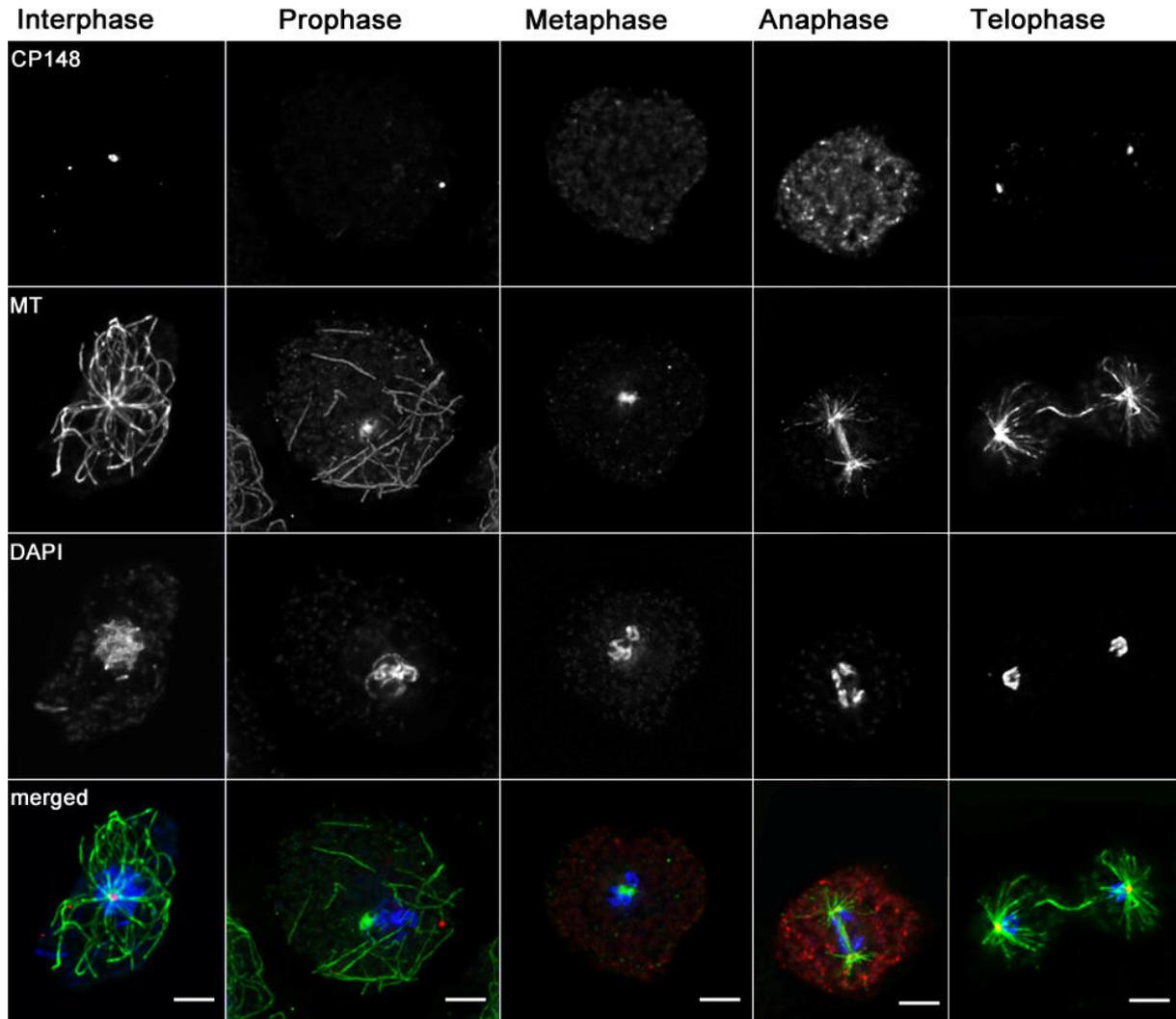


Abbildung 3: Verhalten des endogenen CP148 im Zellzyklus. In der Interphase lokalisiert CP148 in der centrosomalen Corona. CP148 dissoziiert vom Centrosom in der Prophase und ist erst in der späten Telophase wieder sichtbar. Dictyostelium AX2 Zellen wurden mit Glutaraldehyd fixiert und mit anti-CP148 in rot, die Mikrotubuli (MT) mit anti-Tubulin (grün) und die DNA mit DAPI (blau) gefärbt. Die einzelnen Zellzyklus-Phasen und Färbungen sind angegeben. Balken = 3 μm .

Es zeigt damit ein abweichendes Verhalten zu Corona-Komponenten, die bei der Mikrotubuli-Nukleation beteiligt sowie während des gesamten Zellzyklus, wie γ -Tubulin und dem XMAP215 Protein CP224, am Centrosom nachweisbar sind [19, 61]. Erst zum Zeitpunkt der Corona-Reorganisation [19, 61] in der Telophase erfolgt eine Relokalisierung von CP148 ans Centrosom bzw. an den Spindelpol (Abbildung 3 Telophase, CP148 Signal). Dies könnte entweder durch eine Aktivierung von CP148 Molekülen, die sich im Cytoplasma befinden, oder einer Neusynthese erfolgen.

2.1.3 GFP-CP148 bildet in der Telophase cytosolische Cluster, die zum Centrosom wandern

Die Lokalisation des GFP-CP148 Fusionsproteins in der Interphase und Metaphase wurde bereits in einer Studie von Schulz *et al.* untersucht [41]. Das Verhalten des Fusionsproteins in den anderen Stadien des Zellzyklus wurde darin nicht beschrieben. GFP-CP148 zeigt ähnlich dem endogenen Protein ebenfalls ein Zellzyklus reguliertes Verhalten (Abbildung 4).

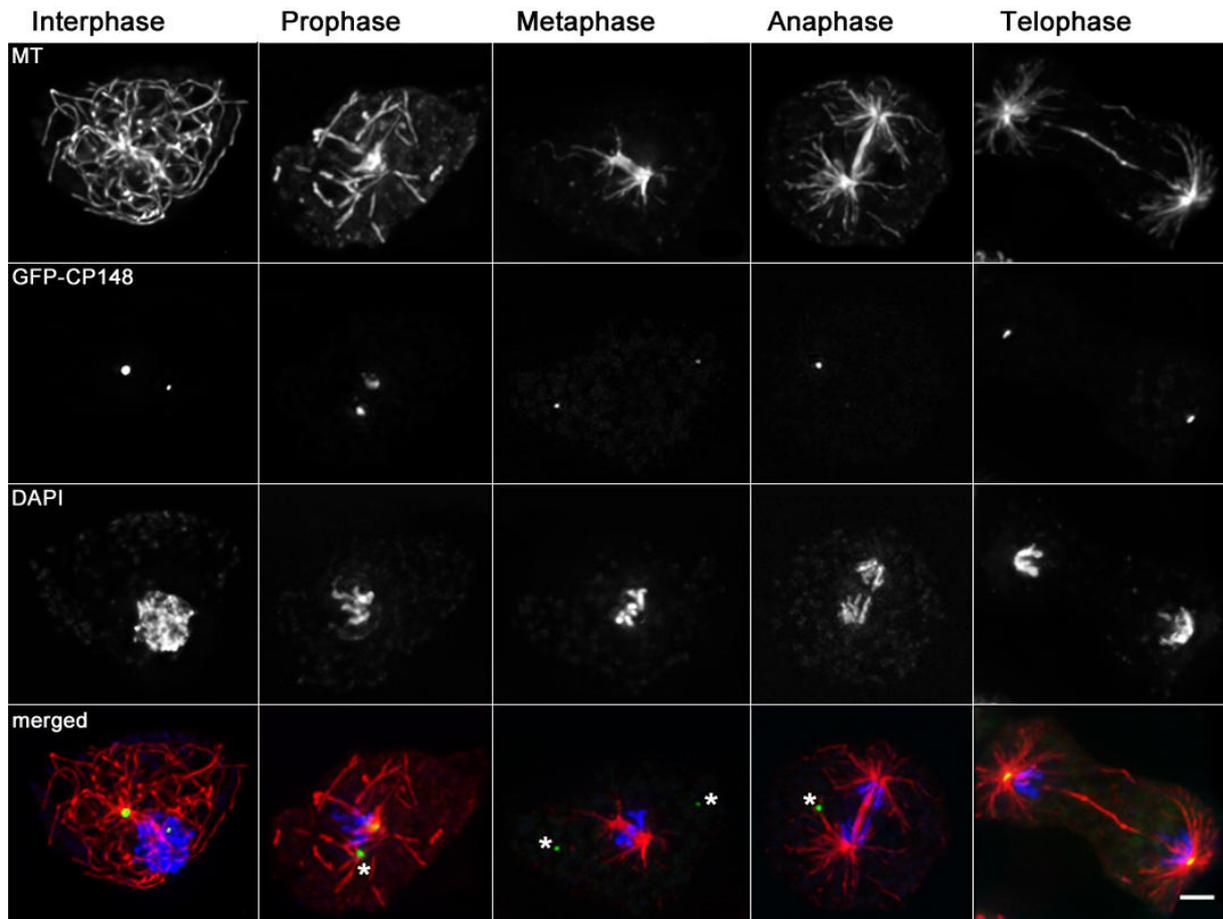


Abbildung 4: Verhalten des GFP-CP148 Fusionsprotein in der Mitose. Der hierfür verwendete Expressionstamm zeigt eine moderate Überexpression. GFP-CP148 dissoziiert wie das endogene Protein zu Beginn der Prophase vom Centrosom und wandert in der späten Telophase an die Spindelpole. Die „*“ markieren verbliebene GFP-CP148 Signale im Cytoplasma, die wahrscheinlich auf die Überexpression zurückzuführen sind. GFP-CP148 Zellen wurden mit Glutaraldehyd fixiert und mit anti-Tubulin (MT) in rot und die DNA mit DAPI (blau) gefärbt; die GFP-Fluoreszenz ist in grün dargestellt. Die Zellzyklus-Phasen und Färbungen sind angegeben. Balken = 2 µm.

Während der Metaphase und Anaphase konnten im Cytoplasma auch einzelne GFP-CP148 Signale beobachtet werden (Abbildung 4, Markierungen mit *). Diese stellen keine Centrosomen oder Spindelpole dar, da von ihnen keine Mikrotubuli-Nukleation ausging. Aufgrund der Überexpression des Fusionsproteins sind dies Reste des Interphase GFP-CP148, die wahrscheinlich nicht vollständig inaktiviert bzw. abgebaut werden konnten sowie keinen er-

kennbaren Einfluss auf die Mitose haben. Jedoch gibt es im Gegensatz zum endogenen CP148 noch einen Unterschied. In der Telophase von Zellen die GFP-CP148 sehr stark exprimieren erscheinen kleine, punktförmige GFP-CP148 Cluster im Cytosol, die im Falle des endogenen Proteins nie beobachtet werden konnten (Abbildung 5 GFP-CP148 und Film1).

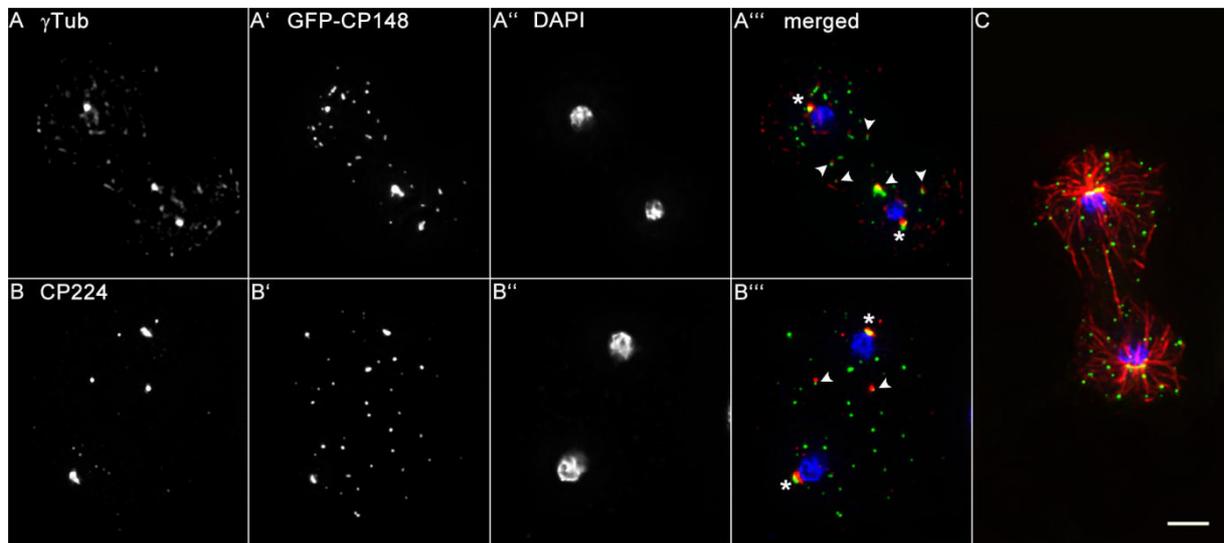


Abbildung 5: Telophase von GFP-CP148 mit den Corona-Markerproteinen CP224 und γ -Tubulin. Die beiden Spindelpole sind jeweils mit einem „*“ markiert. Die Corona-Proteine γ -Tubulin und CP224 kolokalisieren teilweise an den cytosolischen GFP-CP148 Signalen (Pfeilspitzen). GFP-CP148 überexprimierende Zellen wurden mit Methanol fixiert und mit anti- γ -Tubulin (A), anti-CP224 (B) oder anti-Tubulin (C) gefärbt. Die überlagerten Bilder (A''', B''', C) zeigen die Antikörper-Färbungen in rot, GFP-CP148 in grün und DAPI (DNA) in blau. Balken = 3 μ m.

Bei einer sehr starken Überexpression (ca. 300fach, densitometrisch im Westernblot bestimmt, Abbildung 6 E) von GFP-CP148 variierten die cytoplasmatischen Cluster in Anzahl und Größe. Einige, aber nicht alle dieser Cluster kolokalisierten mit γ -Tubulin und CP224 (Abbildung 5 A und B mit Pfeilspitzen markiert). Live-Cell-Imaging Untersuchungen zeigten, dass diese Cluster *de novo* in der Telophase entstehen. Zudem werden sie in einem radialen Muster in Richtung des Spindelpoles transportiert, wo sie miteinander fusionieren (Film 1). Des Weiteren lokalisieren die GFP-CP148 Cluster in der Telophase immer in der Nähe zu astralen Mikrotubuli (Abbildung 5 C). Diese spezifische Lokalisation und die zugleich radiale Bewegung in Richtung des Spindelpoles befürworten einen Transport entlang der Mikrotubuli durch zum Mikrotubuli(-)Ende gerichtete Motorproteine wie Dynein. Da γ -Tubulin und CP224 in einigen Fällen mit den GFP-CP148 Clustern kolokalisieren, könnten diese beiden Proteine in einem gemeinsamen Komplex mit CP148 zum Centrosom transportiert werden.

2.1.4 GFP-CP148 Überexpression führt zur Hypertrophie der Dictyostelium Corona

Als Folge der GFP-CP148-Cluster Bewegung und Fusion am Centrosom ist die Corona bei GFP-CP148 Überexpressionsstämmen (ungefähr 300-fache Überexpression, Abbildung 6 E) im Durchschnitt stark vergrößert. Quantitative Untersuchungen ergaben einen durchschnittlichen Vergrößerungsfaktor der Corona von 2,7 im Vergleich mit Wildtypzellen

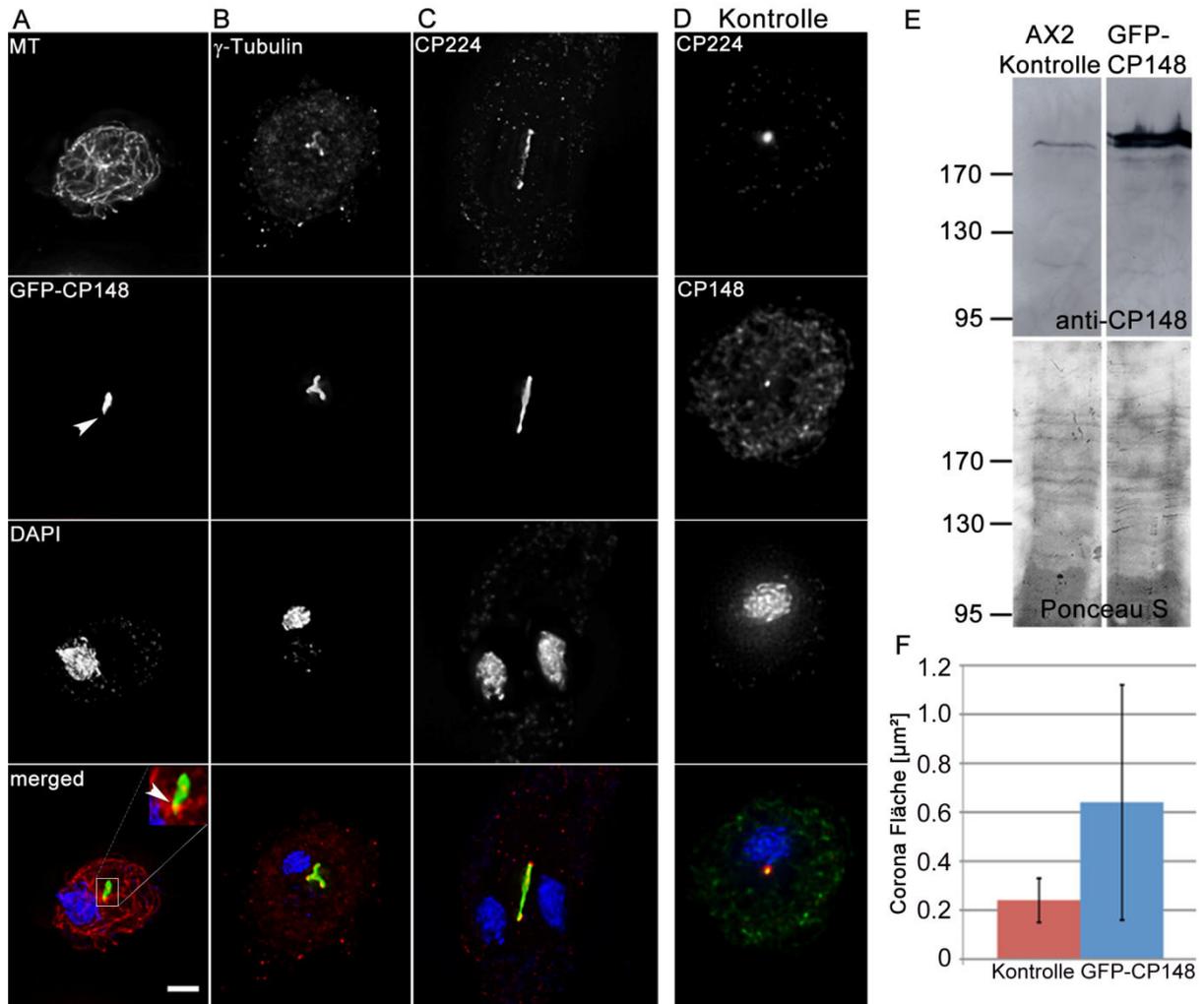


Abbildung 6: Phänotyp der GFP-CP148 Überexpression. Dargestellt ist die Verteilung der centrosomalen Markerproteine in GFP-CP148 überexprimierenden Zellen. Die abgebildeten Interphase-Zellen wurden mit Methanol (B, C, D) oder Glutaraldehyd (A) fixiert. GFP-CP148 überexprimierende Zellen wurden mit anti-Tubulin (MT) in (A), anti- γ -Tubulin (B) und anti-CP224 (C) gefärbt. Die überlagerten Bilder zeigen die Antikörper-Färbungen in rot, GFP-CP148 in grün und DAPI (DNA) in blau. AX2 Kontrollzellen wurden mit anti-CP148 (grün) und der Corona-Marker anti-CP224 (rot) gefärbt (D). Der Balken beträgt 3 μ m. (E) zeigt die Stärke der GFP-CP148 Überexpression in einem Immunoblot von Dictyostelium Gesamtzellextrakten. Die Westernblots der Zellextrakte wurden mit anti-CP148/anti-Kaninchen-Peroxidase gefärbt und mit verstärkter Chemilumineszenz sichtbar gemacht (ECL, oberes Bild). Die Ponceau S (unteres Bild) Färbung zeigt, dass gleiche Proteinmengen von AX2 Kontrollzellen und GFP-CP148 Überexprimierer aufgetragen wurden. In Diagramm in (F) ist die flächenmäßige Zunahme der Corona infolge der Überexpression dargestellt. Zur Auswertung wurden AX2 Kontrollzellen (n=96) und GFP-CP148 Überexprimierer (n=103) mit anti-CP224 gefärbt und die Fläche in μ m² gemessen. Mittelwerte \pm S.D. sind angegeben.

(Abbildung 6, Diagramm F). Darüber hinaus ist die hypertrophe Corona unregelmäßig geformt (Abbildung 6, GFP-CP148 A bis C). Die ringförmige Morphologie der Corona (Abbildung 6, D) geht hierbei teilweise völlig verloren. Die Formenvielfalt ist nahezu unbegrenzt, wie man in den Abbildungen 6 und 7 sehr gut erkennen kann. Um herauszufinden, ob die Überexpression einen Einfluss auf die anderen bisher bekannten centrosomalen Proteine hat, wurde der GFP-CP148 Stamm mittels Immunfluoreszenz-Mikroskopie gegen verschiedene centrosomale Proteine analysiert. Die Mikrotubuli-Nukleation erfolgt immer nur an einem bestimmten Bereich der von GFP-CP148 markierten Corona. Beispielhaft ist dies in Abbildung 6 A dargestellt, wo der Bereich mit einem Pfeil und im überlagerten Bild durch eine Vergrößerung gekennzeichnet ist. Der Nukleationspunkt der Mikrotubuli befindet sich an der zum Kern zugewandten Seite der GFP-CP148 Struktur. In einkernigen Zellen konnte niemals eine beidseitige Nukleation beobachtet werden. Eine Mikrotubuli Ausbildung an zwei Seiten der GFP-CP148 Corona erfolgte nur, wenn auch ein zweiter Zellkern nahe der Corona lokalisierte. Die Markerproteine der centrosomalen Corona wie CP224 und γ -Tubulin zeigten eine mehr oder weniger gleichmäßige Verteilung in gesamten hypertrophen Corona (Abbildung 6 B und C). Dies deutet auf eine strukturelle Ausdehnung der Corona aufgrund der Überexpression von GFP-CP148 hin. Dagegen zeigten die centrosomalen Core-Proteine CP39, CP55 und CP91 kleine, punktförmige Signale (Abbildung 7 C, D, E), die der Anzahl der Zellkerne entsprechen. Die Signalgrößen ähnelten denen in Wildtypzellen, so dass die centrosomale Core-Region von der GFP-CP148 Überexpression offensichtlich unbeeinflusst bleibt. Die Kernmembranproteine Sun1 [43] und NE81 [44] zeigten in GFP-CP148 überexprimierenden Zellen ebenfalls keine Unterschiede in ihrer Lokalisation im Vergleich zu Wildtypzellen. Sun1 lokalisierte wie in AX2 in einem pericentrosomalen Bereich der Kernmembran (Abbildung 7 A). Das Lamin-ähnliche Protein NE81 [44] war wie in Kontrollzellen gleichmäßig entlang der gesamten Kernmembran verteilt (Abbildung 7 B).

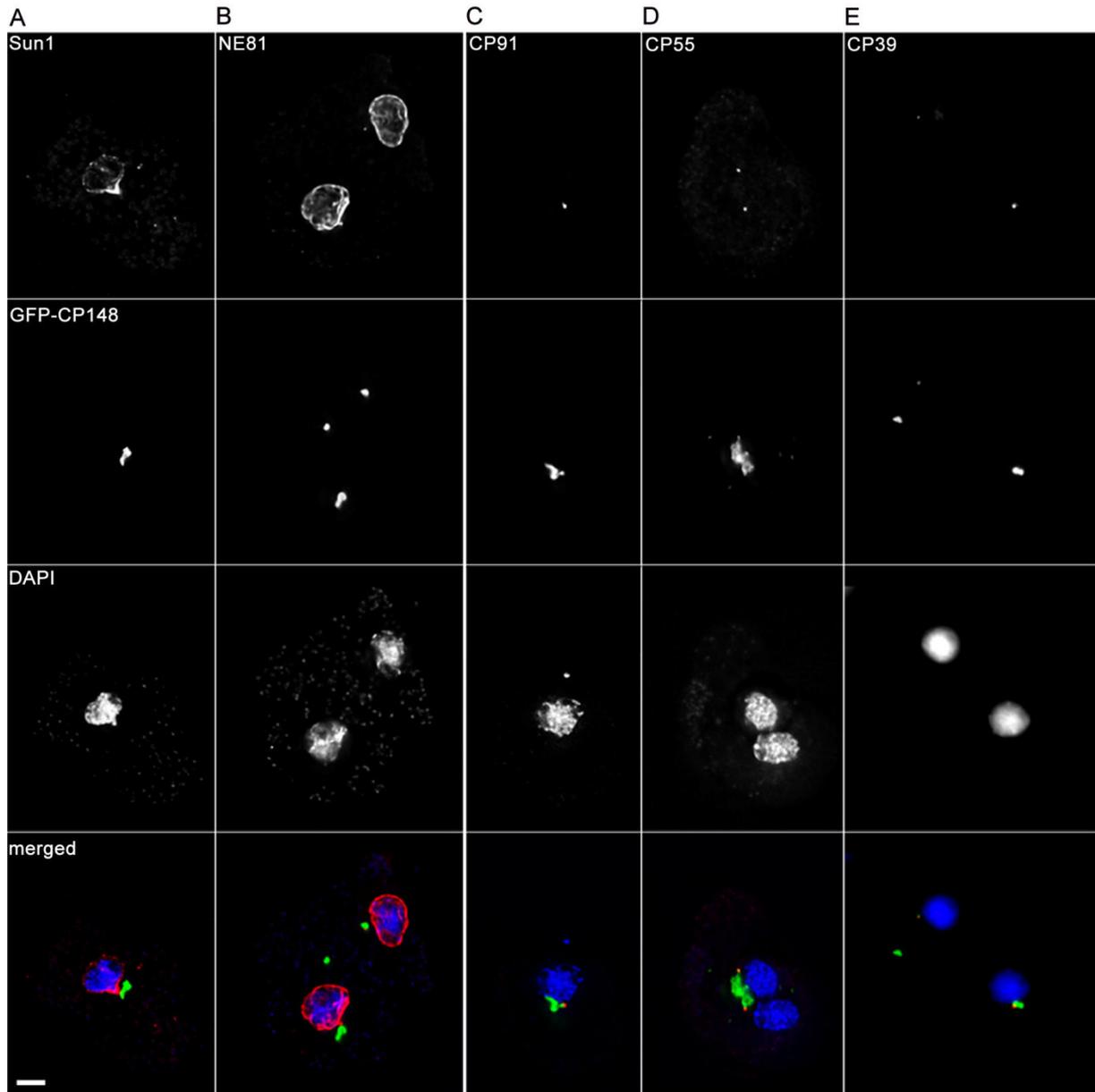


Abbildung 7: Phänotyp der GFP-CP148 Überexpression. Dargestellt ist die Verteilung der Markerproteine für die centrosomale Core-Region und der Kernhüllen in GFP-CP148 überexprimierenden Zellen. Die Abbildung zeigt Interphase-Zellen, die mit Methanol (C, D und E) sowie mit Glutaraldehyd (A und B) fixiert wurden. GFP-CP148 überexprimierende Zellen wurden anti-Sun1 (A), anti-NE81 (B), anti-CP91 (C), anti-CP55 (D) und anti-CP39 (E) gefärbt. Die überlagerten Bilder zeigen die Antikörper-Färbungen in rot, GFP-CP148 in grün und DAPI (DNA) in blau. Der Balken beträgt 3 µm.

Um die Hypertrophie der Corona strukturell bestätigen zu können, wurde der Überexpressionsstamm elektronenmikroskopisch untersucht. Die Elektronenmikroskopie der GFP-CP148 überexprimierenden Zellen zeigt die starke Vergrößerung der Corona im Detail (Abbildung 8, Vergleich der Kontrolle A mit B, B').

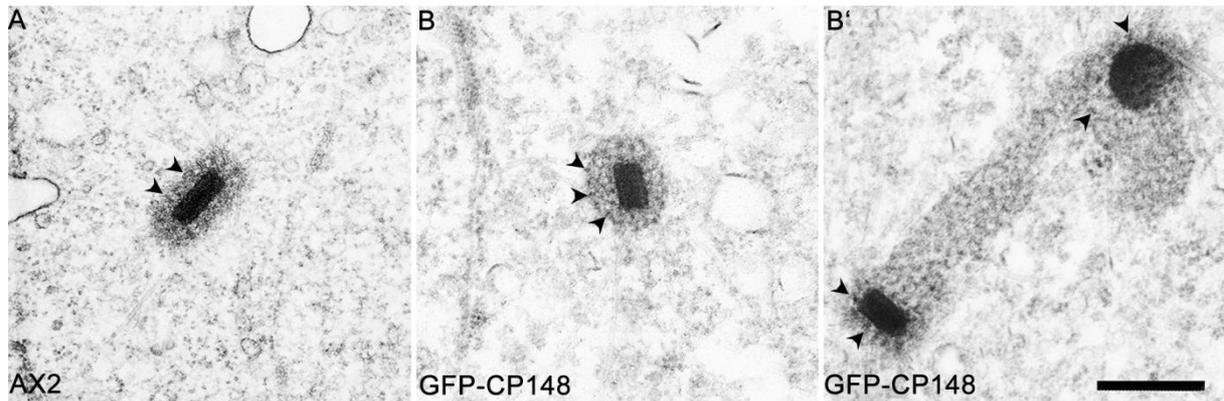


Abbildung 8: Elektronenmikroskopie GFP-CP148 exprimierender Zellen. Die Überexpression von GFP-CP148 verursacht eine Hypertrophie der Corona. Die Pfeile markieren beispielhaft elektronendichte Knötchen. Dargestellt sind ultradünn-Schnitte durch das Dictyostelium Centrosom in den AX2 Kontrollzellen (A) und GFP-CP148 überexprimierenden Zellen in (B, B'). Balken = 0,5 µm

In AX2-Zellen existiert in der Regel nur eine einlagige Schicht Elektronen-dichter Knötchen innerhalb einer amorphen Matrix (Corona) um den centrosomalen Core (Abbildung 8 A, Pfeilspitzen) [10]. Im GFP-CP148 Überexpressionsstamm ist der Core in eine stark erweiterte amorphe Matrix voller Knötchen eingebettet (Abbildung 8 B, B'; Pfeilspitzen). Der geschichtete centrosomale Core ist dagegen in den GFP-CP148 Überexpressionsstämmen auch auf ultrastruktureller Ebene mehr oder weniger unverändert (Abbildung 8 B, B'). Da die Knötchen γ -Tubulin enthalten [36] erklärt dies, warum die γ -Tubulin-Signale in den Immunfluoreszenzuntersuchungen in der gesamten vergrößerten Corona (Abbildung 6 B) verteilt sind.

2.1.5 GFP-CP148 zeigt keine signifikante Mobilität am Centrosom

Mit FRAP (fluorescence recovery after photo bleaching) Experimenten ist es möglich, die Mobilität von Fusionsproteinen zu untersuchen. Aus den Ergebnissen kann man zum Beispiel Rückschlüsse auf einen möglichen mobilen Proteinpool ziehen oder Hinweise auf die Proteinfunktion erhalten. Die Untersuchung der Mobilität von GFP-CP148 am Centrosom erfolgte in Interphase-Zellen. In diesen Experimenten konnte man keine Erholung („recovery“) des GFP-CP148 Signales über einen Zeitraum von 20 Minuten erkennen (Abbildung 9, Film 2).

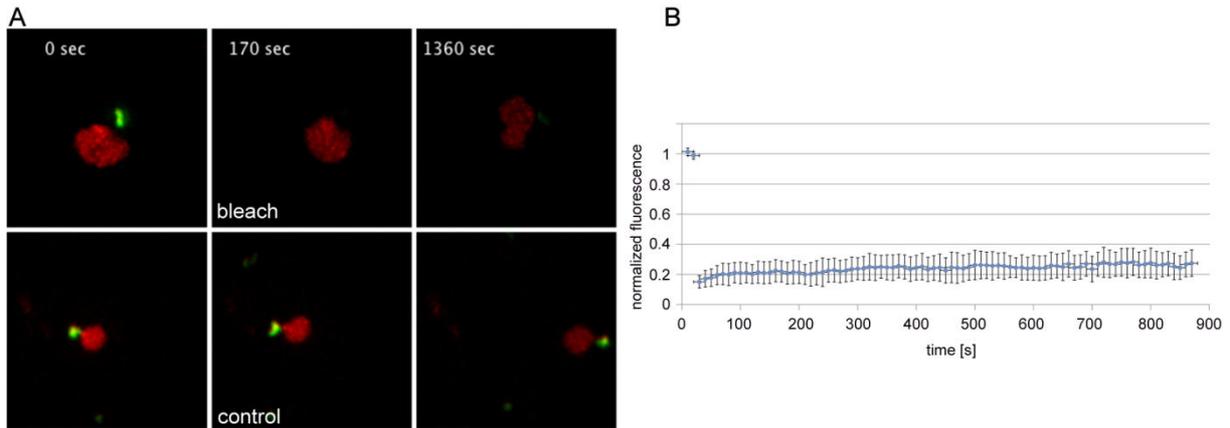


Abbildung 9: GFP-CP148 zeigt nahezu keine Rückkehr des GFP-CP148 Fluoreszenzsignals nach dem Bleichen. In (A) wurden verschiedene Zeitpunkte eines repräsentativen FRAP Experimentes mit GFP-CP148/mCherry-H2B Zellen ausgewählt. Das grüne GFP-CP148 Signal wurde mit einem punktfokussierten 473 nm Laser ausgebleicht (obere Bildreihe). Der Laserpuls erfolgte zum Zeitpunkt 170 s. Die untere Bildreihe zeigt, dass die Kontrollzelle vom Laserpuls unbeeinflusst bleibt. Die Aufnahmen erfolgten mit konfokaler Spinning Disk Mikroskopie; Zeitraffer der Akquisition betrug 6 Stacks pro Minute (bei einer Bildrate von 10 fr/s); maximale Intensitätsprojektion von 7 Ebenen pro Bildstapel. Die Grafik (B) zeigt die Erholungskinetik von GFP-CP148 FRAP Experimenten aus sechs unabhängigen Messungen (Mittelwert \pm S.D.).

Ein Einfluss von phototoxischen Effekten als Ursache für das Fernbleiben von GFP-CP148 kann ausgeschlossen werden, da die Kontrollzelle kein nennenswertes Ausbleichen des GFP-Signals zeigt. Damit verhält sich GFP-CP148 deutlich anders als die bisher untersuchten Corona-Komponenten, die eine Erholung innerhalb einer relativ kurzen Zeit zeigen. Der Corona-Marker CP224 besitzt zum Beispiel eine Erholungs-Halbwertszeit von nur 7,2 s [22]. Die Zellzyklus-abhängige Lokalisation, der Überexpressionsphänotyp mit der Verteilung aller Corona-Komponenten in der hypertrophen GFP-CP148 Struktur und das Ergebnis der FRAP Experimente deuten darauf hin, dass CP148 ein Gerüst für andere Corona-Proteine bilden könnte.

2.1.6 Eine verminderte CP148 Expression resultiert im Verlust des radialen Interphase Mikrotubuli Cytoskeletts

Um zu beweisen, dass CP148 als Gerüstprotein für den Zusammenbau der Corona dient und um einen besseren Einblick in weitere Funktionen des Proteins zu bekommen wurde die Expression von CP148 stark verringert. Da die Transformation eines GFP-CP148 Knockout-Konstrukts nach mehrmaligen Versuchen keine lebensfähigen Klone erbrachte, wurde ein stabiler CP148-RNAi Stamm auf Basis von AX2 generiert. Die Vorgehensweise beim Knockdown eines Proteins durch RNAi in Dictyostelium unterscheidet sich von der in höheren Organismen. Die einfache Transformation von siRNAs oder shRNAs zum Knockdown eines Proteins funktioniert in Dictyostelium nicht, so dass eine aufwendigere

Methode verwendet werden musste [8]. Ein Plasmid, das ein inverted-repeat-Konstrukt der Zielsequenz enthielt, wurde in die *Dictyostelium*-Zellen transformiert und integrierte sich dort ins Genom. Deshalb erfolgte eine stabile Expression des inverted-repeat-Konstrukts und damit häufig ein stabiler Knockdown des Zielproteins. Die Westernblot-Analyse in Abbildung 10 C zeigt eine nahezu vollständige Reduzierung des Proteinexpressionslevels vom endogenen CP148 im Vergleich zum Kontrollstamm AX2. Auch in Immunfluoreszenzanalysen konnte CP148 in den RNAi Stämmen nicht mehr nachgewiesen werden (Abbildung 10 A und B). Die CP148 RNAi-Zellen sind charakterisiert durch ein völlig ungeordnetes

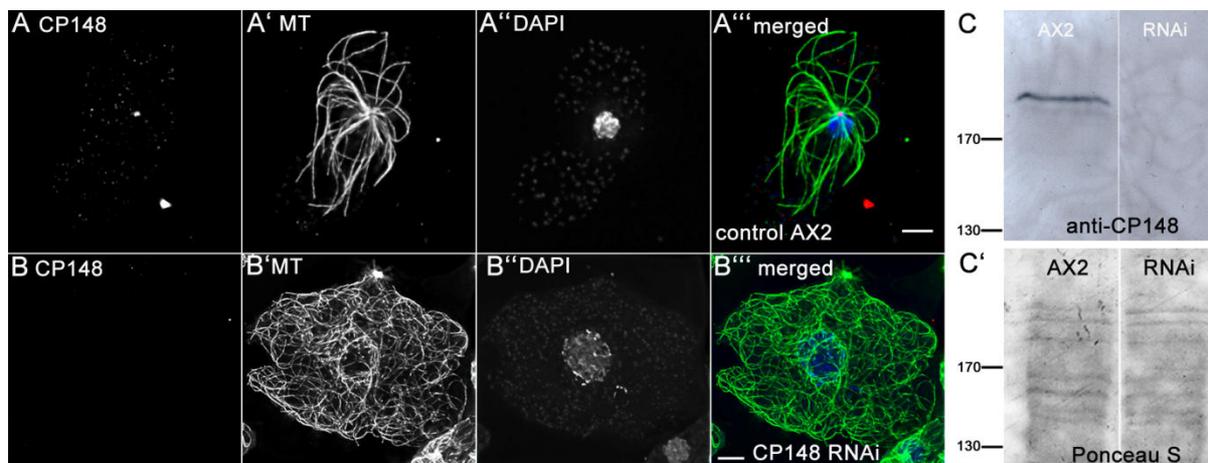


Abbildung 10: Nachweis des CP148 Knockdowns - mikroskopisch (A, B) und biochemisch (C). Die abgebildeten Interphase-Zellen (A, B) wurden mit Glutaraldehyd fixiert. CP148 ist in den CP148 RNAi-Zellen (B) nicht mehr nachweisbar. Die Kontrolle AX2 zeigt dagegen ein deutliches Signal von CP148 am Centrosom (A). Die CP148 RNAi-Zellen (B) und Kontrollzellen (A) wurden mit anti-Tubulin (MT) und anti-CP148 (A, B) gefärbt. Die überlagerten Bilder zeigen CP148 in rot, Mikrotubuli in grün und Kerne (DAPI) in blau. Der Balken beträgt in (A) 3 μm , in (B) 5 μm . Die Stärke des CP148 Knockdown auf Proteinebene ist in (C) dargestellt. Der Westernblot wurde mit anti-CP148 / anti-Kaninchen-Peroxidase und verstärkter Chemilumineszenz (ECL) gefärbt (C). (C') zeigt die entsprechende Proteinfärbung des gleichen Blots mit Ponceau S um zu zeigen, dass die gleiche Proteinmenge aufgetragen wurde.

Mikrotubuli-Cytoskelett sowie das Fehlen eines erkennbaren Centrosoms (Abbildung 10 B, Vergleich mit 10 A und Abbildung 11 A). Die Corona-Marker γ -Tubulin und CP224 sind nicht mehr konzentriert an einem klar erkennbaren Centrosom (Vgl. Abbildung 11 B und C mit Abbildung 11 D). In einigen Immunfluoreszenzfärbungen waren einzelne γ -Tubulin-Signale im Cytoplasma erkennbar, die jedoch nicht mit einem erkennbaren Centrosom korrelierten (Abbildung 11 B). Bei Färbungen der CP148 RNAi-Zellen mit dem Corona-Markerprotein CP224 sind dessen Signale in der ganzen Zelle verteilt und zeigen keine klare Konzentration in einen Punkt nahe des Zellkerns, wo das Centrosom zu erwarten wäre (Vergleich Abbildung 9 B' mit 9 D).

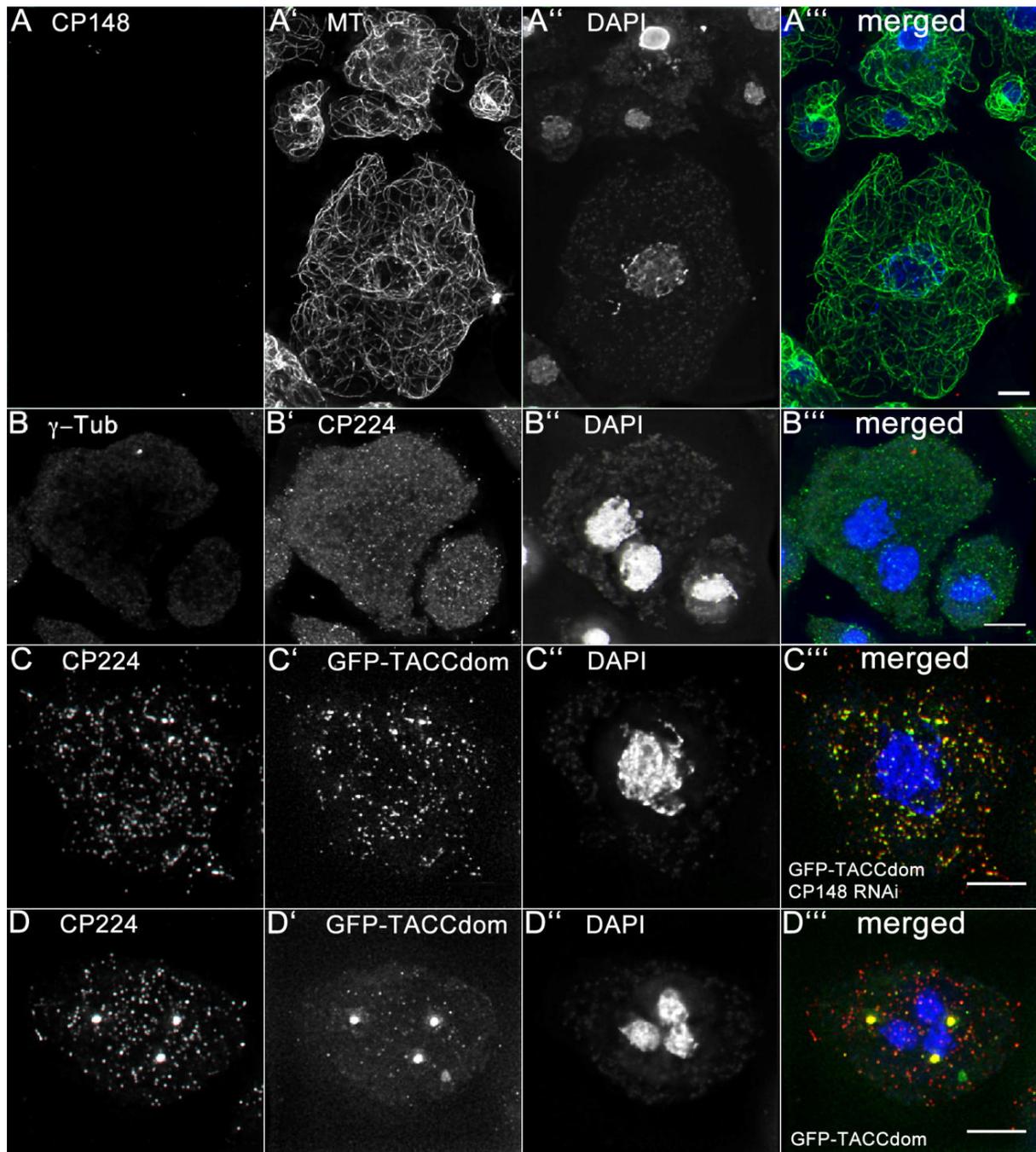


Abbildung 11: Phänotyp Analysen des CP148 RNAi. Der Knockdown von CP148 stört den Aufbau des radialen Mikrotubuli-Arrays (A) und verursacht eine erhöhte Anzahl von Mikrotubuli (+)-Enden (C, D). Die Corona Marker CP224 und γ -Tubulin korrelieren nicht mehr mit einem MTOC (B). CP148-RNAi-Zellen (A, B), GFP-TACC-Domäne Zellen mit CP148 RNAi (C) und GFP-TACC-Domäne Kontrollzellen (D) wurden mit Glutaraldehyd (A) oder Methanol (B, C, D) fixiert und mit anti-CP148 und anti- α -Tubulin (A, A'), anti- γ -Tubulin (B) und anti-CP224 (B, C, D) gefärbt. Die fusionierten Bilder (A'''-D''') zeigen Antikörper-Färbungen (A-D) in rot, GFP-Fluoreszenz (C', D') und Antikörper-Färbungen (A', B') in grün und die DNA (DAPI) (A''-D'') in blau. Balken = 5 μ m.

Die sichtbaren CP224 positiven Signale im Cytosol in Abbildung 11 B entsprechen mit großer Wahrscheinlichkeit Mikrotubuli-(+)-Enden, da sie nicht mit γ -Tubulin kolokalisieren. Dies weist auf einen Anstieg der Gesamtzahl einzelner freier Mikrotubuli aufgrund des CP148 RNAi hin. Um dies zu bestätigen, wurde das TACC-Protein als Mikrotubuli-(+)-Ende-

Marker hinzugezogen. Dafür erfolgte der Knockdown von CP148 in einem GFP-TACC-Domäne exprimierenden Stamm. Das TACC Protein rekrutiert CP224 als direkten Interaktor zu den Mikrotubuli-(+)-Enden. In Dictyostelium ist die GFP-TACC-Domäne der beste Mikrotubuli-(+)-Ende-Marker [22]. Bei einer gestiegenen Anzahl von Mikrotubuli-(+)-Enden sollte dies ebenso in der erhöhten Anzahl von GFP-TACC-Domäne Signalen erkennbar sein. Der Vergleich des GFP-TACC-Domäne-CP148-RNAi Stammes mit dem Kontrollstamm verdeutlicht klar den Anstieg an Mikrotubuli-(+)-Enden aufgrund des CP148 Knockdowns (Abbildung 11 C und D). Des Weiteren ist wiederum der Verlust des eines sichtbaren Centrosoms, welches in Kontrollzellen als großes CP224 Signal erkennbar ist (Abbildung 11 D, CP224 Färbung), zu erkennen (Abbildung 11 C).

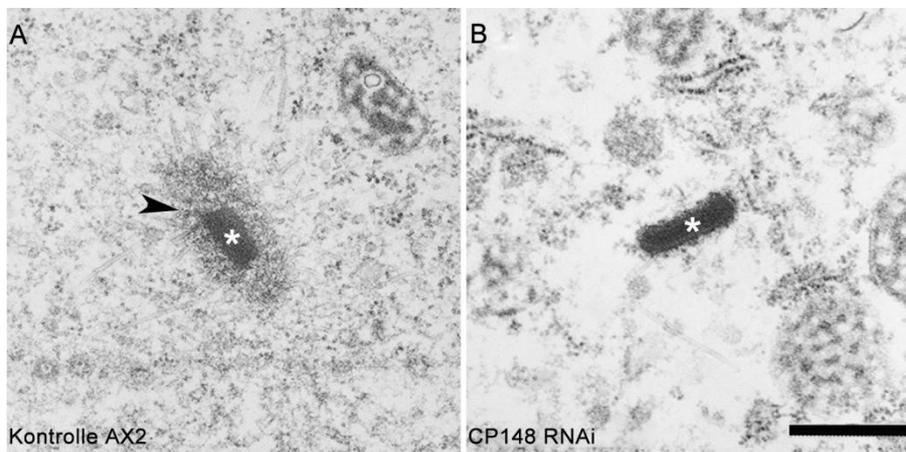


Abbildung 12: Gezeigt sind Ultradünnschnitte durch das Dictyostelium Centrosom in den AX2 Kontrollzellen (A) und CP148-RNAi-Zellen (B). Der Knockdown von CP148 führte zum Verlust der Corona. Der Core ist jeweils mit einem „*“ markiert. Elektronenmikroskopie Balken = 0,5 µm

Diese Ergebnisse deuten auf einen vollständigen Verlust der centrosomalen Corona durch den CP148 Knockdown hin. Um diese Vermutung zu überprüfen, wurden von den CP148 RNAi Stämmen ebenfalls Präparate für die Elektronenmikroskopie angefertigt. Die Analyse der Ultradünnschnitte bestätigte die Vermutungen, die auf Basis der Immunfluoreszenzanalysen aufgestellt wurden. In den Ultradünnschnitten konnte man im Cytosol einen centrosomalen Core (Abbildung 12 B „Sternchen“) erkennen, der eindeutig frei von der üblichen Corona mit ihren Elektronendichten Knötchen (Vergleich Abbildung 12 A Pfeilspitze mit B) war. Die Größe und das Erscheinungsbild des Core-Bereichs in CP148 RNAi-Zellen war mit dem der intakten Centrosomen in den Kontrollzellen vergleichbar (Abbildungen 12 A und 8 A).

2.1.7 Der CP148 Knockdown verursacht eine höhere Ploidie und unterbricht die Verbindung vom Centrosom zu den geclusterten Centromeren

Bei der Analyse der Immunfluoreszenzpräparate waren zudem eine Vergrößerung der Zellfläche und teilweise untypische DAPI-Färbungen auffällig. Die Quantifizierung der Zellfläche von CP148 RNAi-Zellen im Vergleich zu Wildtypzellen ergab eine Größenzunahme um den Faktor zwei bis fünf (Abbildung 13 A). Darüber hinaus deuteten die DAPI-Färbungen häufig auf eine durch CP148-RNAi verursachte Aneuploidie hin. Um dieses Ergebnis genauer zu untersuchen, wurde die CP148-Expression ebenfalls in GFP- α -Tubulin exprimierenden Dictyostelium Zellen durch RNAi vermindert. Um genau gleiche Färbbedingungen gewährleisten zu können, wurde dieser neu generierte Knockdown Stamm für die Immunfluoreszenz-Mikroskopie im gleichen Verhältnis mit AX2 Zellen gemischt. erhöht war.

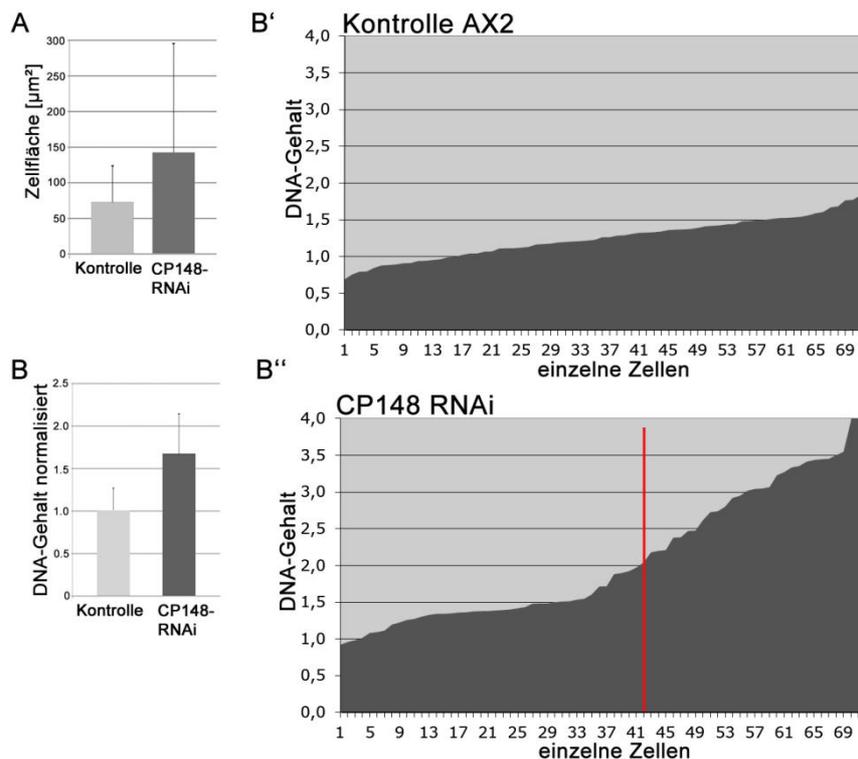


Abbildung 13: CP148-RNAi resultiert in einer Vergrößerung der Zellfläche (A) sowie einen erhöhten DNA-Gehalt (B', B''). Um den DNA-Gehalt von AX2 und GFP- α -Tubulin/CP148-RNAi-Zellen bestimmen zu können, wurden beide Stämme 1:1 gemischt und mit anti-CP148 gefärbt (Alexa 568 anti-Kaninchen). Die AX2 Zellen konnten nun anhand des fehlenden Tubulin und des roten CP148 Signals von den RNAi-Zellen mit grünem Tubulin und ohne CP148 unterschieden werden. (A) Die Fläche der Zellen im Phasenkontrastbild wurde als Maß für die Größe der Zellen verwendet. Mittelwerte \pm S.D. sind angegeben. AX2 Zellen zeigten im Mittel eine Fläche von $73 \mu\text{m}^2$ ($n = 114$),

CP148 RNAi-Zellen dagegen $143 \mu\text{m}^2$ ($n = 199$). (B-B'') Der DNA-Gehalt wurde als Produkt aus gemessener Kernfläche [μm^2] und Intensität der DAPI-Färbung (16-Bit Graustufen) berechnet. Die Werte wurden auf den Mittelwert von AX2 Zellen (=1) normalisiert und als Diagramm in (B) dargestellt. Die Grafiken in (B', B'') zeigen den normalisierten DNA Gehalt jeder einzelnen Zelle (y-Achse) der nach steigender Größe (x-Achse) angeordnet wurde ($n=72$). Der Vergleich der beiden Diagramme (B' und B'') zeigt einen erhöhten Anteil von Zellen mit aberranter Ploidie bei CP148-RNAi-Zellen. CP148 RNAi-Zellen, die rechts des roten Balkens liegen (B''), weisen einen mehr als doppelten DNA-Gehalt im Vergleich zum normalisierten Mittelwert der AX2 Zellen auf.

Anhand der fehlenden, grün fluoreszierenden Mikrotubuli konnte AX2 leicht vom CP148 RNAi Stamm unterschieden werden. Der Vergleich der DAPI-Färbungsintensitäten von

RNAi und AX2 Zellen in der gleichen Probe ergab, dass der DNA-Gehalt pro Zellkern in CP148 RNAi/GFP- α -Tubulin-Zellen im Durchschnitt um den Faktor 1,7 (Abbildung 13 B) Aufgrund der hohen Standardabweichung und um einen besseren Überblick über den DNA-Gehalt einzelner Zellen zu erlangen, wurden die einzelnen Zellen entlang ihres zunehmenden DNA-Gehalts in einem Koordinatensystem sortiert (Abbildung 13 B' und B''). In dieser Darstellung ist erkennbar, dass 42 % (Abbildung 13 B'', recht der roten Markierung) aller CP148 RNAi/GFP- α -Tubulin-Zellen einen DNA-Gehalt besitzen, der mehr als das zweifache höher ist als der durchschnittliche DNA-Gehalt der Kontrollzellen (Abbildung 13 B'' und B'). In der S-Phase erfolgt die Verdopplung der Chromosomen. Wenn die Zellen für längere Zeit in der S-Phase verbleiben, wäre ein doppelter DNA-Gehalt bei vielen RNAi-Zellen, im Vergleich zur Kontrolle AX2, zu erwarten. Da aber ca. 42 % der CP148 RNAi-Zellen einen mehr als zweifachen DNA-Gehalt besitzen, ist die Ursache nicht auf einen längeren Verbleib der CP148 RNAi-Zellen in der S-Phase, sondern eine erhöhte Ploidie zurückzuführen. Eine Grund könnten dafür Probleme bei der Chromosomensegregation infolge des CP148-RNAi sein. Bei einer erhöhten Ploidie sollte man im Vergleich zu Kontrollzellen eine größere Anzahl an Centromeren erwarten. Deshalb wurden CP148 RNAi-Zellen auch mit Antikörpern gegen das Centromer-Markerprotein Cenp68 [41] gefärbt. Diese Färbungen zeigten eine Verteilung der Centromere über den ganzen Zellkern von CP148 RNAi Interphase-Zellen (Abbildung 14 D). In Kontrollzellen liegen die Centromere normalerweise während des gesamten Zellzyklus geclustert vor und stehen permanent über die Kernhülle hinweg mit dem Centrosom in Verbindung (Abbildung 14 C) [43, 62]. Dies zeigt, dass CP148 in der Interphase einen Einfluss auf die Centrosomen-Zellkern-Centromer-Verbindung haben könnte. Sun1, ein Transmembranprotein der Kernhülle in Dictyostelium [43, 63], ist ein wesentlicher Bestandteil dieser Verbindungsstruktur. Deshalb wurden die RNAi-Zellen auf eine Veränderung der Lokalisation von Sun1 in der Kernhülle untersucht. In Wildtypzellen lokalisiert Sun1 konzentriert in der pericentrosomalen Region des Zellkerns. Die CP148 RNAi-Zellen zeigten dagegen eine gleichmäßige Verteilung von Sun1 in der gesamten Kernhülle (Abbildung 14 A, B).

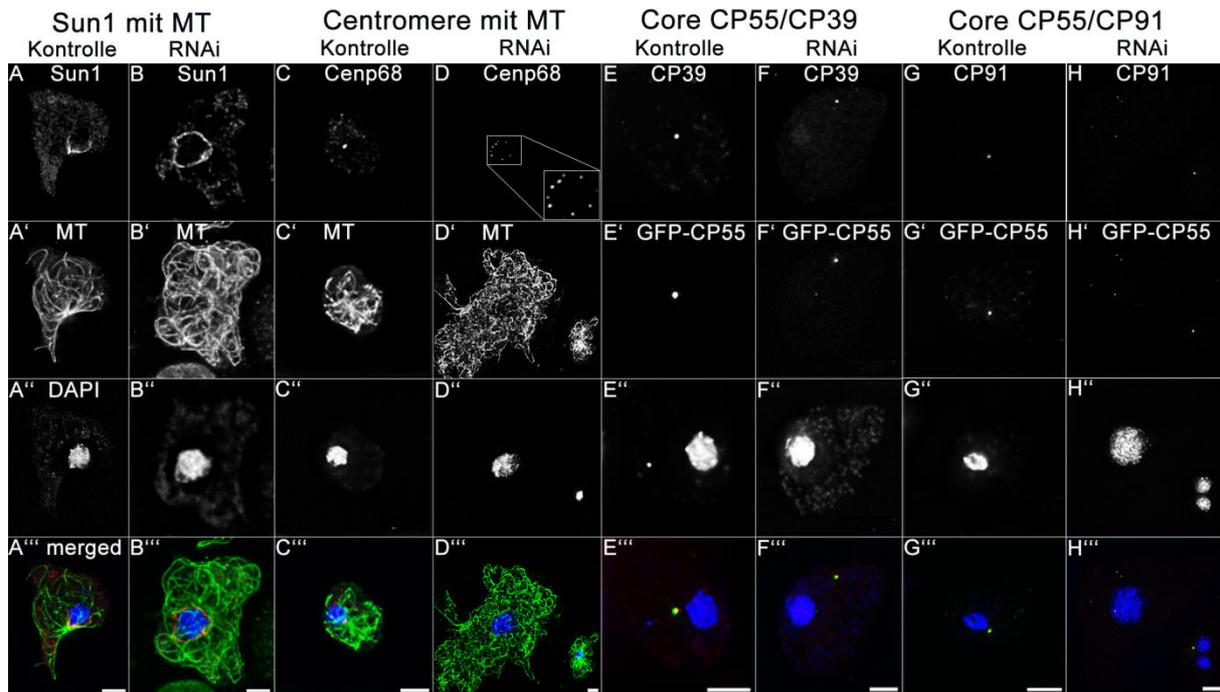


Abbildung 14: CP148 RNAi verursacht eine Verteilung von Sun1 in der Kernhülle, die Dispersion der Centromere und damit eine Störung der Centrosomen-Kern-Centromer Verbindung. Die CP148 Expression wurde mittels RNAi in AX2 (B, D) und in GFP-CP55-Zellen (F, H) vermindert. Für jede Antikörperfärbung sind die entsprechenden Kontrollzellen gezeigt (A, C, E, G). Die Zellen wurden mit Glutaraldehyd (A, B) oder Methanol (C-H) fixiert und mit anti-Sun1 (A, B), dem Centromer Marker anti-Cenp68 (C, D), anti-CP39 (E, F), anti-CP91 (G, H) und anti-Tubulin (A'-D') gefärbt. Die überlagerten Bilder (A'''-H''') zeigen die Antikörperfärbungen mit AlexaFluor 568-Konjugaten in rot, GFP-Fluoreszenz (E'-H') und Antikörperfärbungen mit AlexaFluor 488-Konjugaten in grün (A'-D'). Die DNA Färbung (DAPI) ist (A''-H'') in blau dargestellt. Balken = 3 µm.

Einen Einfluss von CP148 in der Aufrechterhaltung der Centrosom-Kern-Verknüpfung wurde auch durch die Tatsache unterstützt, dass die centrosomalen Core Komponenten CP55, CP91 und CP39 [58] in einzelnen oder mehreren Immunfluoreszenz Signalen, oft losgelöst vom Zellkern, sichtbar waren (Abbildung 14 F''', H'''). Die Kolokalisation der centrosomalen Core-Komponenten stimmt mit den ultrastrukturellen Daten der Elektronenmikroskopie überein und zeigt, dass die centrosomale Core-Region als eine intakte strukturelle Einheit in CP148 RNAi-Zellen vorliegt (Abbildung 12 B, „Sternchen“). Das Fehlen einer erkennbaren Corona, während die centrosomalen Core-Komponenten intakt und häufig losgelöst vom Kern erscheinen, die Dispersion der geclusterten Centromere und die Aufhebung des pericentrosomalen Lokalisierungsmusters von Sun1 zeigen, dass CP148 für die Aufrechterhaltung der Centrosom-Zellkern-Verbindung notwendig ist.

2.1.8 CP148 RNAi hat keinen Einfluss auf die Ausbildung einer zentralen Spindel und astraler Mikrotubuli

Dieser starke, anormale Phänotyp des CP148 Knockdowns mit einem völlig unorganisierten Mikrotubuli Cytoskelett wirft natürlich die Frage auf, wie diese Zellen überleben und sich über mehrere Generationen teilen können. Um diese Fragestellung zu klären wurde das mitotische Verhalten lebender CP148 RNAi/GFP- α -Tubulin-Zellen durch konfokale-Spinning-Disk-Mikroskopie untersucht. Abbildung 15 und Film 3 zeigen zwei Zellen, die sich aus dem G2 Stadium in die Mitose (M) begeben und anschließend die Cytokinese vollführen. Beim G2/M Übergang wird das ungeordnete Mikrotubuli-Cytoskelett, das kein erkennbares Centrosom besitzt, vollständig abgebaut. Übrig bleibt nur ein heller Punkt (obere linke Zelle zum Zeitpunkt 540 s und unteren linken Zelle zum Zeitpunkt 3165 s), der sich anschließend teilt und die beiden Pole einer zentralen Spindel bildet. Dies zeigt, dass der anfängliche helle Punkt dem Prophase-Centrosom entsprechen muss. Später in der Anaphase werden auch die astralen Mikrotubuli sichtbar.

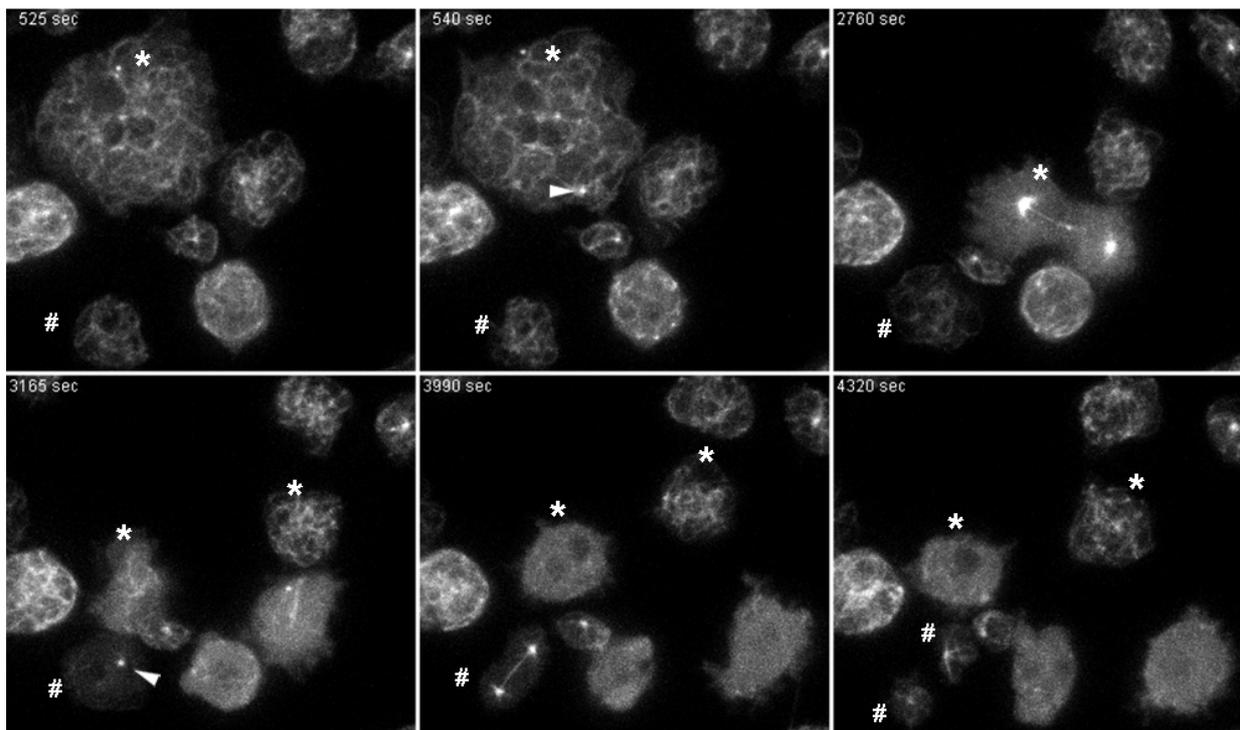


Abbildung 15: Mitose bei lebenden GFP- α -Tubulin/CP148-RNAi-Zellen. Dargestellt sind ausgewählte Zeitpunkte aus dem Film 3. Die beiden mitotischen Zellen und ihre Tochterzellen sind mit (*) und (#) gekennzeichnet. Die Pfeile markieren die Bildung des Spindelpols beim Eintritt in die Prophase. Nach Verdopplung dieses Prophase MTOCs entsteht eine bipolare Spindel, die auch astrale Mikrotubuli organisiert. Während der Cytokinese zerfällt erneut die radiale Anordnung des Mikrotubuli Cytoskeletts. Die Aufnahmen erfolgten mit konfokaler-Spinning-Disk-Mikroskopie; Zeitraffer der Akquisition betrug 4 Stacks pro Minute (bei einer Bildrate von 10 fr/s); maximale Intensitätsprojektion von 7 Ebenen pro Bildstapel.

Das Erscheinungsbild des bipolaren Mikrotubuli-Cytoskeletts durch die Mitose bis hin zur Cytokinese ist kaum von AX2 Zellen zu unterscheiden, die nur GFP- α -Tubulin (siehe [22] für ein Beispiel) exprimieren. Der Unterschied zu Wildtypzellen ist erst nach der Cytokinese erkennbar. Sofort nach deren Abschluss (obere Zelle bei 2895 s) zerfällt das ursprünglich radiale Mikrotubuli-Cytoskelett und resultiert in den ungeordneten Mikrotubulistrukturen der CP148RNAi/GFP- α -Tubulin Interphase-Zellen.

Dieses Ergebnis zeigt deutlich, dass CP148 nur für die Organisation des radialen Mikrotubuli-Cytoskeletts in Interphase-Zellen, aber nicht für die Organisation der zentralen Spindel und der astralen Mikrotubuli in Dictyostelium erforderlich ist.

2.1.9 GFP-CP148 Δ N kompensiert den Phänotyp der ungeordneten Mikrotubuli

Zur funktionellen Analyse von CP148 wurde überprüft, ob bereits Teile des Proteins die Funktion des fehlenden Vollängenproteins im CP148 RNAi Stamm kompensieren können. Dazu wurde ein GFP-CP148 Δ N Konstrukt in den CP148 RNAi Stamm. Diesem Konstrukt fehlen die ersten 440 bp der kodierenden CP148 Sequenz (von 1-440 bp) und damit genau der Teil, der für das CP148 RNAi Konstrukt verwendet wurde.

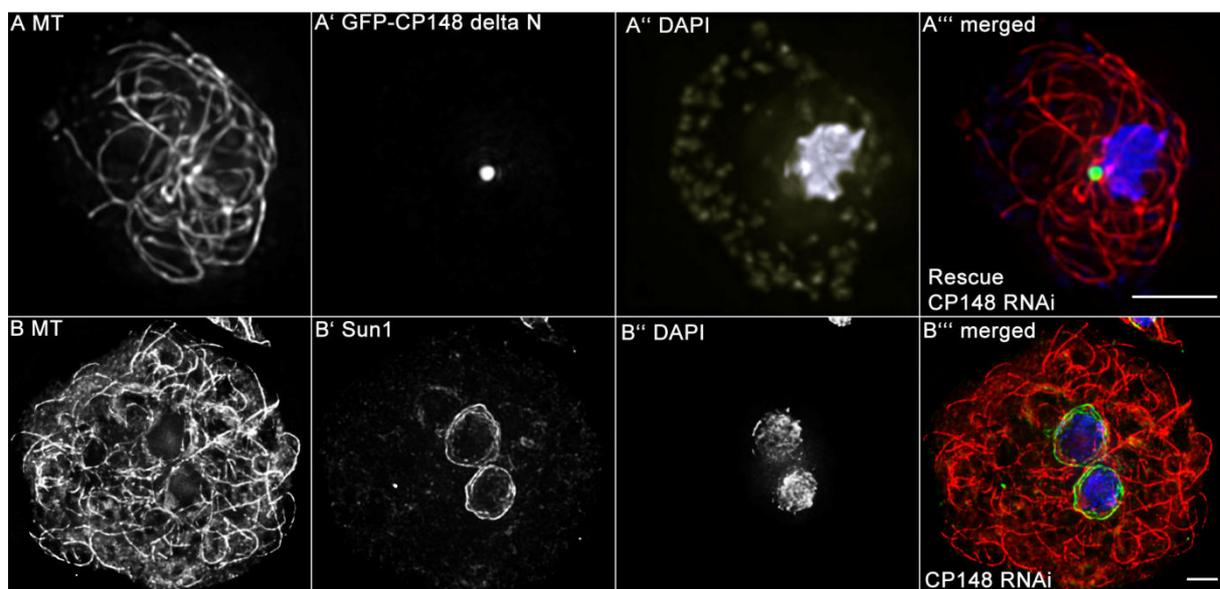


Abbildung 16: Die Transformation eines GFP-CP148 Δ N Konstrukts in den CP148 RNAi Stamm zeigt eine centrosomale Lokalisation. Das GFP-CP148 Δ N Konstrukt hebt den Phänotyp des ungeordneten Mikrotubuli Cytoskeletts auf. Die „Rescue“-Zellen (A) zeigen ein radiales Interphase Mikrotubuli Cytoskelett. Die Fixierung erfolgte mit Glutaraldehyd und in (A) und (B) mit anti - α Tubulin (rot) gefärbt. Die GFP-Fluoreszenz ist in grün dargestellt (A'). (B') zeigt die Färbung mit anti-Sun1 in grün. In beiden Zellen ist die DNA in blau (DAPI) dargestellt. Balken = 3 μ m.

In diesem fehlenden Teilbereich von 440 bp befindet sich keine coiled-coil Domäne sowie lediglich nur eine der fünf potentiellen CDK1 Phosphorylierungsstellen. Bei der Expression in CP148 RNAi-Zellen lokalisiert GFP-CP148 Δ N genauso wie das endogene Protein am Centrosom und die Zellen zeigen im Gegensatz zu den CP148 RNAi-Zellen in Abbildung 16 B wieder ein radial angeordnetes Mikrotubuli Cytoskelett. Somit weist dieses Konstrukt denselben Phänotyp wie im Kontrollstamm AX2 auf. Erstaunlicherweise scheint der fehlende N-terminus bezüglich der untersuchten Kriterien keine wichtige Funktion für CP148 zu besitzen. Ein Vergleich mit der in Abbildung 16 B abgebildeten CP148RNAi Zelle, die am Tag der Transformation fixiert und aufgenommen wurde, zeigt deutlich, dass die Expression des GFP-CP148 Δ N Konstrukts den Phänotyp des ungeordneten Mikrotubuli Cytoskeletts im CP148 RNAi Stamm aufhebt. Die „Rescue“-Zellen besitzen demnach wieder eine Corona, was auch an dem GFP-Signal in Abbildung 16 A‘ deutlich erkennbar ist. Zudem zeigen die „Rescue“-Zellen eine Zellgröße auf Wildtypniveau und sind damit deutlich kleiner als die CP148 RNAi-Zellen (siehe Maßstabsbalken in Abbildung 16).

2.2 Ergebnisse CP55

CP55 (dictybase geneID DDB_G0290509) ist ein saures 55.8 kDa-Protein (pI = 5.5) mit einer Länge von 470 Aminosäuren (AS). Untersuchungen der Aminosäuresequenz mit BLAST ergaben keine auffallenden Ähnlichkeiten zu Proteinen in anderen Organismen. In der bereits oben erwähnten Studie zu neuen centrosomalen Proteinen konnte GFP-CP55 an mikrotubuli-freien Centrosomen als Komponente des Core identifiziert werden [41]. Die Funktionen von CP55 und das Zellzyklus-abhängige Verhalten des endogenen Proteins wurden jedoch in dieser Studie nicht untersucht.

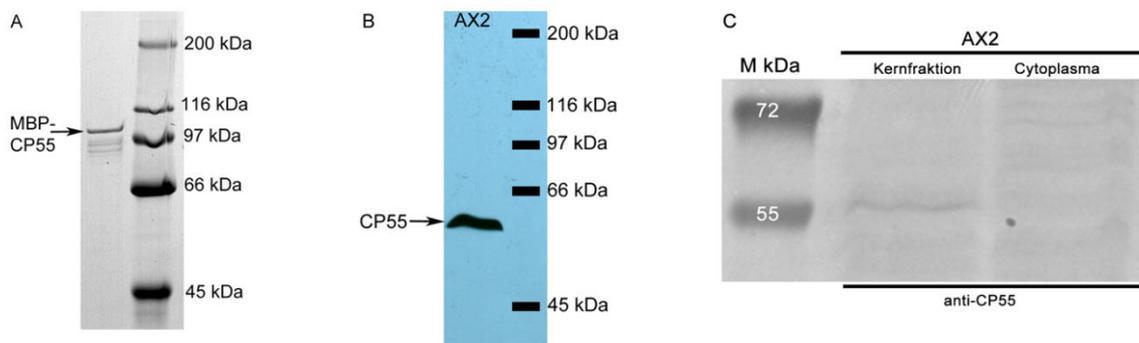


Abbildung 17: Aufreinigung des α -CP55 Serums. Der aufgereinigte CP55 Antikörper erkennt eine einzelne Bande von ca. 55 kDa. (A) Expression des volllänge CP55 als MBP Fusionsprotein in *E.coli* DH5 α . MBP-CP55 wurde aufgereinigt, mittels SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie gefärbt. Die Bande bei ca. 100 kDa entspricht MBP-CP55. Der aufgetragene Standard ist rechts bezeichnet. (B) Nachweis des endogenen CP55 mit dem aufgereinigten CP55 Antikörper. AX2 Gesamtzell Extrakt wurde in einer SDS-PAGE aufgetrennt und per Westernblot analysiert. Das Molekulargewicht des Standards ist rechts aufgetragen. (C) zeigt den Vergleich der Kern- mit der Cytoplasmafraktion von CP55 in AX2. Das endogene Protein ist nur in der Kernfraktion (Signal bei 55 kDa) und nicht im Cytoplasma enthalten.

Deshalb erfolgte zuerst die Erzeugung eines polyklonalen Antikörpers gegen ein MBP-CP55 Fusionsprotein. Da das daraus resultierende Antiserum unspezifische Signale in der Immunfluoreszenz-Mikroskopie sowie im Westernblot zeigte, wurde es über eine Affinitätssäule aufgereinigt. In anschließenden Westernblot-Analysen von Dictyostelium AX2 Gesamtzellextrakten markierte der Antikörper eine deutliche Bande bei ca. 55 kDa, entsprechend der errechneten molekularen Masse des endogenen CP55 Proteins (Abbildung 17 B). Der aufgereinigte Antikörper wurde für die Immunfluoreszenz-Mikroskopie des endogenen Proteins in AX2 Zellen und weitere Analysen verwendet.

2.2.1 CP55 ist ein neues centrosomales Protein der Core-Region und Spindelpole

Die Bestimmung der subzellulären Lokalisation des endogenen CP55 Proteins erfolgte durch Immunfluoreszenzanalysen mit dem gereinigten polyklonalen CP55 Antikörper (Abbildung 18 B).

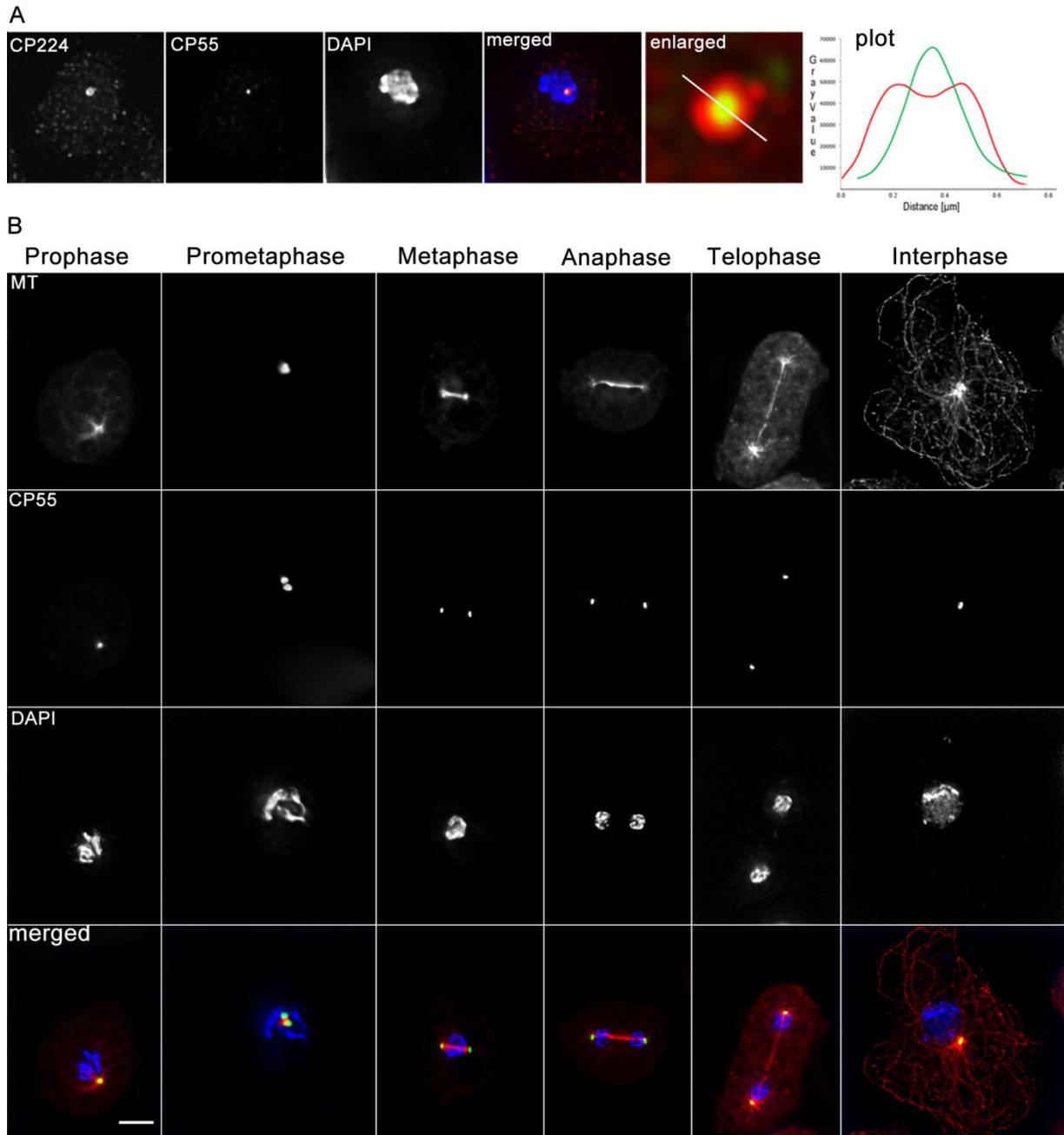


Abbildung 18: Lokalisation des endogenen CP55 Proteins während des Zellzyklus. CP55 lokalisiert in der centrosomalen Core-Region (A) und zeigt keine Regulation beim Durchlaufen des Zellzyklus. AX2-Zellen wurden mit Methanol fixiert und mit anti-CP55 in grün, anti-Tubulin (MT) in rot und die DNA in blau mit DAPI gefärbt. Die Zellzyklusstadien und Färbungen sind jeweils angegeben. Balken = 3 μm .

Die Analyse des CP55 Signals mittels konfokaler Mikroskopie in Interphase-Zellen ergab, dass CP55 zur centrosomalen Core-Region gehört. Dafür spricht die punktförmige Färbung von CP55, welche sich zentral innerhalb des ringförmigen Signals des Corona-Markers CP224 befindet (Abbildung 18 A). Die Untersuchung des CP55 Spots erfolgte zusätzlich mit der Plot Profile Funktion von ImageJ (Abbildung 18 A, Plot). In diesem Diagramm ist CP55 in grün und CP224 in rot dargestellt. CP224 zeigt als Protein der Corona wie erwartet zwei Maxima entlang einer Querschnittslinie durch das Centrosom (Abbildung 18 A, Plot rot). Der grüne Kurvenverlauf von CP55 besitzt dagegen nur ein Maximum, welches sich genau mittig zwischen den beiden CP224 Maxima befindet. Das bedeutet, dass CP55 im centrosomalen Core lokalisiert. Zudem lokalisiert das endogene CP55 während des gesamten Zellzyklus am Centrosom (Abbildung 18 B, Prophase bis Interphase, CP55 Färbung). Beim Übergang von G2 zur Mitose verbleibt CP55 in der zentralen Core-Region (Abbildung 18 B, Prophase) wogegen die Corona und Mikrotubuli zu diesem Zeitpunkt abdissoziieren [19, 61]. In der Prometaphase, in der sich die zentrale Schicht der Core-Region zurückbildet und eine Trennung der beiden äußeren Schichten erfolgt, ist CP55 als Doppelsignal an den sich bildenden Spindelpolen erkennbar. Das Protein verbleibt während der gesamten Mitose an den beiden Spindelpolen (Abbildung 18 B, Prophase bis Telophase). Die beiden Spindelpole erscheinen von der Prometa- bis zur Telophase als balkenförmiges Signal. Ihren Ursprung haben sie mit großer Wahrscheinlichkeit in den beiden äußeren Schichten des Core-Bereichs [46]. Aufgrund des balkenförmigen Signales von CP55 in der Mitose (Prometa-, Meta-, Ana-, Telophase) und das Verbleiben am Centrosom könnte es in den beiden äußeren Schichten der centrosomalen Core-Region lokalisieren.

2.2.2 Das GFP-Fusionsprotein zeigt dieselbe Dynamik im Zellzyklus wie das endogene CP55

Aus der Untersuchung von Schulz *et al.* [41] war bekannt, dass das GFP-CP55 Fusionsprotein in der Metaphase am Centrosom lokalisiert. Weitere Mitosestadien wurden in dieser Studie aber nicht untersucht. GFP-CP55 zeigt im Zellzyklus dasselbe Verhalten wie das endogene Protein. Wie man in Abbildung 19 erkennen kann, ist GFP-CP55 über den gesamten Zellzyklus am Centrosom bzw. an den beiden Spindelpolen präsent. Da die Signale in der Prometa-, Meta- und Anaphase ebenfalls balkenförmig sind, ist anzunehmen, dass sich auch das Fusionsprotein in den äußeren Lagen der centrosomalen Core-Region befindet.

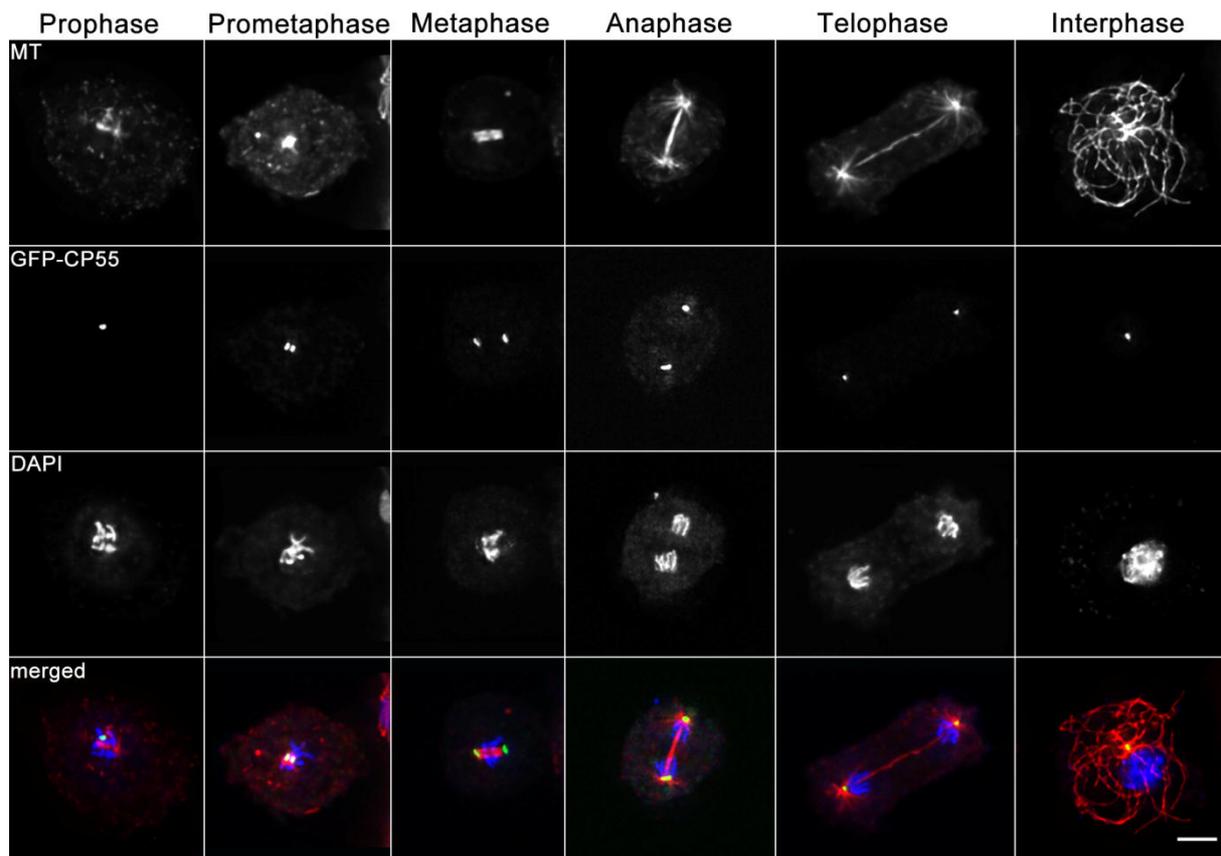


Abbildung 19: GFP-CP55 verbleibt während der gesamten Mitose am Centrosom. GFP-CP55 Zellen wurden mit Glutaraldehyd fixiert und mit anti-Tubulin (MT) in rot und die DNA mit DAPI (blau) gefärbt. Die GFP-Fluoreszenz ist in grün dargestellt. Die Zellzyklus-Phasen und Färbungen sind angegeben. Balken = 3 μ m.

2.2.3 Die Überexpression von GFP-CP55 erzeugt überzählige Centrosomen

Das Aufdecken von Proteinfunktionen kann unter anderem durch Überexpression des entsprechenden Proteins erfolgen. Zum einen vermag die Anhebung der Expressionsrate und somit die Menge des Proteins für biochemische Untersuchungen, wie zum Beispiel Interaktionsstudien mittels Pull-down-Assays, nützlich sein. Zum anderen kann es zu phänotypischen Veränderungen im Organismus oder in der Zelle führen, aus denen man erste Hinweise für Proteinfunktionen ableiten kann. Die Überexpression (ca. 6-fach im Vergleich zum endogenem CP55 siehe Abbildung 20 E) des GFP-CP55 Fusionsproteins in *Dictyostelium* führte zum Auftreten überzähliger Centrosomen. Circa 45 % dieser Zellen zeigten solche überzähligen Centrosomen, die Mikrotubuli nukleierten und entweder kernassoziiert oder frei im Cytoplasma vorlagen (Abbildung 20 D, Diagramm GFP-CP55; N < C). Am stärksten zeigte sich dieser Phänotyp kurz nach der Transformation von AX2 Zellen mit einem GFP-CP55 Konstrukt.

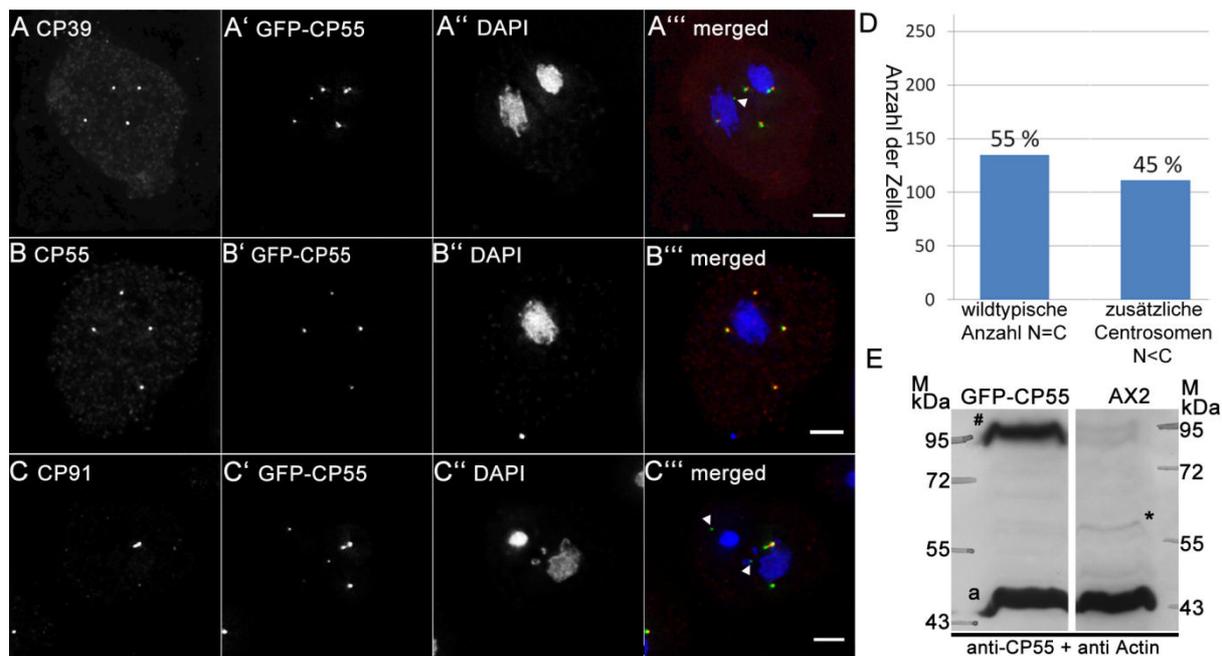


Abbildung 20: GFP-CP55 Überexpression. Immunfluoreszenzanalysen der GFP-CP55 Foci mit Core Antikörpern in (A) bis (C) und quantitative Auswertung der überzähligen Centrosomen in (D). (E) zeigt in einem Westernblot das Ausmaß der GFP-CP55 Überexpression. Die in (A) bis (C) dargestellten GFP-CP55 Interphase-Zellen wurden mit Methanol fixiert und mit anti-CP39 (A), anti-CP55 (B) und anti-CP91 (C) in rot gefärbt. GFP-CP55 ist in grün, die DNA-Färbung mit DAPI in blau dargestellt. Die weißen Pfeilspitzen in (A''') und (C''') markieren GFP-CP55-Foci die keine Kolokalisation mit den Antikörperfärbungen zeigen. Der Balken beträgt 3 μm . Das Diagramm (D) zeigt die Auswertung der überzähligen Centrosomen bei GFP-CP55 Überexpression. Zur Auszählung wurden Immunfluoreszenzpräparate hergestellt, die mit Glutaraldehyd fixiert und mit anti-Tubulin in rot ($n=246$). (E) Überexpression von GFP-CP55 im Vergleich zum endogenen CP55 in AX2. Mit „a“ ist das Signal der Ladekontrolle Aktin bei ca. 45 kDa gekennzeichnet. * markiert das endogene CP55, # das Signal von GFP-CP55. In den Westernblot-Analysen wurde mit anti-CP55 und anti-Aktin sowie Meerrettichperoxidase/ECL gefärbt. Die jeweiligen Größen des Standards sind angegeben.

Nach drei bis vier-wöchiger Kultivierung nahm er jedoch wieder bis auf Wildtypniveau ab (Anzahl der Kerne ist gleich Anzahl der Centrosomen; $N = C$, Abbildung 20 D). In der Immunfluoreszenz-Mikroskopie konnten bei der Mehrheit der überzähligen GFP-CP55 Signale sowohl die centrosomalen Proteine CP39, CP55, CP91, CP224 und γ -Tubulin als auch die Mikrotubuli-Organisation nachgewiesen werden (Abbildung 20 A-C und Abbildung 21). Somit deutet Alles darauf hin, dass es sich bei den überzähligen MTOCs um vollständige Centrosomen handelt. Die Kolokalisation mit CP91 und CP39 spricht zusammen mit CP55 für eine intakte Core-Region. Da sich die überzähligen Centrosomen an der Basis radialer Mikrotubuli-Arrangements befinden (Abbildung 21 A) sowie CP224 und γ -Tubulin enthalten, spricht das für eine intakte Corona, die ähnlich wie die im Wildtyp aufgebaut sein könnte. Die Lokalisation der Kernhüllenproteine Sun1 und NE81 war von der GFP-CP55 Überexpression unbeeinflusst. Das laminartige NE81 lokalisierte in GFP-CP55 Stämmen wie in Wildtypzellen [44] homogen verteilt entlang der inneren Kernhülle (Abbildung 21 D). Sun1 zeigte wie in AX2 Zellen eine Konzentration des Signals im pericentrosomalen Bereich des

Zellkerns, sowie an der Verbindung vom Zellkern zum Centrosom (Abbildung 21 E, Pfeil). Die Färbung gegen den Centromermarker Cenp68 wies ebenfalls auf einen Wildtyp-ähnlichen Zustand der geclusterten Centromere in GFP-CP55 überexprimierenden Zellen hin (Abbildung 21 C). Im Falle von gelegentlich auftretenden kernassoziierten überzähligen Centrosomen in GFP-CP55 Zellen wurde mit dem Cenp68 Antikörper eine entsprechend erhöhte Zahl an Centromerclustern nachgewiesen (Abbildung 21 C““ Pfeile). Ob die Duplikation des Cenp68 Signals in einem Zellkern mit zwei kernassoziierten Centrosomen die Folge einer erhöhten Ploidie oder eine Verteilung der Chromosomen auf die Anzahl kernassoziiertter Centrosomen ist, konnte in den bisherigen Untersuchungen nicht eindeutig geklärt werden. Neben den GFP-CP55 Signalen mit vollständiger centrosomaler Proteinausstattung und Mikrotubuli-Nukleation traten lediglich vereinzelte, meist kleine GFP-Dots im Cytoplasma auf. Diese Signale zeigten keine Kolo-kalisation mit CP39 und CP91 (Abbildung 20 A““ und C““ Pfeilspitzen) und keine Mikrotubuli-Nukleation. Bei diesen Signalen handelte es sich daher vermutlich um freie GFP-CP55 Aggregate im Cytoplasma und nicht um zusätzliche Centrosomen.

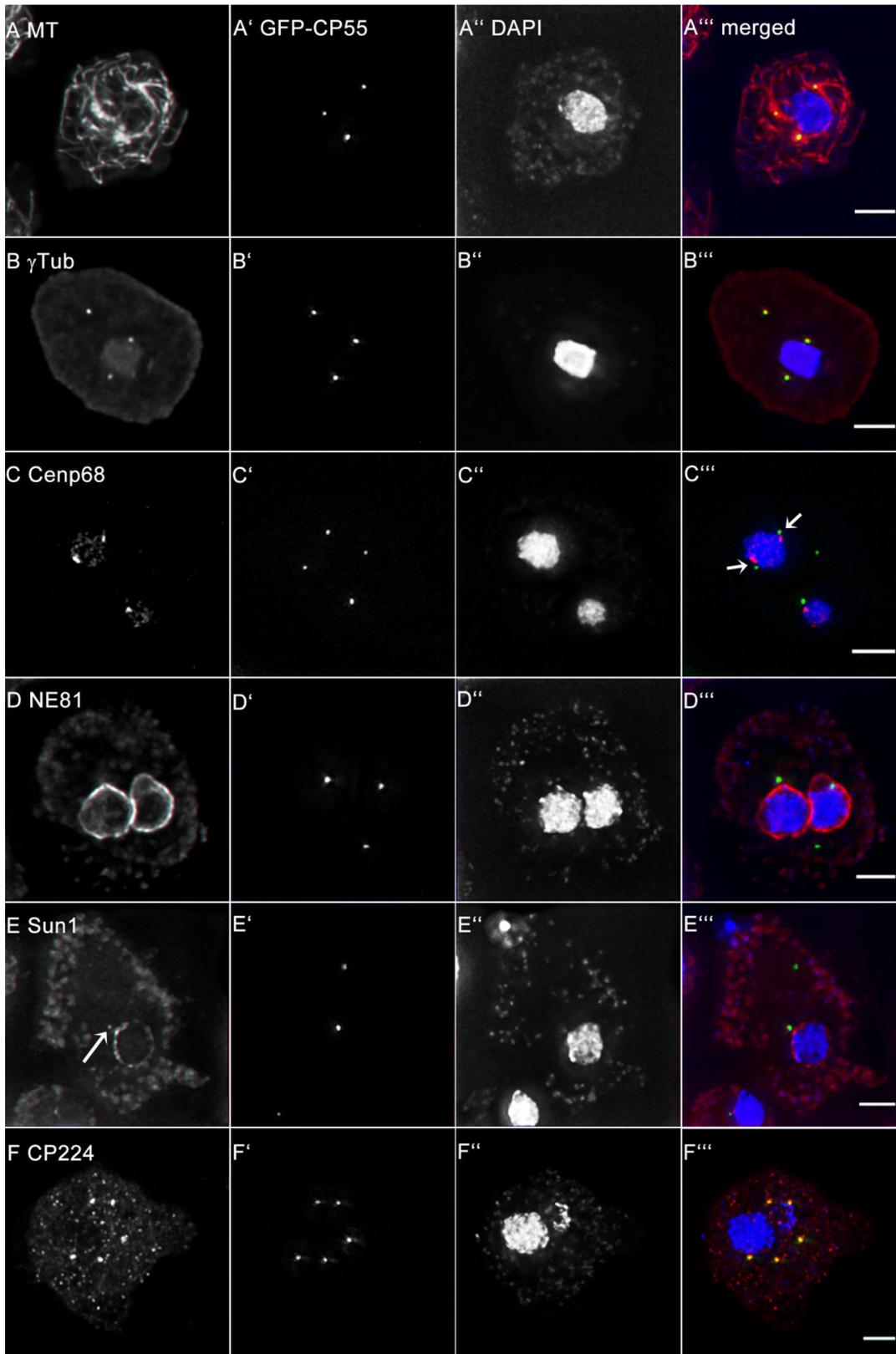


Abbildung 21: Immunfluoreszenz-Mikroskopie Untersuchungen des GFP-CP55 Überexpressionsstamms mit verschiedenen Antikörpern. Nachweis der centrosomalen Proteine an den überzähligen GFP-CP55 Signalen. Die zusätzlichen Centrosomen besitzen alle getesteten centrosomalen Proteine. Die Zellen wurden mit Methanol (A, B, C, F) und Glutaraldehyd (D und E) fixiert. Gefärbt wurde in (A) mit anti-Tubulin (MT), anti- γ -Tubulin (B), anti-Cenp68 (C), anti-NE81 (E), anti-Sun1 (E) und anti-CP224 (F). Die überlagerten Bilder zeigen GFP-CP55 in grün, die Antikörperfärbungen in rot und DAPI (DNA) in blau. Balken = 3 μ m.

2.2.4 GFP-CP55 zeigt eine geringe Mobilität am Centrosom

Aufgrund seiner Lokalisation in der centrosomalen Core-Region und dem Verbleiben am Centrosom während der Mitose könnte CP55 eine wichtige Funktion in der Biogenese bzw. dem strukturellen Erhalt des Centrosoms haben. Strukturell wichtige Proteine zeigen im Allgemeinen eine geringe Mobilität. Dieses Ergebnis wurde auch für CP55 erwartet. Um dies zu überprüfen, wurden FRAP Experimente mit GFP-CP55 exprimierenden Zellen durchgeführt (Abbildung 22). Nach dem Ausbleichen des GFP-CP55 Signales erfolgte lediglich eine 20 %-ige Erholung der GFP-CP55 Fluoreszenz am Centrosom.

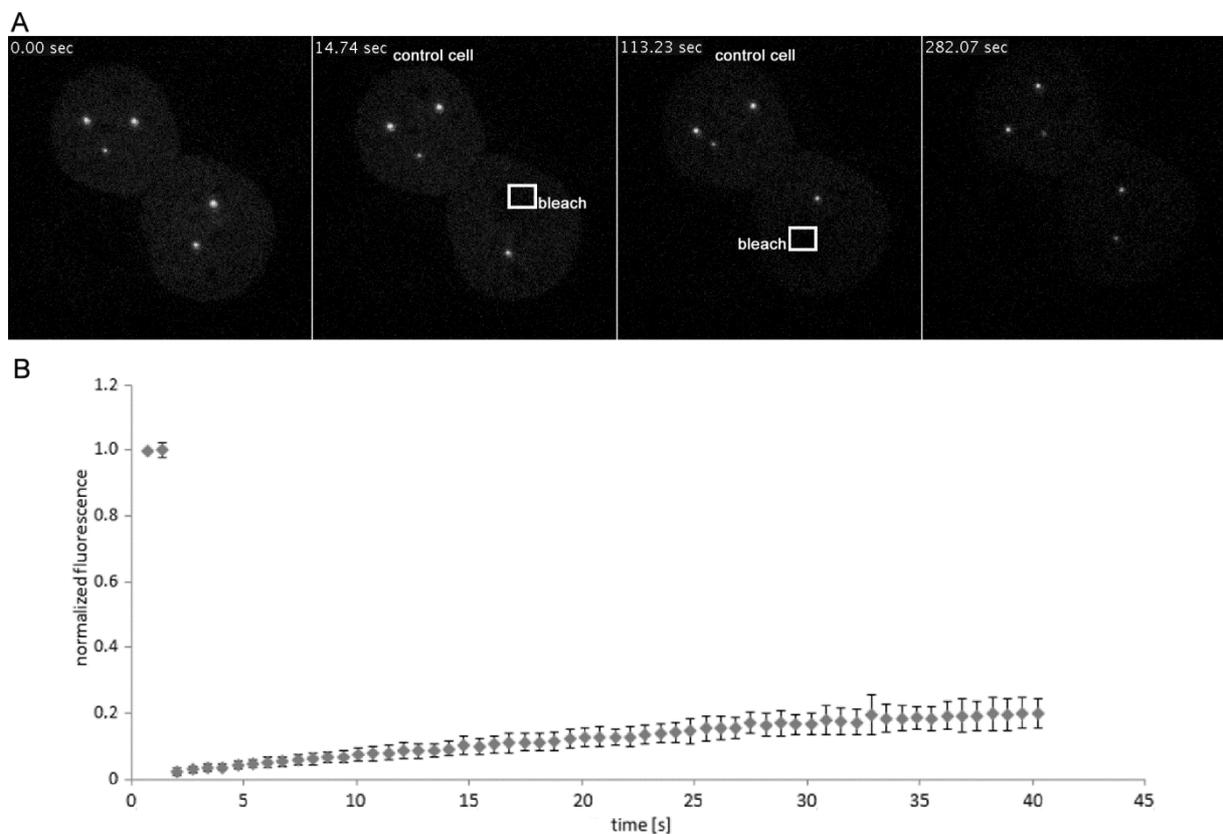


Abbildung 22: Dargestellt ist ein FRAP Experiment GFP-CP55 exprimierender Zellen. Die GFP-CP55 Fluoreszenz zeigt nur eine unvollständige Erholung nach dem Bleichen. Das Centrosom wurde zum Zeitpunkt 14,74 s mit einem punktfokussierten 473 nm Laser gebleicht. Die Kontrollzelle ist vom Bleichvorgang nicht betroffen (A). Die Aufnahmen erfolgten mit konfokaler-Spinning-Disk-Mikroskopie. Der Zeitraffer der Akquisition betrug 4 Stacks pro Minute (bei einer Bildrate von 10 fr/s); maximale Intensitätsprojektion von 7 Ebenen pro Bildstapel. Der Graph in (B) zeigt die Erholungs-Kinetik von fünf individuellen Messungen (Mittelwert \pm S.D).

Die meisten der GFP-CP55 Signale sind nicht mobil, sondern stationär, da das GFP-CP55 Signal nach dem Ausbleichen nur in einem geringen Maße (ca. 20 %) wiederkehrt. Dieses Verhalten spricht für eine strukturelle Aufgabe der Mehrheit von CP55-Molekülen am Centrosom. Lediglich ein kleiner Anteil von ca. 20 % ist mobil mit einer Halbwertszeit von ca. 20 s (Abbildung 22 und Film 4).

2.2.5 Herstellung eines CP55 k/o in AX2

Um einen besseren Einblick in die Funktion eines Proteins in der Zelle zu erlangen, kann man dessen Expression stark verringern (RNAi) oder die Expression durch Ausschalten des codierenden Gens vollständig verhindern. In Dictyostelium ist es aufgrund des haploiden Genoms leicht möglich den Leserahmen eines Gens durch die Technik der homologen Rekombination zu unterbrechen [64].

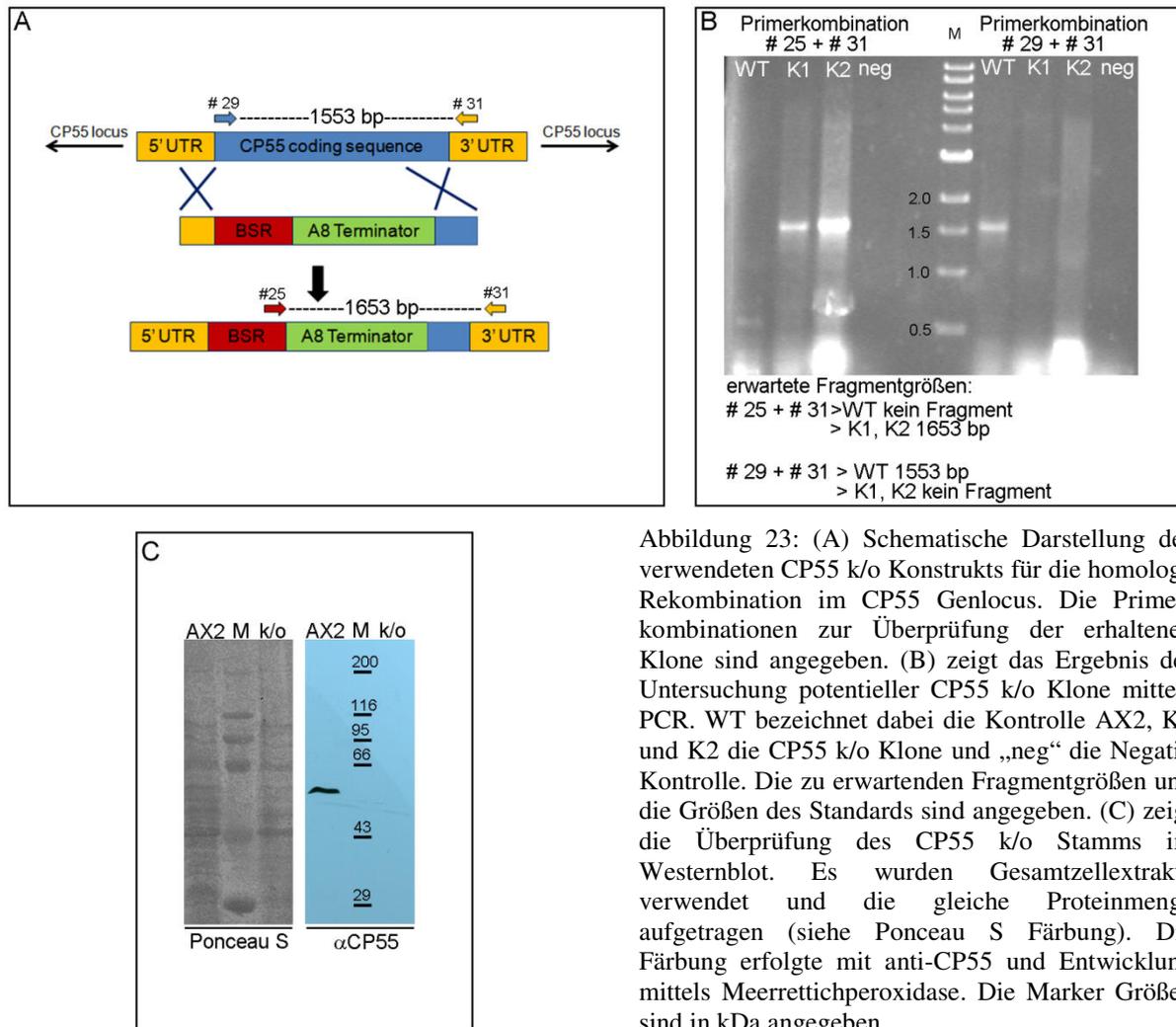


Abbildung 23: (A) Schematische Darstellung des verwendeten CP55 k/o Konstrukts für die homologe Rekombination im CP55 Genlocus. Die Primerkombinationen zur Überprüfung der erhaltenen Klone sind angegeben. (B) zeigt das Ergebnis der Untersuchung potentieller CP55 k/o Klone mittels PCR. WT bezeichnet dabei die Kontrolle AX2, K1 und K2 die CP55 k/o Klone und „neg“ die Negativkontrolle. Die zu erwartenden Fragmentgrößen und die Größen des Standards sind angegeben. (C) zeigt die Überprüfung des CP55 k/o Stamms im Westernblot. Es wurden Gesamtzellextrakte verwendet und die gleiche Proteinmenge aufgetragen (siehe Ponceau S Färbung). Die Färbung erfolgte mit anti-CP55 und Entwicklung mittels Meerrettichperoxidase. Die Marker Größen sind in kDa angegeben.

Dafür wurde das in Abbildung 23 A generierte Konstrukt in den Stamm AX2 transformiert und die anschließend erhaltenen Klone mit Blasticidin S auf die Insertion selektiert. Unter anderem wegen der wichtigen Rolle des Centrosoms bei der Mitose sind integrale centrosomale Proteine meist essentiell. Ein Knockout führt daher in einem haploiden Organismus wie Dictyostelium meist zum Tod und macht daher die Selektion eines entsprechenden Stammes unmöglich. Daher schien es relativ unwahrscheinlich einen lebensfähigen CP55 Knockout Stamm herstellen zu können. Überraschender Weise konnten

dennoch ca. einen Monat nach der Transformation potentielle CP55 Klone isoliert werden, die wie folgt überprüft wurden. Die exakte Insertion des Knockout Konstrukts im endogenen CP55 Gen-Locus wurde mittels PCR unter der Verwendung geeigneter Primer (Abbildung 23 A) bestätigt. #25 bindet wie in der Grafik (Abbildung 23 A) erkennbar ist am Ende der Blasticidin S Resistenzkassette (BSR), #31 als Reverse Primer bindet in der 3' UTR des CP55 Genlocus. #29 ist ein Forward Primer der am Anfang des CP55 Gens bindet. Die Kombination von #29 mit #31 ergibt nur beim Wildtyp CP55 Gen ein Signal, im CP55 k/o kein Signal. Der CP55 k/o und somit die korrekte Insertion des Konstrukts wurde mit der Primerkombination #25 + #31 nachgewiesen. Bei Verwendung der Primerkombination #25 + #31 erhielt man in PCR-Untersuchungen nur ein Signal in der erwarteten Größe mit genomischer DNA von CP55 k/o Stämmen. Dagegen gibt es im Kontrollstamm AX2 kein Signal (Abbildung 23 B WT #25 + #31). Bei Verwendung der Wildtypprimer wurde ein Signal im Kontrollstamm AX2 und kein Signal im potentiellen CP55 k/o erwartet. Abbildung 23 (B) #29 + #31 zeigt, dass auch in dieser Primerkombination die korrekten Signale erscheinen und so die Insertion des k/o Konstrukts an der richtigen Position im CP55 Gen-Locus erfolgte. Des Weiteren konnte der vollständige Verlust von CP55 in Dictyostelium CP55 k/o Zellen (Abbildung 23 C) im Westernblot nachgewiesen werden. Die so verifizierten CP55 k/o Stämme wurden anschließend auf ihren Phänotyp untersucht.

2.2.6 Der CP55 k/o resultiert in überzähligen, nicht-centrosomalen MTOCs

Die CP55 k/o Zellen wurden mit verschiedenen Antikörperkombinationen durch Immunfluoreszenz-Mikroskopie untersucht. Mikrotubulifärbungen zeigten in ca. 51 % aller Zellen (Abbildung 29 A, n = 354) eines CP55 k/o Stamms eine variable Anzahl überzähliger radialer Mikrotubuli-Arrangements (von einem bis acht) und zudem übergroße Zellkerne mit einem untypischen DAPI Färbungsmuster (Vergleich Abbildung 24 DAPI mit Abbildung 19 Interphase, DAPI). Dies zeigte die Existenz überzähliger MTOCs. Im Gegensatz zu den überzähligen Centrosomen der GFP-CP55 Überexprimierer enthielten diese überzähligen MTOCs jedoch nur Proteine der Mikrotubuli nukleierenden Corona wie z.B. CP148, TACC, CP224 und γ -Tubulin (Abbildung 24 E, D' und C', B, A; zum Teil mit Pfeil markiert), wogegen die Komponenten der centrosomalen Core-Region wie C39 und CP91 [41] nicht nachgewiesen werden konnten.

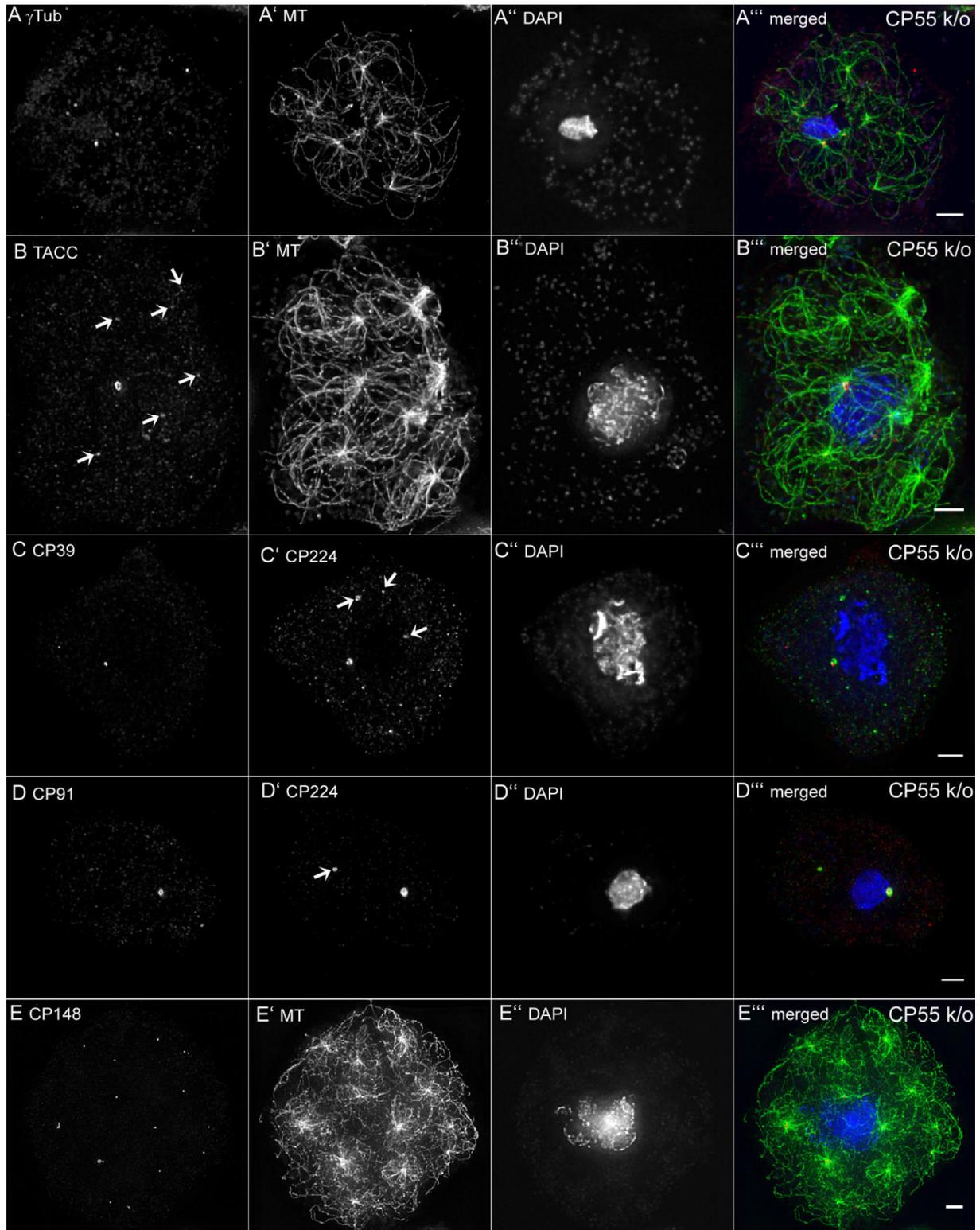
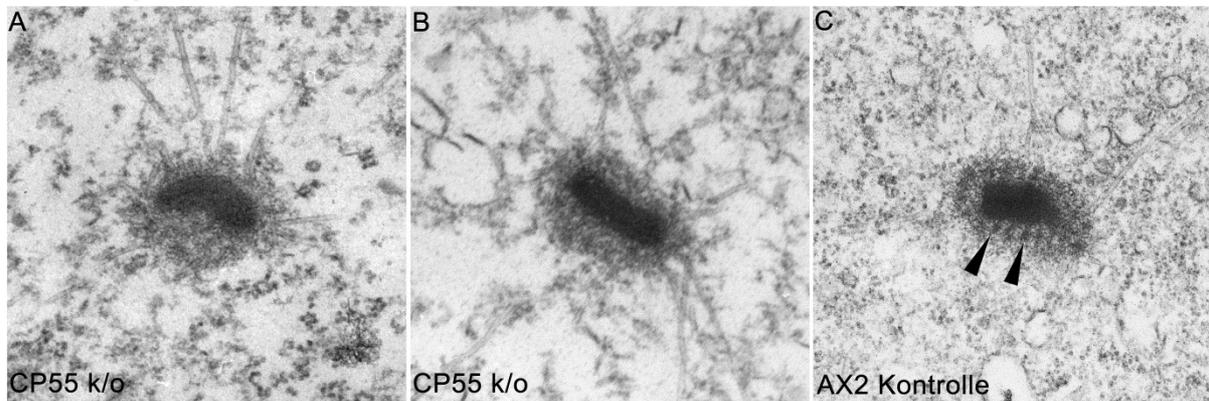


Abbildung 24: Immunfluoreszenzstudien centrosomaler Proteine in CP55 k/o Zellen. Die Knockout-Zellen sind charakterisiert durch überzählige MTOCs, welche die bekannten Corona Proteine, aber nicht die Proteine der centrosomalen Core-Region enthalten. Die abgebildeten Interphase-Zellen wurden mit Methanol fixiert. Antikörperfärbungen gegen Mikrotubuli (MT) und gegen CP224 sind in grün dargestellt. Die Färbungen gegen γ -Tubulin, TACC, CP39, CP91 und CP148 sind in rot gezeigt. DAPI (DNA) Färbungen in blau. Bei den einzelnen Abbildungen handelt es sich um dekonvolvierte Weitfeldmikroskopie Aufnahmen. Balken = 3 μ m.

Darüber hinaus erschienen die nicht kernassoziierten MTOCs im Vergleich zu den kernassoziierten Centrosomen auch kleiner. Somit repräsentieren die überzähligen MTOCs keine echten Centrosomen und es wurde ein Fehlen der geschichteten Core-Region vermutet.

vollständige Centrosomen



überzählige MTOCs

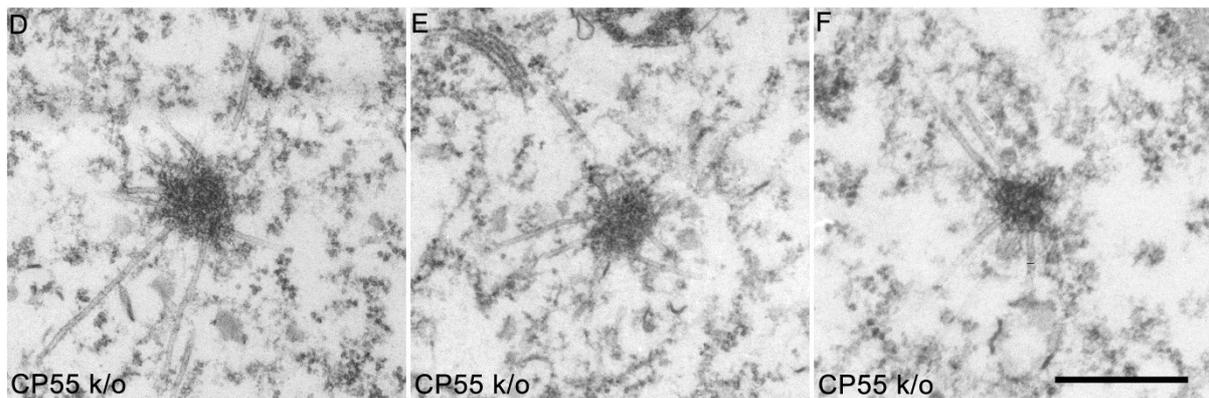


Abbildung 25: Elektronenmikroskopische Untersuchung der CP55 k/o Zellen. CP55 k/o zeigen überzählige MTOCs (D, E, F) ohne eine geschichtete Core-Region. Des Weiteren wirkt die Corona der echten Centrosomen in CP55 k/o Zellen unregelmäßiger und weniger strukturiert (A, B) im Vergleich zur Kontrolle AX2 (Pfeilspitzen markieren elektronendichte Strukturen, C). Balken = 0,5 μ m

Zum Nachweis der erwarteten strukturellen Unterschiede im Vergleich zu kernassoziierten Centrosomen wurden serielle Ultradünnschnitte angefertigt und mit Hilfe der Elektronenmikroskopie untersucht. Abbildung 25 zeigt, dass die kleinen MTOCs auch auf ultrastruktureller Ebene sichtbar sind. Sie zeigen im Vergleich zum kernassoziierten, echten Centrosom (Abbildung 25 A, B) der CP55 k/o Zelllinie keine geschichtete Core-Region (Vergleich Abbildung 25 A und B mit Abbildung 25 D bis F). Im Vergleich zu den AX2 Kontrollzellen erschienen die echten Centrosomen der CP55 k/o Zellen oft ein wenig größer und unregelmäßiger strukturiert, d.h. die dichten Knötchen (Abbildung 25 C, markiert mit Pfeilspitzen) sind innerhalb der Corona in CP55 k/o Zellen nicht mehr klar erkennbar (Abbildung 25, Vergleich CP55 k/o mit AX2).

2.2.7 Die überzähligen MTOCs entstehen in der Mitose

Es stellte sich natürlich die Frage, wie diese überzähligen MTOCs ohne geschichtete zentrale Core-Region entstehen und wie sie sich in lebenden Zellen, z.B. in der Mitose, verhalten. Dafür wurde ein CP55 k/o in einem GFP- α -Tubulin Stamm [35] generiert. Wie erwartet enthielten die so erhaltenen Zellen überzählige grün-fluoreszierende MTOCs. Die Untersuchung lebender Zellen durch konfokale-Spinning-Disk-Mikroskopie zeigte, dass zu Beginn der Prophase alle MTOCs wie im Wildtyp abgebaut werden und nur eine mitotische Spindel pro Zellkern ausgebildet wird (Abbildung 26 und Film 5).

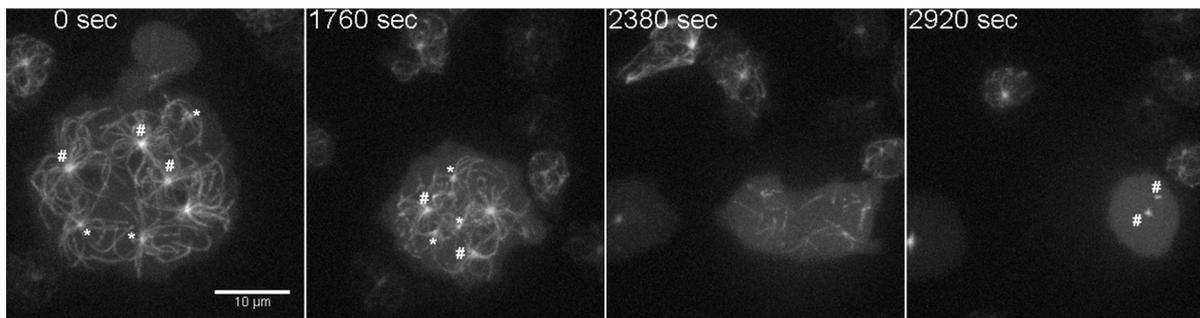
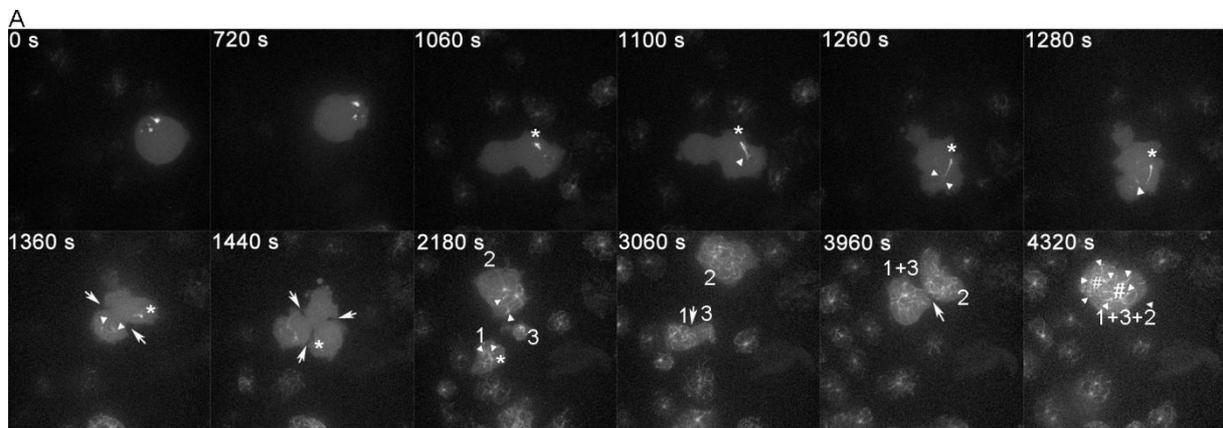


Abbildung 26 und Film 5: Übergang einer GFP- α -Tubulin-CP55 k/o Zelle mit überzähligen MTOCs von G2 in die Mitose. Zu Beginn der Mitose (2380 s) erfolgt eine Depolymerisation der Mikrotubuli. Dies ist am GFP- α -Tubulin-Signal sowohl beim kernassoziierten Centrosomen (#) als auch bei den überzähligen MTOCs (*) erkennbar. Eine Spindel wird nur vom kernassoziierten Centrosomen ausgebildet (2920s). Die Aufnahme erfolgte mit konfokaler-Spinning-Disk-Mikroskopie. Der Zeitraffer der Akquisition betrug 4 Stacks pro Minute (bei einer Bildrate von 10 fr/s); maximale Intensitäts-Projektion von 7 Ebenen pro Bildstapel. Balken = 10 μ m

Die überzähligen MTOCs bildeten sich in der Telophase, zum Zeitpunkt der Corona Reorganisation (Abbildung 27 und Film 6). Bei vielen Zellen war zudem eine erhebliche Verzögerung der mitotischen Progression in der Pro- bzw. Prometaphase auffällig. Im Durchschnitt betrug diese Verzögerung meist 20 Minuten, bevor die Mitose mit dem Eintritt in die Metaphase fortgesetzt wurde (n=26). In Kontrollzellen ist dieser Prozess meist zwei bis drei Minuten nach Eintritt in die Mitose abgeschlossen [35]. Dies deutet darauf hin, dass die CP55 k/o Mutanten Schwierigkeiten in der Teilung des Centrosoms in der Prophase haben bzw. bestimmte Voraussetzungen für den Fortgang der Mitose in die Metaphase nicht erfüllt sind. Im Einklang mit diesen Beobachtungen gab es eine auffallende Häufigkeit von Spindelfehlbildungen während der Mitose lebender GFP- α -Tubulin/CP55 k/o Zellen. Obwohl viele der beobachteten Mitosespindeln einen Wildtyp-ähnlichen Phänotyp (bipolar mit anschließender Cytokinese) zeigten, traten auch überdurchschnittlich häufig monopolare Spindeln auf (Abbildung 27 A, mit * markiert). Eine solche Spindel zeichnet sich durch einen

einseitigen hell fluoreszierenden Spindelpol aus, an dem sich mit fortschreitender Mitose ein wachsender Mikrotubulistab befindet (Abbildung 27, Film 6, Zeitpunkt angegeben).



B

	Prophase	Prometaphase	Metaphase	Anaphase	Telophase	Monopolar
CP55 k/o (n=122)	33	5	20	5	16	21
Wild type (n=103)	10	5	41	5	39	1

Abbildung 27: (A) Ausgewählte Zeitpunkte einer GFP- α -Tubulin/CP55 k/o Zelle in der Mitose von der späten Prophase bis zur Telophase (siehe Film 6). Das anfängliche Centrosom bzw. der Spindel Pol ist mit einem Sternchen (*) markiert. Das frei bewegliche, distale Ende der monopolen Spindel (1100 s) ist durch eine Pfeilspitze gekennzeichnet. Die Aufnahme erfolgte mit konfokaler-Spinning-Disk-Mikroskopie. Der Zeitraffer der Akquisition betrug 4 Stacks pro Minute (bei einer Bildrate von 10 fr/s); maximale Intensitätsprojektion von 7 Ebenen pro Bildstapel. (B) Vergleich der Verteilung von Mitosestadien in Kontrollzellen (Wild type) und CP55 k/o Zellen. Zur Auszählung wurden die Zellen mit anti-Tubulin (grün) und DAPI (DNA) in blau gefärbt. Die Mitosestadien wurden anhand ihrer Mikrotubuli Färbung sowie anhand der kondensierten DNA beurteilt. Der CP55 k/o weist eine deutlich erhöhte Anzahl von Zellen im Prophasestadium und 21 % monopolare Spindeln (beim Wildtyp nur 1 %) auf.

Zum Zeitpunkt von 1100 s begann sich die monopole Spindel beim im Film gezeigten Beispiel zu verlängern. Dabei kam es außerdem zum Abreißen einzelner Mikrotubuli (markiert mit Pfeilspitzen). Diese könnten γ -Tubulin und andere Corona-Komponenten mitreißen, so dass in einem späteren Stadium überzählige MTOCs ausgebildet werden können. Da bei den bereits doppelt Antibiotika-resistenten Zellen auf einfache Weise keine Färbung der DNA durch z.B. Expression eines rot markierten Histons vorgenommen werden konnte, kann man das Mitosestadium nur erahnen. Bei der Ausbildung einer monopolen Spindel erfolgt keine Segregation der Chromosomen, so dass eine Einordnung in ein bestimmtes Mitosestadium auf Basis morphologischer Kriterien ohnehin schwierig wäre. In dieser Bildreihe markiert der „*“ immer den nicht duplizierten Spindelpol, solange er verfolgt und eindeutig bestimmt werden konnte. Die Pfeilspitzen weisen auf abreißende Mikrotubuli (Abbildung 27, 1260 s, 1280 s) und sich daraus bildende oder bereits gebildete überzählige MTOCs hin (Abbildung 27 A, 1360 s bis 4320 s). Die Pfeile bei 1360 s und 1440 s deuten auf die sich bildende Teilungsfurche während der Cytokinese hin. Der Vorgang der Cytokinese läuft in diesem Beispiel ebenfalls nicht korrekt ab. Die zum Zeitpunkt von 2180 s scheinbar

getrennten drei Zellen (Abbildung 27 A, markiert mit 1, 2, 3) sind mit großer Wahrscheinlichkeit noch über eine schmale, hier nicht sichtbare Cytoplasmabrücke miteinander verbunden, da alle drei Zellen am Ende (4320s) wieder als eine Einzelzelle vorliegen. Der Ablauf der Fusionierung ist in Abbildung 27 (A) von 2180 s bis 4320 s dargestellt. Monopolare Spindeln traten in 12 von 26 gefilmten mitotischen Zellen auf. Ein Einfluss von phototoxischen Effekten beim Live-Cell-Imaging von GFP- α -Tubulin/CP55 k/o Zellen und eine daraus resultierende Verzögerung der mitotischen Progression bzw. die Bildung monopolarer Spindeln kann ausgeschlossen werden, da GFP- α -Tubulin-exprimierende Zellen unter denselben Beobachtungsbedingungen keine Beeinträchtigungen im Fortgang der Mitose zeigten. Die Störung der frühen mitotischen Progression, die in lebenden Zellen CP55 k/o beobachtet wurde, spiegelt sich bei der Auswertung der Verteilung von Mitosestadien in fixierten Präparaten wider. Abbildung 27 (B) zeigt einen Vergleich der Verteilung der Mitosestadien von AX2 Kontroll- und CP55 k/o-Zellen. Die Prozentsätze sind ein Maß dafür, wie viel Zeit die Zellen im jeweiligen Mitosestadium verbringen. Während sich jeweils ca. 40 % der mitotischen Kontrollzellen (Abbildung 27 B, Wildtyp) in der Metaphase oder Telophase und nur 10 % in der Prophase befinden, verbleiben ca. 40 % der mitotischen CP55 k/o Zellen in der Prophase und 21 % zeigten den monopolaren Spindel Phänotyp (Abbildung 27 B, CP55 k/o). Dieses Ergebnis bestätigt somit den längeren Verbleib der Zellen in der Prophase sowie das gehäufte Auftreten monopolarer Spindeln während des Live-Cell-Imaging der GFP- α -Tubulin/CP55 k/o Zellen. Die Bildung der überzähligen MTOCs an den abgerissenen Mikrotubuli Fasern erfolgt zum Zeitpunkt der Corona Neuformation in der Telophase. In Film 6 bzw. Abbildung 27 (A) kann dies aufgrund der fehlenden Referenz für das mitotische Stadium nicht genau bestimmt werden. Deshalb wurde versucht eine CP55 k/o Zelle mit einer nicht symmetrischen Spindelausbildung während der Mitose aufzunehmen. Dass heißt, dass eine der Spindeln bipolar (als Referenz für das Mitosestadium) und die andere monopolar sein muss. Abbildung 28 zeigt die Bildreihe eines solchen Filmes (Film 7). Gezeigt ist eine Zelle mit kollabiertem Interphase Mikrotubuli-Cytoskelett. Die beiden sichtbaren GFP- α -Tubulin Signale sind in dieser aufgenommenen Zelle vermutlich Prophasecentrosomen (Abbildung 28, 0 s bis 1200 s). Erst nach ca. 35-40 Minuten wird die Mitose mit der Metaphase fortgesetzt (Abbildung 28, 2300 s). Dabei wird von dem mit # gekennzeichneten Centrosom eine bipolare Spindel, von dem mit „*“ gekennzeichneten Prophasecentrosom eine monopolare Spindel, ausgebildet (Abbildung 28). Die Entstehung der monopolaren Spindel ist in diesem Fall auf einen Bruch der augenscheinlich bipolaren Spindel (2300 s) zurückzuführen. Wahrscheinlich wurde auch

hierbei das Prophasecentrosom nicht korrekt verdoppelt, so dass der zweite Spindelpol instabil ist und bricht (Abbildung 28, 2300 s untere Spindel, markiert mit Pfeilspitze).

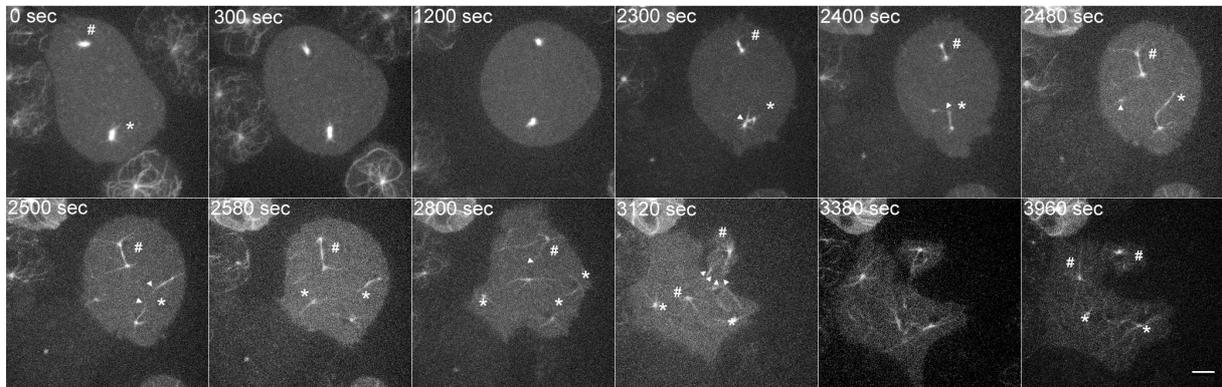


Abbildung 28 (Film 7): Mitose von GFP- α -Tubulin/CP55 k/o Zellen, die einen Defekt beim Fortgang der Mitose und Spindelbildung aufweisen. Gezeigt sind verschiedene Zeitpunkte von Film 7 beim Durchlaufen der Mitose ab der Pro- bzw. Prometaphase bis hin zur Cytokinese. Die # markiert immer die obere Spindel, * die untere. Der Film wurde mit konfokaler Spinning Disk Mikroskopie aufgenommen. Der Zeitraffer der Akquisition betrug 4 Stacks pro Minute (bei einer Bildrate von 10 fr/s); maximale Intensitätsprojektion von 7 Ebenen pro Bildstapel.

Der Fortgang durch die Mitose verläuft ähnlich wie in Abbildung 27 (A) und Film 6. Von der monopolen Spindel erfolgte der Abriss einzelner Mikrotubuli (Abbildung 28, 2580 s Markierung mit *), die dann in der Telophase überzählige MTOCs bildeten. Die bipolare obere Spindel scheint zum Zeitpunkt der Telophase (2800 s) ebenfalls zu zerbrechen (markiert mit Pfeilspitze). Aufgrund der Spindelorientierung konnte dies aber nicht weiter verfolgt werden. Wie auch in Film 6 konnte man in Film 7 (Abbildung 28) eine gestörte Cytokinese beobachten. Es wurden nach abgeschlossener Mitose drei Zellen erwartet, zwei die aus der bipolaren Spindel resultieren und eine Zelle mit dem Ursprung in der monopolen Spindel. Zum Zeitpunkt 3120 s (markiert mit Pfeilspitzen) und 3380 s schien sich aber nur eine Zelle abzuschnüren.

2.2.8 Die CP55 k/o Zellen zeigen eine erhöhte Ploidie

Monopolare Spindeln führen zwangsläufig zu Fehlern bei der Chromosomensegregation. Deshalb war es nicht verwunderlich, dass sich CP55 k/o Zellen durch einen erhöhten DNA-Gehalt auszeichneten. Bei Messungen der Intensität der DAPI Färbungen in CP55 k/o Zellen (n = 198) und AX2 Kontrollzellen (n = 110) konnte ein allgemeiner Anstieg des DNA-Gehaltes um einen Faktor von 2,1 (Abbildung 29 B) berechnet werden. Des Weiteren wurde der DNA-Gehalt einzelner Zellen (Abbildung 29 C und C') mit ansteigenden DAPI Intensitätswerten in ein Koordinatensystem eingezeichnet.

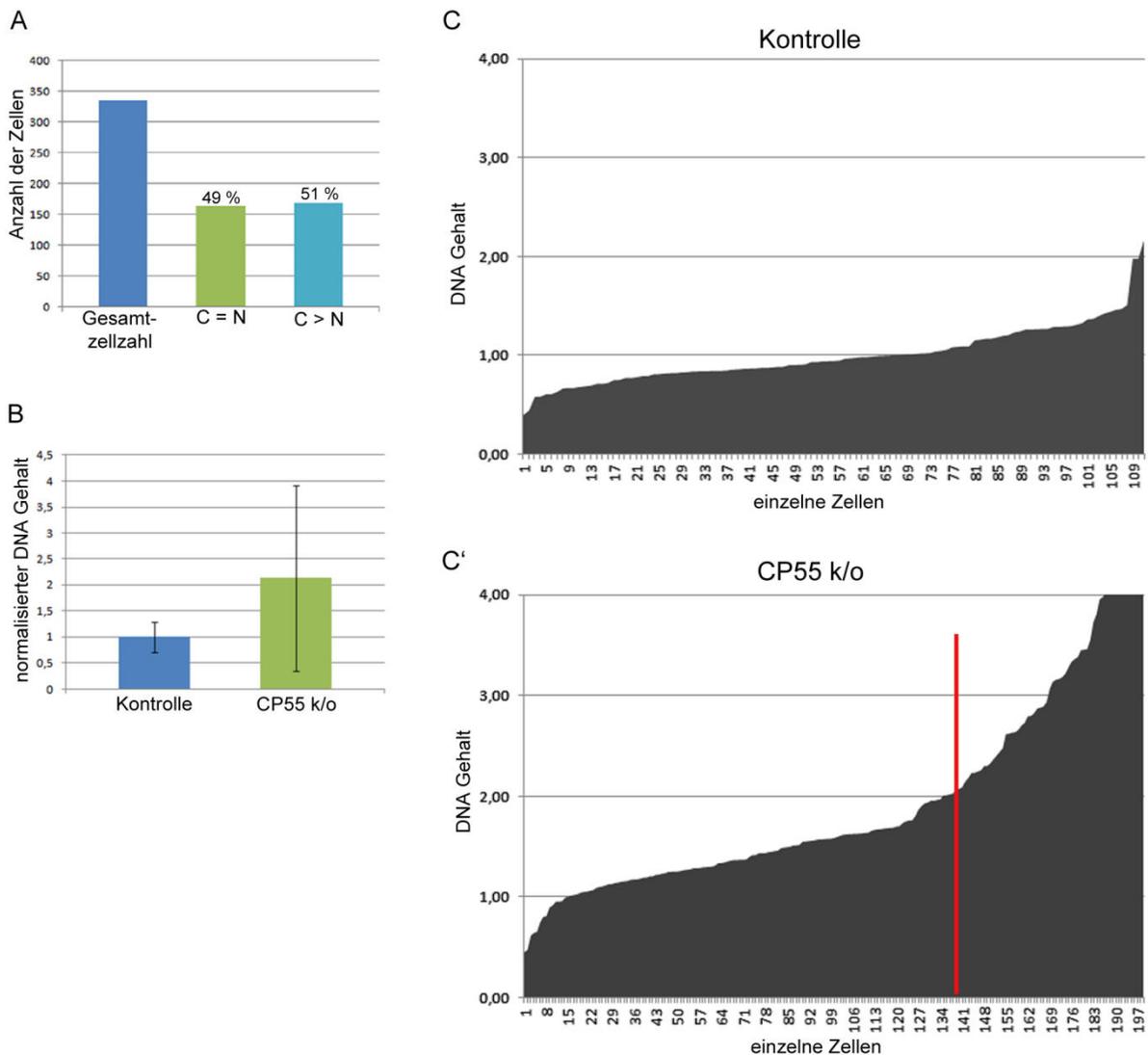


Abbildung 29: Statistische Auswertung des CP55 k/o Phänotyps. CP55 k/o Zellen zeigen überzählige MTOCs (A) und einen erhöhten DNA-Gehalt (B und C'). Das Diagramm in (A) zeigt die prozentuale Verteilung von wildtypähnlichen MTOCs, d.h. die Anzahl der Centrosomen entspricht der Anzahl der Zellkerne (C=N) und überzähligen MTOCs (Anzahl der MTOCs ist größer als die Anzahl der Kerne, C>N). Die Gesamtzellzahl betrug 335 Zellen. (B, C, C') Der DNA-Gehalt wurde als Produkt aus gemessener Kernfläche [μm^2] und Intensität der DAPI-Färbung (16-Bit Graustufen) berechnet. Die Werte wurden auf den Mittelwert von AX2 Zellen (=1) normalisiert und als Diagramm in (B) dargestellt. Die Grafiken in (C, C') zeigen den normalisierten DNA-Gehalt (y-Achse) jeder einzelnen Zelle der nach steigender Größe (x-Achse) angeordnet wurde (n = 110 für AX2 und n = 198 für CP55 k/o). Der Vergleich der beiden Diagramme (C und C') zeigt einen erhöhten Prozentsatz von Zellen mit aberranter Ploidie bei CP55 k/o Zellen.

In dieser Darstellung kann man klar erkennen, dass der DNA-Gehalt in ca. 30 % der CP55 k/o Zellen mehr als das zweifache (Abbildung 29 C', rechts der Teilung durch die Markierung), im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 29 C), betrug. In den Kontrollzellen trat dies nur bei ca. 2 % der Zellen auf. Als Referenz wurde der Mittelwert der DNA-Gehaltsmessungen der Kontrollzellen auf eins normiert. Aufgrund dieses Ergebnisses des Vergleichs zwischen Kontrollzellen und dem CP55 k/o Stamm kann man eine Blockade oder Verzögerung des Zellzyklus in der G2 oder S-Phase als Ursache für den erhöhten DNA-Gehalt ausschließen

(Erklärung siehe 2.1.7 CP148). Vielmehr ist die Ursache in einer fehlerhaften Mitose zu suchen. Durch die Nichttrennung bereits verdoppelter Chromosomen und vermutlich daraus resultierenden monopolen Mitosespindeln entstehen so vermehrt Zellen mit z.B. zweifachem DNA-Gehalt. Kommt es im nächsten Zellzyklus erneut zur Ausbildung einer monopolen Spindel, liegt dann theoretisch der vierfache Chromosomensatz vor.

2.2.9 Der Knockout von CP55 verursacht starke Wachstumsdefekte

Aufgrund ihres oft abnormen Karyotyps und den beobachteten Schwierigkeiten beim Durchlaufen der Mitose und Cytokinese war es nicht verwunderlich, dass das Wachstum der CP55 k/o Zellen in axenischer Schüttelkultur im Vergleich zum adhärenenten Wachstum in Zellkulturflaschen noch stärker reduziert war.

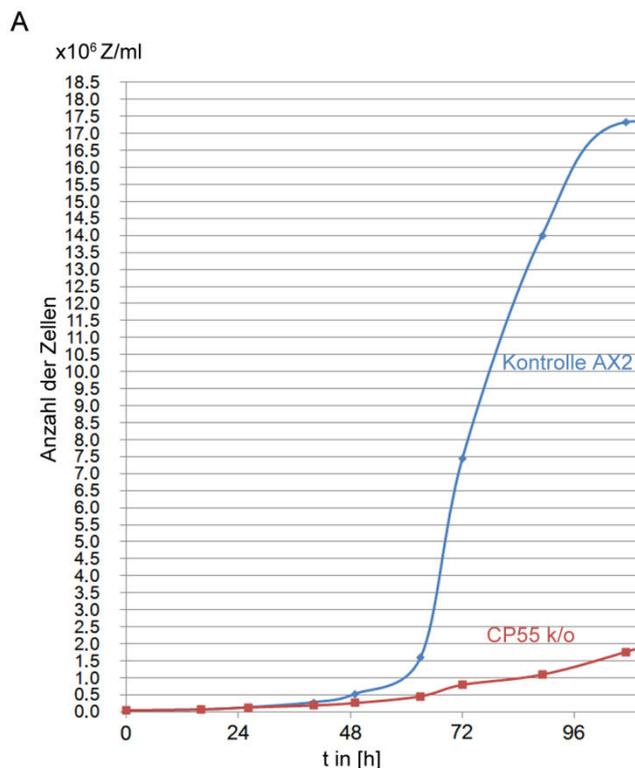
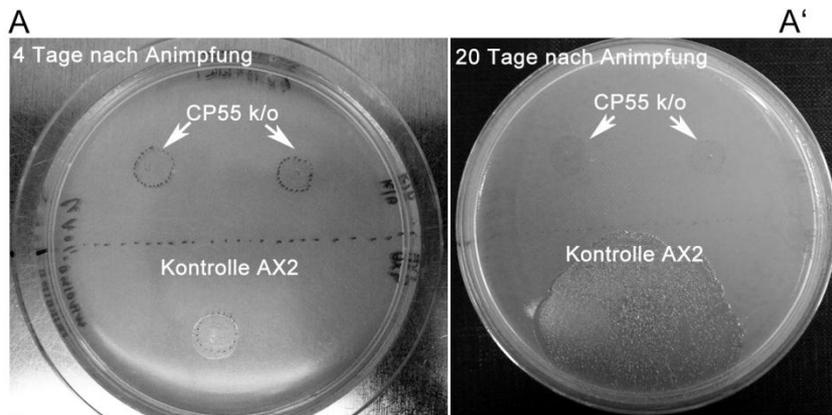


Abbildung 30: Wachstumsvergleich von AX2 Kontrollzellen und CP55 k/o Zellen in Schüttelkultur. Die CP55 k/o Zellen zeigten ein stark verringertes Wachstum im Vergleich zu den Kontrollzellen. Eine exponentielle Wachstumsphase nach ca. 60 h (Kontrolle) konnte bei den CP55 k/o Zellen mit einer ähnlichen Steigung nicht beobachtet werden. Auf der x-Achse ist die Zeit in Stunden, auf der y-Achse die Zelldichte in Zellen pro ml (Z/ml) aufgetragen. Die Zellzahl wurde mit einer Neubauer *improved*-Zählkammer (0,100 mm Tiefe) bestimmt.

Um dies zu quantifizieren wurde ein Wachstumsexperiment durchgeführt. Als Kontrolle diente der Stamm AX2. Abbildung 30 zeigt das Wachstum über mehrere Tage bis zum Erreichen der stationären Phase des Kontrollstamms. Zum Zeitpunkt in dem die AX2 Kontrollzellen bereits die stationäre Phase (ca. $1,7 \times 10^7$ Z / ml) erreicht hatten, wiesen die CP55 k/o Zellkulturen nur etwa 10% der Zelldichte des Kontrollstamms auf (Abbildung 30, Kurvenverlauf für CP55 k/o). Auch bei weiterer Kultivierung über mehrere Tage war das Erreichen einer exponentiellen Phase, anders als bei den Kontrollzellen, nicht erkennbar. Der

CP55 k/o Stamm erreichte nach ca. neun Tagen eine maximale Zelldichte von ca. 5×10^6 Z/ml. Neben dem Wachstumstest in Schüttelkultur wurde ebenfalls das Wachstum auf mit *Klebsiella aerogenes* (KA), der natürlichen Nahrungsquelle von Dictyostelium, bewachsenen SM-Agarplatten quantitativ untersucht (Abbildung 31 A bis A‘‘).



A‘‘

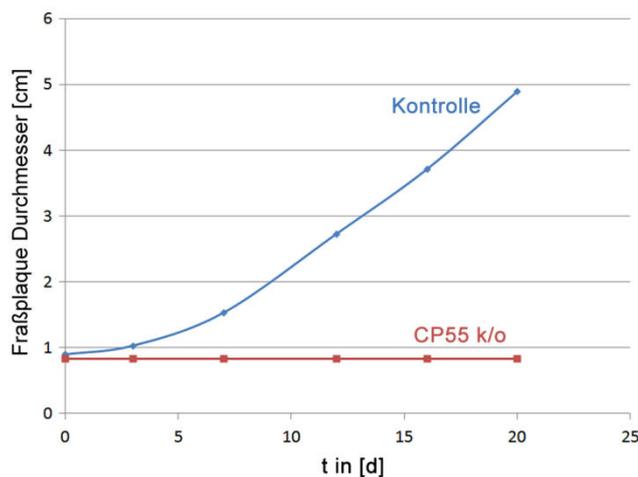


Abbildung 31: Der CP55 Knockout Stamm ist nicht mehr in der Lage auf Bakterien zu wachsen. (A, A‘) Phagozytose-Versuch von CP55 k/o Zellen auf mit *Klebsiella aerogenes* (KA) bewachsenen SM-Agar-platten. Beispielhaft ist eine mit KA bewachsene SM-Agarplatte 4 Tage (A) und 20 Tage (A‘) nach Animpfung mit der entsprechenden Dictyostelium-Kultur gezeigt. Es wurde jeweils dieselbe Zellzahl verwendet. Die Animpfstellen der jeweiligen Proben sind in der Abbildung gekennzeichnet. Bei den AX2 Kontrollzellen konnte bereits nach 4 Tagen ein deutlicher Fraßplaque beobachtet werden. Bei den CP55 k/o Zellen war selbst nach 20 Tagen noch kein mit den Kontrollzellen vergleichbarer Fraßplaque zu erkennen. (A‘‘) zeigt die quantitative Auswertung des Wachstumsversuchs. Gemessen wurde jeweils der größtmögliche Plaquedurchmesser. Die Zeit (d) wurde gegen den

gemessenen Durchmesser (cm) der Fraßplaques aufgetragen. Die AX Zellen zeigten einen linearen Anstieg des Plaquedurchmessers nach ca. 6 Tagen, wogegen der Durchmesser der CP55 k/o Zellen über den gesamten Messzeitraum konstant blieb.

Dafür wurde der Bakterienrasen an den jeweils gekennzeichneten Positionen mit 4×10^5 Zellen der entsprechenden Probe beimpft und bei 22°C inkubiert (Abbildung 32, SM-Platte mit *K. aerogenes*, die Animpfstelle ist eingekreist). AX2 zeigte bereits nach wenigen Tagen einen deutlichen Fraßplaque, der sich stetig vergrößerte. Dagegen konnte bei den CP55 k/o Stämmen kein Plaque bzw. eine Ausdehnung der Animpfstelle beobachtet werden. Der Durchmesser der Knockout Proben blieb über 20 Tage konstant. Es schien so, dass einige Bakterien von den CP55 k/o aufgenommen wurden, da der Animpfbereich nach 20-tägiger Inkubation heller und strukturell unregelmäßiger erschien (Abbildung 31 A‘, CP55

k/o). Trotzdem waren in diesem Bereich keine Sporen erkennbar. Die quantitative Bestimmung erfolgte durch Messungen des Fraßplaquedurchmessers (Abbildung 31 A“). Dieser Phänotyp, dass die CP55 k/o Zellen nicht auf Bakterien wachsen können, deutete auf einen Phagozytose defekt hin. Um zu überprüfen, ob es sich dabei tatsächlich um einen Phagozytose defekt handelt, wurde ein GFP-Lim Δ coil-Konstrukt [65] in den CP55 k/o Stamm transformiert, um die Bildung des „phagocytic Cups“ sichtbar zu machen. „Phagocytic Cups“ sind becherförmige Fortsätze der Plasmamembran und ihre Ausbildung wichtig für die Phagozytose. Dabei wird in einem Aktin- und PIP3-abhängigen Prozess ein Partikel, z.B. eine Hefezelle, umschlossen und letztendlich in die Zelle aufgenommen [66]. Es erfolgte ein mikroskopischer Phagozytose-Versuch mit TRITC markierten Hefen. Überraschenderweise waren die CP55 k/o GFP-Lim Δ coil Dictyostelium Zellen problemlos in der Lage die markierten Hefen zu phagozytieren (Abbildung 32 und Film 8). Die Zeit zur Ausbildung des „phagocytic Cups“ betrug ca. zwei bis drei Minuten und war damit ähnlich wie bei Wildtypzellen [67]. Eine Phagozytose von Bakterien sollte demnach ebenfalls nicht beeinträchtigt sein.

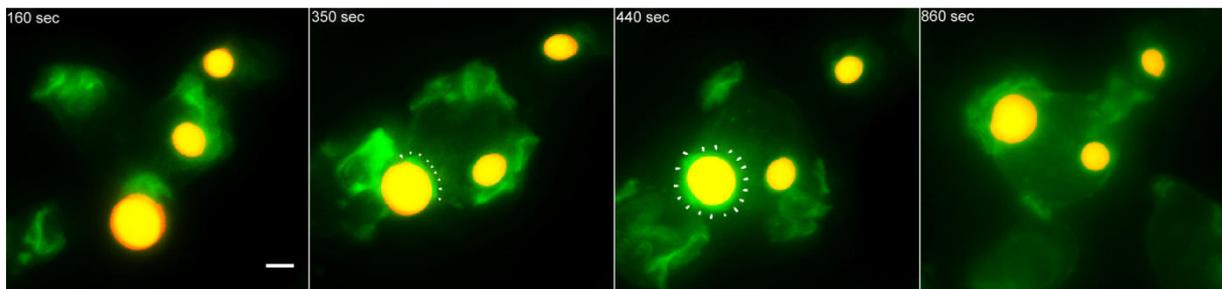


Abbildung 32: CP55 k/o Zellen sind in der Lage Hefezellen zu phagozytieren. Die Abbildung zeigt eine Darstellung der Phagozytose von TRITC markierten Hefezellen durch CP55 k/o Mutanten, die zusätzlich GFP-Lim Δ coil als Marker für F-Aktin zur Visualisierung der „phagocytic Cups“ exprimieren. Die weißen Pfeilspitzen zeigen die Bildung des „phagocytic Cups“ und die Aufnahme der Hefezelle. Balken = 3 μ m.

2.2.10 CP55 k/o Zellen zeigen eine Dispersion des Interphase Golgi-Apparats

Aufgrund der Tatsache, dass CP55 k/o Zellen keinen Phagozytosedefekt aufweisen, könnte die Ursache für die Unfähigkeit auf Bakterien zu wachsen z.B. an der nicht ausreichenden Versorgung der (frühen) Endosomen mit lytischen Enzymen liegen [68]. Der Golgi Apparat ist bei Dictyostelium Zellen eng mit dem Centrosom verknüpft. Antikörper gegen Golgi Marker wie anti-Comitin oder der monoklonale Antikörper 1/39 [68-69] färben vor allem die pericentrosomale Region (siehe Abbildung 33 A). Im Gegensatz dazu ist der Golgi-Apparat in

CP55 k/o Zellen vesikelartig in der ganzen Zelle verteilt (Abbildung 33 B), wie es auch schon bei Mutanten mit Dynein/Dynaktin Defekten beobachtet wurde [39, 70].

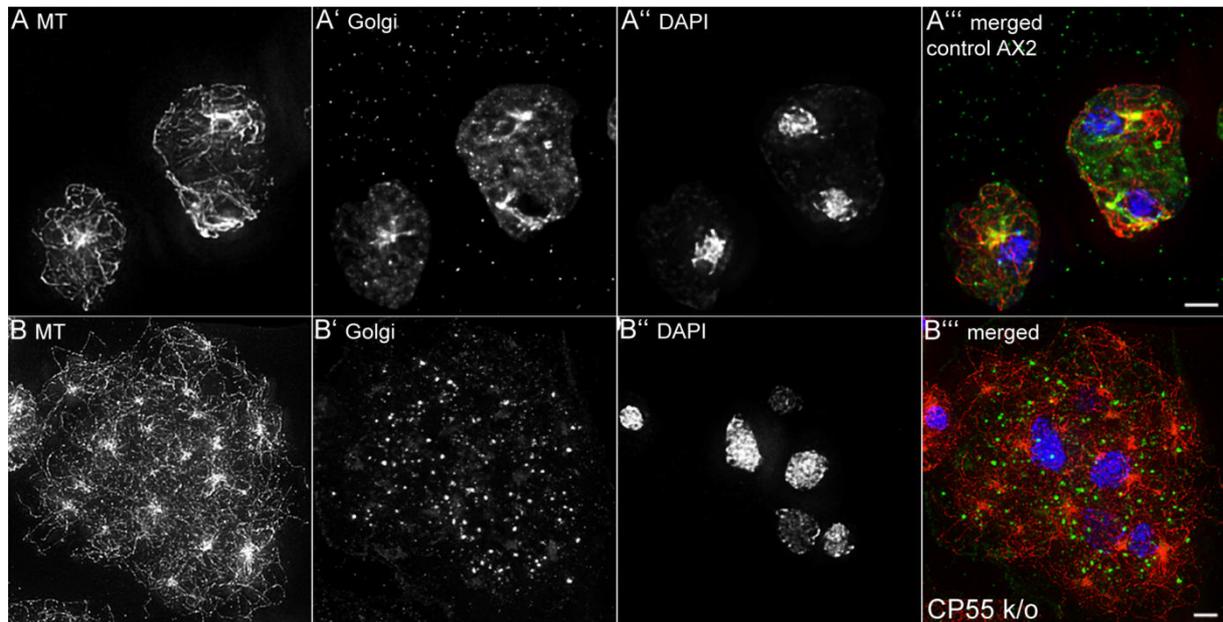


Abbildung 33: CP55 k/o Zellen zeigen eine Dispersion des Interphase Golgi-Apparates. Gezeigt ist eine Methanol Fixierung von Interphase-Zellen. Die AX2 Kontroll- (A-A''') und CP55 k/o-Zellen (B-B''') wurden mit dem monoklonalen anti-Golgi-Marker 1 / 39 in grün und die Mikrotubuli (MT) in rot gefärbt. Die DNA Färbung mit DAPI ist in blau dargestellt. Weitfeld-Dekonvolutionsmikroskopie. Die Bildstapel wurden mit maximaler Intensitätsprojektion auf eine Ebene gebracht. Balken = 3 µm.

2.2.11 Die Transformation der CP55 k/o Zellen mit GFP-CP55 Konstrukt rettet den CP55 k/o Phänotyp

Dieser „Verdauungsdefekt“ infolge des Knockouts eines centrosomalen Proteins erschien zunächst etwas ungewöhnlich. Theoretisch bestand die Möglichkeit, dass das CP55 k/o Konstrukt zufällig auch in einem anderen Genlocus über homologe Rekombination integriert wurde und einen Knockout eines z.B. wichtigen Golgi-Proteins zur Folge hat. Um dies auszuschließen, wurde das GFP-CP55 Vollängenkonstrukt in den CP55 k/o Stamm transformiert. Die bisherigen Untersuchungen zeigten, dass die so entstandenen Stämme wieder befähigt sind auf *Klebsiella aerogenes* zu wachsen. Außerdem zeigten die CP55 k/o „Rescue“ Stämme keine überzähligen MTOCs (Vergleich Abbildung 34, CP55 k/o MTOCs markiert mit * mit Rescue) mehr und konnten auch wieder auf Bakterien wachsen. Da das GFP-CP55 Vollängenkonstrukt den CP55 k/o Phänotyp nach bisherigen Untersuchungen vollständig kompensiert, kann man eine zufällige Insertion des CP55 k/o Konstrukts in einem anderen für die Golgi-Funktion wichtigen Genlocus ausschließen.

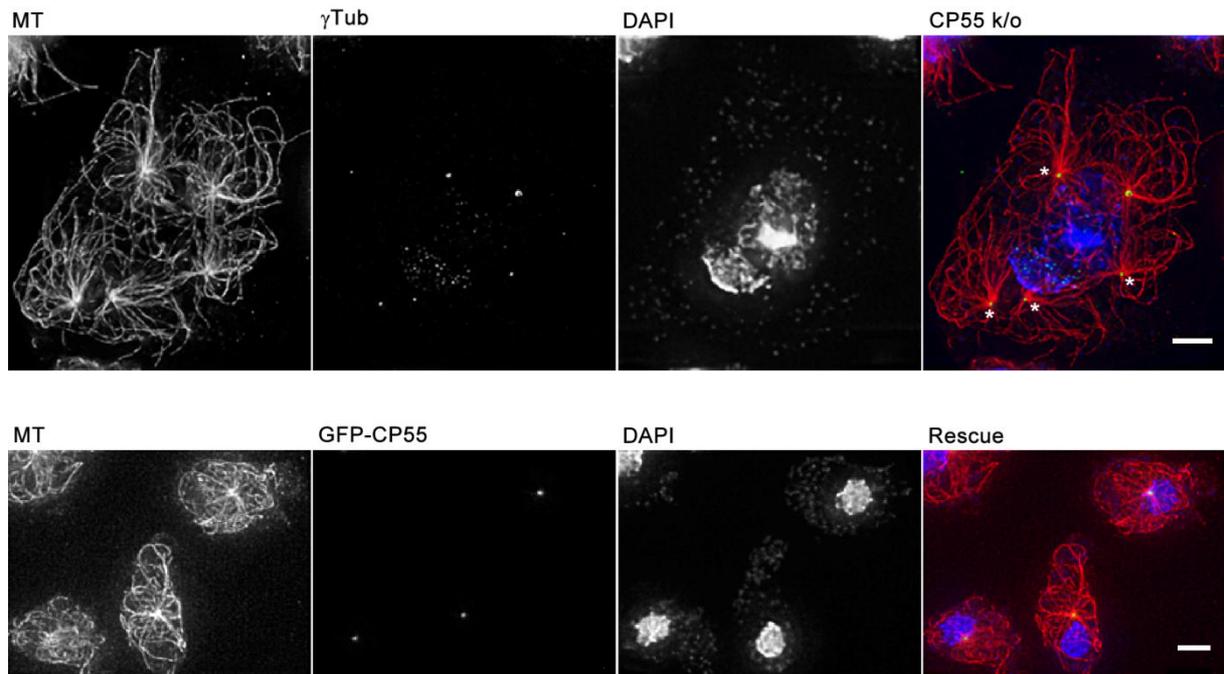


Abbildung 34: Ein GFP-CP55 Vollängenkonstrukt hebt den Phänotyp des CP55 k/o auf. Das Fusionsprotein behebt den CP55 k/o Phänotyp der überzähligen MTOCs und den Wachstumsdefekt auf Bakterien. Die dargestellten Interphase-Zellen wurden mit Glutaraldehyd fixiert. Immunfärbungen gegen Mikrotubuli (MT) sind in rot dargestellt, GFP-CP55 in grün („Rescue“) und γ -Tubulin (γ -Tub, CP55 k/o) ebenfalls in grün. DAPI zeigt die Färbung der DNA in blau. Balken = 3 μ m

2.2.12 Ohne CP55 erfolgt eine frühzeitige Re-Rekrutierung von CP148 an den Spindelpol

Die Bildung der überzähligen MTOCs in CP55 k/o Zellen und der Zeitpunkt ihrer Bildung sprechen für eine Funktion von CP55 bei Stabilisierung der Corona. Um einen eventuellen Zusammenhang der Proteine CP55 als Corona-Stabilisator und CP148 als Gerüstfaktor für die Dictyostelium Corona zu untersuchen wurden CP55 k/o Zellen mit anti-CP148 gefärbt. In Interphase Zellen lokalisiert CP148, wie erwartet, auch an den überzähligen MTOCs. Das dynamische Verhalten von CP148 in der Mitose wurde ebenfalls auch im CP55 k/o Stamm analysiert. In den AX2 Kontrollzellen dissoziiert CP148 gleichzeitig mit dem Zerfall der Corona vom Centrosom ab und ist erst in der Telophase zum Zeitpunkt der Corona Neubildung wieder an den Spindelpolen erkennbar (siehe Ergebnisteil CP148, Abbildung 3, Telophase sowie Abbildung 35 Kontrolle AX2 Telophase). In CP55 k/o Zellen dissoziiert CP148 zwar ebenfalls in der Prophase vom Centrosom ab, erscheint aber bereits schon in der frühen Metaphase wieder an den Spindelpolen (Abbildung 35).

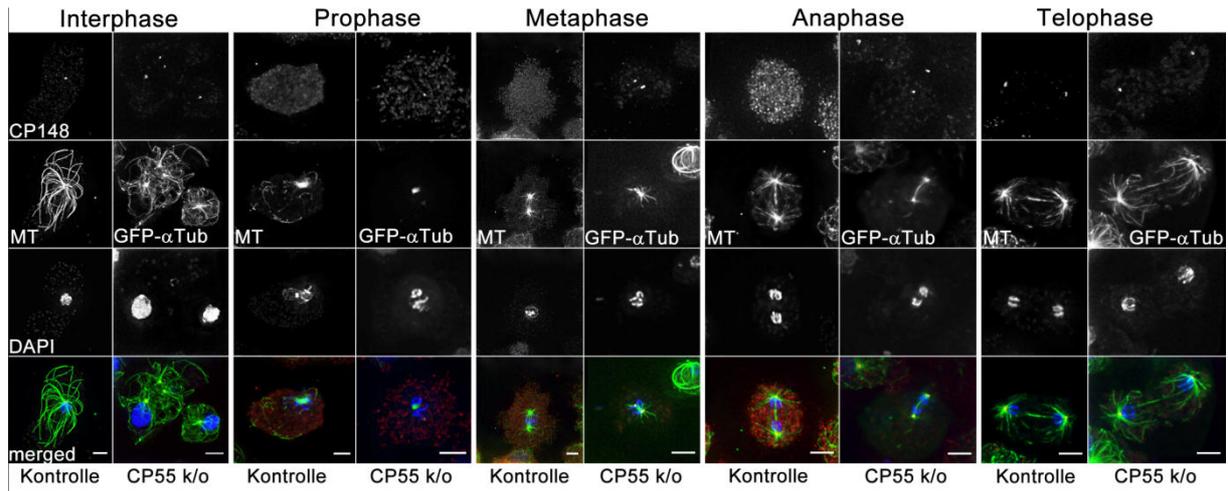


Abbildung 35: Das Fehlen von CP55 am Centrosom verursacht bereits in der Metaphase eine frühzeitige Rekrutierung von CP148 an die Spindelpole. Gezeigt sind jeweils die AX2 Kontrollzellen (linke Spalte) und CP55 k/o GFP- α -Tubulin-Zellen (rechte Spalte), die mit anti-CP148 in rot gefärbt wurden. In den AX2 Kontrollzellen wurden die Mikrotubuli (MT) mit anti- α -Tubulin in grün gefärbt. DAPI-Färbungen (DNA) sind in blau dargestellt. Die jeweiligen Zellzyklus Stadien sind über jeder Spalte angegeben. Balken = 3 μ m

3 Diskussion

3.1 Das neue Corona-Protein CP148

3.1.1 Mikrotubuli sind mit den centrosomalen Core-Komponenten über verschiedene Wege während der Interphase und Mitose assoziiert

Die Corona des Dictyostelium Centrosoms ist das funktionelle Äquivalent der pericentriolaren Matrix tierischer Centrosomen. Auf ultrastruktureller Ebene ist das Vorhandensein elektronendichter Knötchen, die in eine amorphe Matrix eingebettet sind, charakteristisch für die Corona. Die bisher funktionell charakterisierten Corona-Komponenten umfassen hauptsächlich Proteine, die an der Nukleation und Organisation von Mikrotubuli beteiligt sind. γ -Tubulin zum Beispiel lokalisiert an den elektronendichten Knötchen der Corona [36]. Die Komponenten des γ -Tubulin-Komplex Spc97 und Spc98 [19], sowie die Orthologen von XMAP215 (CP224) [71] und TACC [22] befinden sich ebenfalls in der Corona. Mit CP148 wurde nun das erste Corona-Protein charakterisiert, das für den eigentlichen Aufbau, Bildung und Stabilität der Corona essentiell ist. Alle anderen zuvor genannten Corona-Proteine haben gemeinsam, dass sie auch an den mitotischen Spindelpolen lokalisieren, die im Gegensatz zu Interphase Centrosomen keine Corona besitzen [23, 46]. Dagegen korreliert die centrosomale Lokalisierung von CP148 exakt mit der Dissoziation der Corona in der Prophase und ihrer Neubildung in der späten Telophase [19, 61]. Die Anwesenheit und Abwesenheit der Corona deutet bereits auf Zellzyklus-abhängige Unterschiede in der Rekrutierung von Mikrotubuli-nukleierenden Komplexen am Centrosom während der Interphase und Mitose hin. Diese Dualität konnte nun erstmals einem bestimmten Protein, CP148, zugeordnet werden. Die CP148 Knockdown-Zellen waren durch den Verlust der Corona und - daraus resultierend - einem völlig ungeordneten Interphase-Mikrotubuli-Cytoskelett gekennzeichnet. Die Morphologie des Spindelapparates war dagegen vergleichbar mit der in Kontrollzellen. Die Verminderung der Proteinexpression durch RNAi zeigte eindeutig, dass CP148 nur für die Organisation des radialen Mikrotubuli-Cytoskeletts von Interphase-Zellen, nicht aber für die Organisation der zentralen Spindel und astralen Mikrotubuli, benötigt wird. Die Morphologie des mitotischen Mikrotubuli Cytoskeletts in CP148 RNAi-Zellen war genau gleich dem in AX2-Kontrollzellen. CP148 wird also nur für die Organisation des radialen Mikrotubuli-Cytoskeletts von Interphase-Zellen, nicht aber für die Organisation der zentralen Spindel und astralen Mikrotubuli, benötigt. Da CP148 RNAi-Zellen während der Interphase viele Mikrotubuli enthalten, wird CP148 eindeutig nicht für

die Nukleation und das Wachstum der Mikrotubuli benötigt (Abbildungen 10 B, 11 A und 14 B). Die Färbungen des Knockdown Stamms mit (+)-Ende Markerproteinen wie CP224 oder TACC (Abbildung 11 C), die deutlich mehr Signale im Vergleich zu AX2 zeigten, könnten ein Hinweis auf eine höhere Anzahl von Mikrotubuli sein. CP224 und TACC lokalisieren neben den Mikrotubuli-(+)-Enden auch in der Corona und damit auch an dem Mikrotubuli(-)-Ende-Komplex [22]. Obwohl es meist nur ein γ -Tubulin Signal gab, könnten einige der CP224- und TACC-Signale deshalb auch Mikrotubuli(-)-Enden darstellen. Eine Unterscheidung der Mikrotubuli-(+)-Enden von den (-)-Enden im CP148 RNAi ist damit nicht möglich. Die (-)-Enden der scheinbar frei liegenden Mikrotubuli müssen vor Depolymerisation geschützt werden, da bekannt ist, dass die Erzeugung von freien (-)-Enden z.B. durch Laserablation des Centrosoms eine schnelle Depolymerisation von Mikrotubuli zur Folge hat [72]. Dies könnte im CP148 RNAi Stamm durch CP224 und TACC geschehen, da γ -Tubulin meist nur ein Signal in der Zelle zeigte. Die Mikrotubuli der CP148 RNAi-Zellen sind ungeordnet, d.h. sie zeigen nicht die radiale Struktur die typisch für Interphase Zellen (AX2) ist. Zudem erfolgt keine Konzentration der Mikrotubuli am Centrosom. Ein Mikrotubuli organisierendes Zentrum (MTOC) ist ebenfalls nicht mehr erkennbar. In diesen Zellen kann die Position des „Restcentrosoms“ nur durch die Lokalisation der centrosomalen Core Komponenten wie CP39, CP55 und CP91 bestimmt werden. Während die Bildung geordneter, mitotischer Mikrotubuli-Arrays vom CP148 Knockdown unbeeinflusst ist, erfordert die Bildung des radialen Interphase Mikrotubuli Cytoskeletts offensichtlich den Aufbau einer Corona, wofür wiederum die Rekrutierung von CP148 zum neuen Centrosom direkt nach der Cytokinese essentiell ist. Die Anzahl an CP148 Molekülen, die in der späten Telophase zum Centrosom rekrutiert werden, ist offenbar entscheidend für die Größe der späteren Corona. Die EM-Aufnahmen zeigten (Abbildung 8), dass eine Überexpression von CP148 in einer hypertrophen Corona mit stark vergrößerter Anzahl an elektronendichten Knötchen resultierte. Dagegen führte der CP148 Knockdown zu einem Verlust der Corona. Dies zeigt, dass die Expression von CP148 streng reguliert werden muss. Dagegen war der centrosomale Core in CP148 RNAi-Zellen weitgehend unbeeinflusst und besaß eine Wildtyp-ähnliche Morphologie. Somit erfolgt die Bildung intakter Core-Regionen der richtigen Größe unabhängig von CP148 oder anderen Corona Proteinen.

3.1.2 Astrale Mikrotubuli und mitotische Kinasen spielen eine Rolle bei der Corona Biogenese

In tierischen Zellen sind astrale Mikrotubuli zusammen mit cortikalem Dynein für die Spindel-Orientierung erforderlich und bestimmen die Orientierung der Furchungsebene bei der Teilung epithelialer Stammzellen, was z.B. bei der Entwicklung des Neocortexes das Zellschicksal nach der Teilung bestimmt [73]. In amöboiden vegetativen Zellen, liefert die Zellteilung immer zwei identische Tochterzellen. Eine bestimmte Spindelorientierung ist hier für die Zelldifferenzierung daher nicht nötig. Jedoch zeigen die Ergebnisse aus GFP-CP148 überexprimierenden Zellen eine Rolle von astralen Mikrotubuli bei der Neubildung der Corona. In der frühen Telophase entstehen im Cytosol viele GFP-CP148-positive Protein-Cluster, welche mit astralen Mikrotubuli in Verbindung stehen. Diese Cluster bewegen sich in einer radialer Art und Weise in Richtung der späten mitotischen Spindelpole. Da einige dieser Cluster auch γ -Tubulin enthalten legt dies nahe, dass Mikrotubuli-Nukleationskomplexe zuerst im Cytoplasma mit GFP-CP148 vormontiert und dann entlang astraler Mikrotubuli in Richtung der Spindelpole transportiert werden. Dort bilden sie zusammen mit der dreilagigen Core-Region und einer hypertrophen Corona das neue Centrosom. Die zum Mikrotubuli(-)-Ende hin gerichtete Migration der GFP-CP148 Moleküle deutet darauf hin, dass Dynein diese Bewegung als (-)-Ende gerichtetes Motorprotein entlang der astralen Mikrotubuli vorantreiben könnte. Ebenso wäre ein Transport durch ein (-)-Ende gerichtetes Kinesin möglich [74-75]. Die Interaktion von CP148 mit Dynein konnte bislang noch nicht erfolgreich bestätigt werden. Man kann davon ausgehen, dass die Präformation der γ -Tubulin-Komplexe mit CP148 und anderen Proteinen wahrscheinlich auch bei normaler Expression von CP148 in AX2 Zellen auftritt, so dass diese Komplexe ebenfalls zum Ende der Mitose mit Hilfe von z.B. Dynein an die Spindelpole transportiert werden. Die Vermutung wird zudem durch die Tatsache unterstützt, dass sowohl das Dynein regulierende Protein LIS1 als auch die schwere Dynein-Kette in der Corona des Interphase Centrosoms lokalisieren [39, 76]. Die Zellzyklus-abhängige Dynamik der Corona ist wahrscheinlich die Voraussetzung für die Verdopplung des Centrosoms. Ohne die Dissoziation der Corona in der Prophase könnten sich die beiden äußeren Schichten der Core-Region nicht voneinander trennen. Eine Ausbildung der mitotischen Spindel wäre dann unmöglich. Das dynamische Verhalten der Corona und die Neuverteilung der Mikrotubuli(-)-Ende assoziierten Proteine wie γ -Tubulin und CP224 müssen streng, z.B. durch mitotische Kinasen reguliert werden. Die CP148 Proteinsequenz zeigt fünf potentielle Phosphorylierungsstellen für CDK1 und Polo-Like-Kinase (PLK) an. Die bekannteste Aufgabe der beiden Kinasen, die Phosphorylierung von

Zielproteinen zur Initiation der M-Phase, stimmt mit dem Zeitpunkt des Corona Abbaus und dem Verschwinden von CP148 am Centrosom überein. Zudem besitzt das Dictyostelium Genom Gene für beide Kinasen. Die einzige in Dictyostelium vorkommende PLK ist wahrscheinlich der PLK4 in tierischen Zellen, die eine wichtige Rolle bei der Verdopplung der Centriolen besitzt, funktionell laut Schulz *et al.* [41] am ähnlichsten. Um mögliche Aussagen über die Rolle der einzelnen Phosphorylierungsstellen treffen zu können, werden diese in der Fortsetzung des Projektes künftig genauer untersucht. Eine weitere Möglichkeit der Regulation von CP148 könnte durch die Bindung von Calmodulin oder Calcium-Ionen erfolgen. CP148 besitzt eine vorhergesagte Calmodulin Bindungsstelle sowie ein EF-hand Motiv, das Calcium-Ionen binden kann, was dann zu einer Änderung der Konformation führen könnte. Calmodulin ist ein hochkonserviertes Protein und wird durch Calcium-Ionen aktiviert. In seiner aktiven Form bindet es an Zielproteine und verändert deren Eigenschaften bezüglich ihrer Bindungspartner [77]. In Hefe ist die Bindung von Calmodulin an SPC110p essentiell für die Montage einzelner Komponenten des Spindelpolkörpers (SPB) [78]. CDK5RAP2, ein Gerüstprotein in Säugern sowie das homologe Centrosomin (Cnn) in Drosophila besitzen als Proteine der PCM ebenfalls Calmodulin Bindungsstellen [79]. Eine der Bindungsstellen, das CM2-ähnliche Motiv in CDK5RAP2, ist für die centrosomale Lokalisation des Proteins mitverantwortlich [79]. Eine Bindung von Calmodulin an CP148 könnte demnach eine weitere Voraussetzung zur Bildung oder Stabilisierung der Corona und damit einen Einfluss auf die Ausbildung des radialen Mikrotubuli Cytoskeletts besitzen. Außerdem könnte die Bindung von Calmodulin an CP148 für die korrekte centrosomale Lokalisation nötig sein. Da CP148 und eine Corona an den mitotischen Spindelpolen fehlen stellt sich die Frage, wie diese ihre Mikrotubuli organisieren. Eine Möglichkeit besteht darin, dass Spindelbildung und Nukleation mitotischer Mikrotubuli durch einen acentrosomalen RanGTP-abhängigen Weg erfolgt. Dieser Weg wurde erstmals bei Xenopus Eiextrakten beschrieben. Die Bildung von RanGTP wird durch einen chromatinassoziierten Guanine-Nucleotide-Exchange-Factor (GEF,RCC1) aktiviert und führt zusammen mit weiteren Spindelaufbaufaktoren, einschließlich Aurora A, Motorproteinen sowie Mikrotubuli-assoziierten Proteinen [80-81] zur Ausbildung von chromatinassoziierten Mikrotubuli. Um am Chromatin nukleierte Mikrotubuli zu ordnen, agieren Kinesin und Dynein in diesem acentrosomalen Spindelbildungsmodell zusammen, so dass eine bipolare Spindel ausgebildet werden kann. Die Anwesenheit von astralen Mikrotubuli in CP148 RNAi-Zellen spricht jedoch dagegen, weil diese in tierischen Zellen nicht auf dem acentrosomalen Weg gebildet werden können [82]. Somit ist es auch möglich, dass die Verankerung der Mikrotubuli-

Nukleationskomplexe an den centrosomalen Core-Komponenten während der Interphase und Mitose von jeweils unterschiedlichen Proteingruppen bewerkstelligt wird.

3.1.3 Ähnlichkeiten von CP148 als Corona organisierendes Protein zu anderen bekannten Gerüstproteinen der PCM

Entsprechend der in dieser Arbeit erhobenen Daten ist CP148 ein Gerüstprotein für die Ausbildung der Mikrotubuli-nukelierenden Corona um die centrosomale Core-Region und damit essentiell für die radiale Anordnung des Mikrotubuli Cytoskeletts. Da die Corona das funktionelle Äquivalent zur PCM in höheren Organismen ist, stellt sich nun die Frage mit welchem bekannten Gerüstprotein der tierischen PCM CP148 verglichen werden kann. Wie in der Einleitung zur Ausbildung der PCM bereits erwähnt sind in diesem Zusammenhang bisher drei große gerüstgebende coiled-coil Proteine in höheren Organismen bekannt: D-PLP/pericentrin, D-Spd-2/Cep192 und Cnn/Cep215/Cdk5Rap2 [33-34, 83]. Alle diese Proteine weisen zwischen den verschiedenen Organismen eine nur sehr schwache Konservierung ihrer Aminosäuresequenz auf. Daher überrascht es nicht, dass auch CP148 keine auffallenden Sequenzähnlichkeiten zu diesen Proteinen zeigt, abgesehen von der allgemeinen Ähnlichkeit zwischen den coiled-coil Domänen. Aufgrund dessen kann man anhand der Aminosäuresequenz nicht beurteilen, ob CP148 ein funktionelles Homologes eines dieser Proteine ist. Dictyostelium-Zellen besitzen aber bereits ein echtes Ortholog zu Cep192 [41]. Von den verbleibenden beiden Proteinen zeigt nur Cnn auch Homologien außerhalb des Tierreichs, wie zum Beispiel in Pilzen [84]. Eine Ähnlichkeit von CP148 zu Drosophila Cnn ist, dass die Abwesenheit von Cnn in Drosophila Embryos die Ablösung der Centriolen von der PCM und vom Zellkern. Die Centriolen bewegten sich in einem sogenannten „rocketing“ durch den Embryo [85]. Dieser Phänotyp erinnert an die Ablösung der verbleibenden centrosomalen Core-Region in CP148 RNAi-Zellen von der Kernhülle (Abbildung 14 F und H). CDK5RAP2 wurde als mögliches homologes von Cnn beschrieben. Ein Funktionsverlust des Proteins verhindert die centrosomale Nukleation von Mikrotubuli, was wiederum in einem ungeordneten Interphase Mikrotubuli Cytoskelett resultiert [84]. Dieser Phänotyp erinnert an den der CP148 RNAi-Zellen, die ebenfalls ein ungeordnetes Interphase Mikrotubuli Cytoskelett aufweisen (Abbildung 10 B und 11 A). Außerdem führte ein Knockdown von CDK5RAP2 zu einer Reduzierung des Dynein-Levels am Centrosom. CDK5RAP2 könnte ebenfalls für den Dynein-abhängigen Transport von PCM Proteinen während der Centrosomen Reifung mitverantwortlich sein [31, 84]. Entsprechend sprechen die Ergebnisse dieser Arbeit dafür, dass CP148 über eine Interaktion mit Dynein eine

Schlüsselrolle beim Transport von Corona-Komponenten an das Centrosom hat (Abbildung 5). Somit wäre es möglich, dass CP148 ein funktionelles Homologes von CDK5RAP2 ist. Dagegen besteht keine Ähnlichkeit von CP148 zu Pericentrin (PCNT), da sich Defekte in PCNT meist auf die mitotische Spindel auswirken [86]. CP148 besitzt aber keinen Einfluss auf die Bildung der mitotischen Spindel. Somit besteht eher eine funktionelle Homologie von CP148 zu CDK5RAP2 oder Cnn.

3.1.4 CP148 ist an der Centrosom-Zellkern Verbindung und der Clusterung der Centromere beteiligt.

Das Fehlen von CP148 durch RNAi bewirkt eine Störung der Centrosomen-Kern Verbindung und gleichzeitig eine gleichmäßige Verteilung des normalerweise pericentrosomalen Sun1 Proteins in der Kernhülle (Vergleich Abbildung 14 A mit B). Die in Kontrollzellen pericentrosomale Anreicherung von Sun1 in der Kernhülle wurde damit vollständig aufgehoben. Sun1 ist ein Protein der inneren Kernmembran, das bei tierischen Zellen eine Verbindung zur äußeren Kernmembran über Interaktionen mit KASH-Domain-Proteinen herstellt. Die KASH-Domain-Proteine interagieren wiederum mit Dynein und anderen Proteinen um das Centrosom an den Zellkern zu binden [87]. In Dictyostelium konnten bisher keine KASH-Domain-Proteine charakterisiert werden. Die bisherige Datenlage stützt vielmehr ein Modell, in dem Sun1 bei Dictyostelium in beiden Kernmembranen eine Funktion hat und die geclusterten Centromere auf der Kernseite mit dem cytosolischen Centrosom verbindet (siehe Schema in Abbildung 36). Eine Störung der Sun1-Funktion führt zur Ablösung des Centrosoms und der geclusterten Centromere von der Centrosomen-Kern-Verbindung [43]. Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen vermuten, dass CP148 das Centrosom über eine Assoziation mit Sun1 mit der Kernhülle und damit auch dem Centromer im Kern verbindet. Diese Verbindung erfolgt entweder über eine direkte Interaktion von Sun1 und CP148 oder indirekt unter Beteiligung weiterer centrosomaler Proteine. Des Weiteren ist die stabile Verbindung zwischen Centrosom und Kern essentiell für die Aufrechterhaltung der pericentrosomalen Konzentration von Sun1 in Dictyostelium. Die Ursache für die Dispersion der Centromere in CP148 RNAi-Zellen kann nicht allein die Veränderung der Sun1 Lokalisation sein. Bei einer Störung der Sun1 Funktion durch die Überexpression von GFP-Sun1 oder der Expression von Sun1 Fragmenten, die einen dominant negativen Effekt bewirkten, konnte nur eine Lokalisationsänderung des Centromer-Clusters beobachtet werden. Eine Dispersion der Centromere wie beim CP148 Knockdown hatte dies jedoch nicht zu Folge [43].

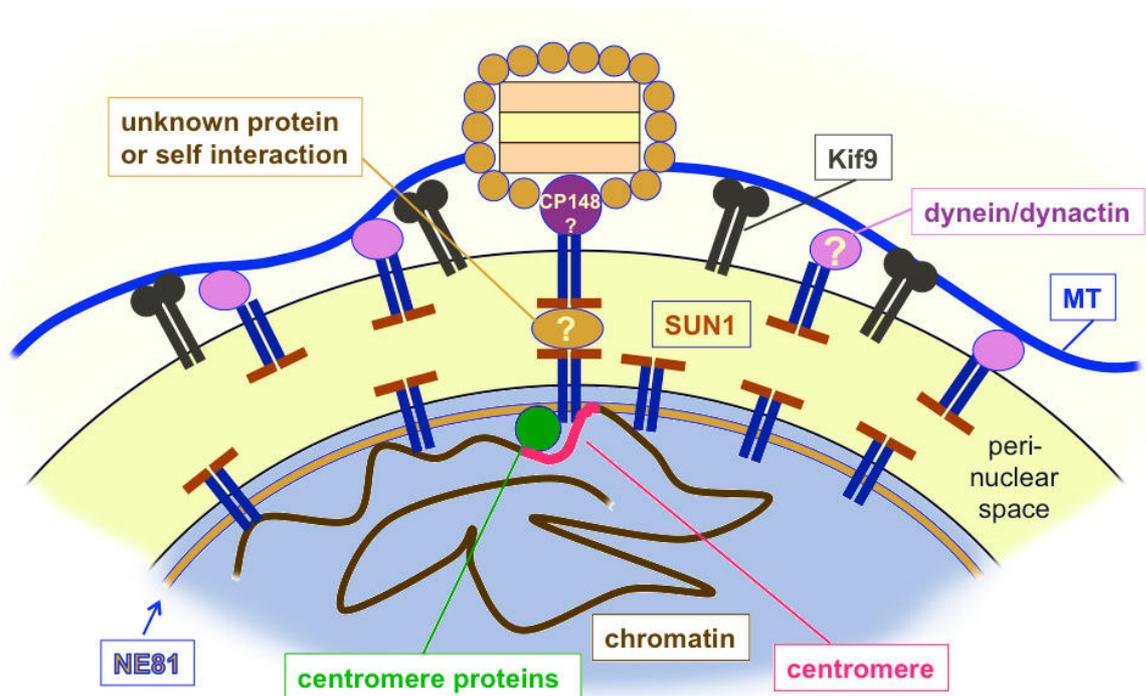


Abbildung 36: Schema zur Centrosomen-Kern-Centromer Verbindung in Dictyostelium. CP148 könnte wie Sun1 eine zentrale Rolle bei dieser Verbindung spielen. Bisher noch unbekannt oder fehlende Interaktoren sind mit einem Fragezeichen gekennzeichnet. Modifiziert nach Schulz *et al.*[43].

Für einen direkten Einfluss von CP148 auf die Centromer-Clustering müsste zumindest ein kleiner Pool an CP148 Proteinen im Kern sowie eine Kernlokalisationssequenz (NLS) in der Proteinsequenz vorhanden sein. Da beides nach bisherigen Untersuchungen nicht zutrifft, ist davon auszugehen, dass der Einfluss von CP148 auf die Centromer-Clustering nur indirekt über weitere, bisher noch unbekannte Proteine, erfolgen kann. Diese potentiellen Interaktionspartner könnten in Interaktionsstudien durch pull-down-Experimente oder Yeast-Two-Hybrid-Screens identifiziert werden. Die Rolle von CP148 bei der Centrosomen-Kern-Centromer-Verbindung könnte auch die häufig auftretende Aneuploidie in CP148 RNAi-Zellen erklären. Der Verlust oder die Störung dieser Verbindung und die damit verbundene Dispersion der Centromere könnten zu mitotischen Defekten führen. Eine Möglichkeit wäre, dass es zu einer Verlängerung der Prometaphase kommt und die Zellen nach einiger Zeit mit bereits verdoppelten aber nicht getrennten Chromosomen in die Interphase zurückkehren. Da der Spindel Checkpoint in Dictyostelium weniger stringent funktioniert als in anderen Zelltypen [70] kann dies im nächsten Zellzyklus zu einer multipolaren Spindel mit einer ungleichen Chromosomensegregation führen. In einer früheren Untersuchung von Dictyostelium Zellen, die mit Mikrotubuli depolymerisierenden Drogen behandelt wurden, konnte beobachtet werden, dass Zellen die längere Zeit in der Prometaphase verweilen die

Mitose abbrechen und in die Interphase zurückkehrten. Da die Centrosomen auch hier bereits verdoppelt waren, aber die Chromosomen noch nicht getrennt, war das Ergebnis ebenfalls Zellpopulationen mit Aneuploidie [88].

Zusammengefasst ist CP148 ein essentielles Gerüst-Protein bzw. „Klebstoff“ für den Aufbau und die Organisation der Mikrotubuli-nukleierenden centrosomalen Corona in *Dictyostelium*. CP148 könnte aufgrund seines Bewegungsmusters als GFP-Fusionsprotein mit Dynein Motorproteinen interagieren. Letztere sind in der Telophase vermutlich wichtig für den Transport von Corona-Komponenten entlang der astralen Mikrotubuli zum neu entstehenden Centrosom. CP148 könnte hier eine Schlüsselfunktion besitzen, da es bereits im Cytoplasma Komplexe mit verschiedenen Corona-Komponenten bildet, welche dann über Dynein-Motoren zum Centrosom transportiert werden könnten. Die Rekrutierung von Mikrotubuli-Nukleations-komplexen erfolgt in der Interphase und der Mitose auf verschiedenen Wegen, da die Ausbildung der mitotischen Spindel in CP148 RNAi-Zellen nicht beeinflusst wurde. Somit gibt es in *Dictyostelium* mindestens zwei Wege um Mikrotubuli-Nukleations-komplexe zu den Centrosomen bzw. Spindelpolen zu rekrutieren. CP148 wird außerdem für die Aufrechterhaltung der stabilen Centrosomen-Kern-Centromer-Verbindung benötigt. Damit wurde auch erstmalig gezeigt, dass diese Verbindung nicht über die centrosomale Core-Region, sondern durch eine Interaktion von Corona-Proteinen mit Sun1 sowie anderen Linkern erfolgt.

3.2 Das neue Core-Protein CP55

Von den bisher sechs bekannten Proteinen der Core-Region, CP39, CP44, **CP55**, CP75, CP91 [41] und DdNek2 [42], lokalisieren nur CP55 und die Kinase DdNek2 sowohl während der Interphase als auch in der Mitose am Centrosom. Jedoch ist das Verhalten der DdNek2 Kinase während der frühen Mitose unbekannt. Somit ist CP55 von den oben genannten Proteinen das erste, permanent am Centrosom lokalisierende Core-Protein. Die Ergebnisse zeigen deutlich, dass CP55 verschiedene Funktionen besitzt und mit anderen Proteinen einen funktionellen Komplex bilden muss.

3.2.1 CP55 spielt eine wichtige Rolle in der Stabilisierung und Regulierung der Corona

Trotz des kleinen mobilen Pools an GFP-CP55 Proteinen, weist das Ergebnis der FRAP Experimente eher auf eine stabile, nicht mobile Verbindung von CP55 Proteinen im Interphase Centrosomen hin. Die Bedeutung der mobilen Phase ist bisher noch unklar. Eine Möglichkeit ist, dass eine cytoplasmatische GFP-CP55 Fraktion existiert. Dafür spricht auch das Auftreten von GFP-CP55 Aggregaten im Cytoplasma, die keine MTOCs darstellen (Abbildung 20 A'''' und C'''' Pfeilspitzen). Der Grund für eine cytoplasmatische GFP-CP55 Fraktion könnten besetzte Bindungsstellen für GFP-CP55 bzw. CP55 am Centrosom aufgrund der starken Überexpression sein (Westernblot Abbildung 20 GFP-CP55 Signal markiert mit #). Da das endogene CP55 Protein nicht im Cytosol nachgewiesen werden konnte, ist das Vorhandensein eines solchen mobilen Pools an endogenem CP55 bei Wildtypzellen sehr unwahrscheinlich (Abbildung 17 C). Das Verhalten von GFP-CP55 in den FRAP-Experimenten, zusammen mit seiner permanenten Präsenz am Centrosom während der Mitose, deutet auf eine Funktion für den Strukturhalt des Centrosoms hin. Überraschenderweise führt der Knockout von CP55 zu überlebensfähigen Klonen, welche ein mehr oder weniger intaktes Centrosom und funktionelle Spindeln bilden können. Dies zeigt deutlich, dass die Hauptfunktion von CP55 nicht in der strukturellen Integrität der beiden äußeren Core-Schichten des Interphase Centrosoms liegen kann, da aus Letzteren unter anderem die mitotischen Spindelpole hervorgehen [46]. Bei den zu erwartenden Mitosedefekten wären somit bei einem Knockout keine lebensfähigen Mutanten zu erwarten. CP55 muss also andere strukturelle Aufgaben besitzen. Besonders auffällig war der Knockout-Phänotyp der überzähligen MTOCs, die keine echten Centrosomen darstellen. Ihnen fehlt die geschichtete Core-Region, was die Aufnahmen der Elektronenmikroskopie

sowie auch die Immunfluoreszenzuntersuchungen mit CP39/CP91 Färbungen sehr deutlich zeigten (Abbildungen 24 C und D, Abbildung 25). Die zusätzlichen MTOCs werden in genau dem Stadium der Telophase gebildet, in dem die Corona neu aufgebaut wird. Obwohl die CP55 k/o Zellen noch befähigt sind eine Corona auszubilden, wirkt sich der Verlust der CP55 Expression negativ auf die Organisation und die Verbindung zwischen der äußeren Schicht der Core-Region und der Corona aus. Die hier erhobenen Daten deuten darauf hin, dass die Corona in CP55 k/o Zellen relativ locker aufgebaut und schwächer mit der Core-Region verbunden ist. Durch die in der Mitose auftretenden Zugkräfte der mitotischen Spindel und der astralen Mikrotubuli könnten Corona-Fragmente herausgerissen werden, die dann im Cytosol kleine, zusätzliche MTOCs bilden. Diese Vermutung wird durch die ultrastrukturellen Aufnahmen der CP55 k/o Centrosomen bestätigt. Die Corona erschien hier weniger strukturiert als in den Kontrollzellen. Zudem wirkt sie verglichen mit der im Kontrollstamm etwas aufgequollen und unregelmäßiger was für eine lockerere, ungeordnetere Strukturierung spricht. Zudem sind die Elektronen-dichten Knötchen in den CP55 k/o Zellen nicht eindeutig erkennbar (Vergleich EM Abbildungen 25 A, B, C, D; bei Kontrolle Pfeilspitze auf Knötchen). Eines der bedeutendsten Proteine zur Rekrutierung von Corona-Material an die Core-Region in der späten Telophase ist wie vorher bereits beschrieben CP148. Deshalb wurde eine mögliche Interaktion zwischen den beiden Proteinen untersucht. In Co-Immunpräzipitationsexperimenten konnte eine direkte Interaktion der beiden Proteine nicht nachgewiesen werden. Dazu passt, dass die centrosomale Lokalisation von CP55 in CP148 RNAi-Zellen unverändert war. In CP55 k/o Zellen konnte bezüglich der Lokalisation von CP148 in der Interphase ebenfalls keine Veränderung festgestellt werden. Bei einer direkten Interaktion beider Proteine sollte es beim Verlust eines Interaktionspartners zu deutlichen Lokalisationsänderungen beim Partner kommen. Allerdings konnte zwischen den beiden Proteinen eine indirekte Interaktion nachgewiesen werden, da das Fehlen von CP55 eine verfrühte Rekrutierung von CP148 an den mitotischen Spindelpol bewirkt. In Kontrollzellen erfolgt die Rekrutierung von CP148 erst in der Telophase zum Zeitpunkt der Corona-Neubildung. In CP55 k/o Zellen konnte CP148 bereits in der Metaphase an den Polen nachgewiesen werden. Die bisherigen Erkenntnisse aus der Charakterisierung von CP148 zeigen, dass die Bildung und Anordnung der Interphase Mikrotubuli durch einen anderen Satz an Proteinen, einschließlich CP148, reguliert wird als die Bildung der astralen Mikrotubuli an den Spindelpolen in der Anaphase und Telophase. Letztere benötigen zur Ausbildung kein CP148. Eine zu frühe Rekrutierung von CP148 an die Spindelpole könnte demnach zur Bildung einer ungeordneten, lockeren und damit weniger stabilen Corona führen. Diese

lockere Corona kann den auftretenden Zug- und Schubkräften der astralen Mikrotubuli unter Umständen mechanisch nicht standhalten. Auf diese Weise würde CP148 mit bereits rekrutiertem Corona-Material durch Abreißen von den Spindelpolen ins Cytosol gelangen. Hier könnte CP148 weitere Mikrotubuli-Nukleationskomplexe rekrutieren und so helfen die neuen überzähligen MTOCs auszubilden. Zum Zeitpunkt des Aufbaus der Interphase Mikrotubuli bilden dann auch diese überzähligen MTOCs ein radiales Cytoskelett. Die Beobachtung, dass alle überzähligen MTOCs CP148 enthalten bestätigt diese Vermutung (Abbildung 24 E).

Zusammenfassend kann man sagen, dass CP55 offensichtlich den Zeitpunkt der Corona-Neubildung über die Rekrutierung von CP148 an die Spindelpole reguliert. Eine Untersuchung mit den bisherigen zur Verfügung stehenden molekularen Methoden gestaltete sich als schwierig. Alle Corona Antikörper sind gegen Proteine gerichtet, die auch während der Mitose auch an den Spindelpolen lokalisieren, wie zum Beispiel TACC, CP224, EB1 und γ -Tubulin. Somit kann man erst einmal nur spekulieren wie CP55 eine zu frühe Bindung von CP148 an die Spindelpole verhindert. Die CP55 Aminosäuresequenz enthält vier Konsensus-Sequenzen für eine Phosphorylierung durch Plk1. Eine Phosphorylierung durch Plk1 könnte eine Konformationsänderung von CP55 bewirken. CP55 verbleibt dadurch zwar noch am Centrosom, aber bisher noch unbekannte direkte Interaktoren oder Proteinkomplexe, deren Bindungsstellen nun verdeckt oder geöffnet sind, könnten nun vom Centrosom abdissoziieren oder gebunden werden. Dies wiederum führt dazu, dass CP148 an den Spindelpol binden und Corona-Material rekrutieren kann. Die Lokalisation der Nek2-Kinase ähnelt der von CP55 [42]. Damit könnte CP55 auch ein Substrat für Nek2 sein, die durch Phosphorylierung von CP55 an bisher noch unbekanntenen Stellen ebenfalls eine Konformationsänderung des Proteins bewirken könnte. In zukünftigen Experimenten soll überprüft werden, ob CP55 ein Substrat von Plk1 sowie Nek2 ist und sich dies auf die CP148 Rekrutierung und das Verhalten von CP55 am Centrosom auswirkt.

3.2.2 CP55 spielt eine Rolle in der Reorganisation des Golgi-Apparates und damit in der Phagozytose

Die Beobachtung, dass CP55 k/o Zellen nicht mehr in der Lage waren sich durch Phagozytose von Bakterien zu ernähren, belegt eine weitere Funktion von CP55. Obwohl der Einfluss eines centrosomalen Proteins auf die Phagozytose zunächst überraschend erscheint, ist dieser mögliche Phänotyp bereits bekannt. In einer kürzlich veröffentlichten Studie zeigte die Arbeitsgruppe von Dr. Annette Müller-Taubenberger, dass die Dictyostelium NDR Familie

Kinase NdrA ein in die Phagozytose involviertes centrosomales Protein ist [89]. Die Autoren beobachteten in ihrer Studie an NdrA Knockout-Zellen Schwierigkeiten bei der Ausbildung des „phagocytic Cup“ und diskutierten die Möglichkeit der Beeinträchtigung des Vesikeltransports durch das fehlende NdrA, da NdrA normalerweise mit dem Golgi-Protein EmpC interagiert. Das legt zunächst den Gedanken nahe, dass NdrA und CP55 miteinander interagieren könnten. Eine solche Interaktion von CP55 mit NdrA ist jedoch sehr unwahrscheinlich. (1) NdrA lokalisiert in der centrosomalen Corona und nicht wie CP55 in der Core-Region. (2) Die Kinase ist im Gegensatz zu CP55 nicht über den gesamten Zellzyklus am Centrosom lokalisiert, sondern dissoziiert während der Mitose ab. (3) NdrA Knockout-Zellen sind immer noch in der Lage auf Bakterien zu wachsen, CP55 k/o Zellen zeigen dagegen kein Wachstum auf Bakterien und haben (4) keine Schwierigkeiten bei der Ausbildung des „phagocytic Cup“ (siehe Abbildung 31 und 32). Der in CP55 k/o Zellen beobachtete „Phagozytose Defekt“ beruht mit großer Wahrscheinlichkeit auf dem einhergehenden Zerfall bzw. dem Verlust der Reorganisation des Golgi Apparates nach der Mitose. In einer früheren Studie wurde bereits gezeigt, dass einzelne Tubuli des intakten Golgi-Apparates einen Kontakt zu frühen Phagosomen/Endosomen herstellen [56]. Dieser Kontakt ist wahrscheinlich für den direkten und schnellen Transport von Proteinen zu den frühen Endosomen wichtig, wo sie zur Verdauung aufgenommener Nahrungspartikel benötigt werden. Wenn der Golgi nach der Mitose nicht wieder in seiner ursprünglichen Form reorganisiert werden kann, ist die Interaktion von einzelnen Golgi-Tubuli mit frühen Endosomen nicht mehr möglich. Dadurch würde der zur Verdauung von Bakterien benötigte Enzymcocktail nicht zu den frühen Endosomen gelangen, so dass der Endosomeninhalt nicht vollständig abgebaut und als Nahrung von Dictyostelium verwendet werden kann. Die molekulare Verbindung zwischen CP55 und dem Zusammenbau des Golgi-Apparates konnte in dieser Arbeit noch nicht genauer untersucht werden und ist Gegenstand künftiger Untersuchungen. Nach der Corona-Neubildung kann CP55 keinen direkten Zugang mehr zu Golgi-assoziierten Proteinen haben. Somit könnte das centrosomale CP55 eine Rolle in einem frühen regulatorischen Prozess im Golgi-Zusammenbau spielen. Der Zerfall des Golgi-Apparates beginnt am G2/M Übergang [90]. Die Aktivität der Protein Kinasen Plk3 und MEK1 [91] sowie des Spaltungsprotein BARS [92] führt zur Teilung des Golgi-Stapels in mehrere kleine Stapel. Diese werden beim Eintritt in die Metaphase durch einen Plk1- und CdK1-abhängigen Mechanismus weiter fragmentiert und monoubiquitiniert, so dass kleine Vesikel entstehen, die sich im Cytoplasma verteilen [51, 90]. Für diese Vesikelbildung werden außerdem COPI sowie ARF1 und der Coatomer-Complex benötigt [51]. Das

Ubiquitinsignal dient hier nicht der Degradation durch das Proteasom, sondern verbleibt während der Mitose an den Vesikeln und reguliert damit die Aufrechterhaltung des vesikulären Golgi-Clusters [93]. Die Golgi-Reassemblierung in der Telophase beginnt mit einer Deubiquitinierung der Vesikel durch VCIP135 und der damit einhergehenden Dephosphorylierung durch PP2A von Golgi-Stapel-Proteinen [51]. Wie genau dieser Zyklus des Golgi-Apparats in *Dictyostelium* abläuft, wurde bisher noch nicht genau untersucht. Deshalb kann man hier nur spekulieren, welchen Einfluss CP55 auf diesen Zyklus haben könnte. Eine Möglichkeit wäre der Einfluss von CP148 bei der Reassemblierung des Golgi Apparates. Im CP55 k/o wird CP148 zu früh an die Spindelpole rekrutiert und nicht mehr in der Telophase, in der auch die Golgi-Reassemblierung stattfindet. In der Untersuchung von CP148 wurde bereits gezeigt, dass Corona-Komponenten sich teilweise mit CP148 zu einer Art Vorkomplex im Cytoplasma zusammenlagern und über Motorproteine zum Centrosom transportiert werden. Da das *Dictyostelium* Centrosom ähnlich wie bei Säugetieren in Form eines Stapels pericentrosomal im Cytoplasma liegt, könnte der Transport der Golgi-Vesikel in die pericentrisomale Region über CP148 und astrale Mikrotubuli erfolgen. Dafür müssten die Komponenten der Golgi Vesikel deubiquitiniert und dephosphoryliert sein, was regulatorisch in der Telophase geschieht [94]. Wenn sich CP148 im CP55 k/o nun bereits in der frühen Metaphase sich an den Spindelpolen anlagert, erfolgt kein Transport der Golgi Vesikel in der Telophase und damit keine Bildung der Golgi-Stapel um das Centrosom. In diesem Falle müsste im CP148 RNAi ebenfalls eine Golgi-Dispersion beobachtet werden können was bisher noch nicht untersucht wurde.

3.2.3 CP55 ist mit verantwortlich für die Ausbildung einer bipolaren Spindel in der Mitose und für die Erhaltung der Ploidie

Unabhängig vom Einfluss von CP55 auf die Corona und den Golgi-Apparat weisen die Phänotypen der CP55 k/o Zellen auch auf eine wichtige Funktion in der Centrosomenverdopplung in der frühen Mitose hin. In fixierten Präparaten konnte eine ungewöhnlich hohe Anzahl von Zellen im Prophase-Stadium, dem Zeitpunkt der Teilung der centrosomalen Core-Region, beobachtet werden. Bei Analysen lebender GFP- α -Tubulin/CP55 k/o Zellen war der durchschnittliche Aufenthalt der Mitosezellen in der Prophase im Durchschnitt (20 Minuten) ebenfalls ungewöhnlich lang. Nur ein Bruchteil dieser Zellen konnte eine bipolare Spindel bilden und die Mitose normal fortsetzen. In fast 50 % der Fälle bildete sich jedoch eine monopolare Spindel. In diesem Fall erfolgte eine Spindelausbildung offensichtlich von den nicht separierten, äußeren Schichten der Core-

Region. Damit einhergehend ist natürlich eine korrekte Separation der Chromosomen nicht mehr möglich. Dieser Phänotyp resultiert letztendlich wie bereits in 3.1.4 diskutiert in einer Aneuploidie. In höheren Zellen bzw. Organismen führt eine solche Spindelfehlbildung und fehlerhafte Ausrichtung der Chromosomen in der Metaphase-Platte zu einer Verlängerung der Aktivierung des Spindel-Checkpoints (SAC), was letztendlich zur Apoptose oder in seltenen Fällen auch zum „mitotic slippage“ führen kann [95-96]. Die Dictyostelium Amöben besitzen aufgrund fehlender Caspasen keinen Apoptose Weg [97]. Des Weiteren scheint der SAC bei Dictyostelium weniger streng als in höheren Zellen zu arbeiten [70], so dass hier ein vermehrtes Auftreten des „mitotic slippage“ möglich ist, also die Fähigkeit der Zellen, die Mitose auch ohne die Inaktivierung des SAC zu verlassen. Dies liegt mit großer Wahrscheinlichkeit nicht an einem separaten Weg der Cyclin B Proteolyse, sondern einfach in einer nicht 100 %-igen Blockierung des Anaphase-Promoting Complex (APC/Cs) durch den SAC [96]. Für diesen Weg ist auch in humanen Zellen keine Caspase nötig [98]. Somit ist es möglich, dass Cyclin B über seine Dbox von APC ubiquitiniert und damit das Cyclin B Level unter den kritischen Punkt zur Aufrechterhaltung der Mitose gesenkt wird. Dies erklärt auch, warum Dictyostelium-Zellen nach einer fehlerhaften Chromosomensegregation wieder in die Interphase zurückkehren können. Dieser Phänotyp konnte bereits in Experimenten beobachtet werden, in denen Dictyostelium-Zellen mit Mikrotubuli depolymerisierenden Drogen behandelt wurden [88]. Die so neu gebildeten Interphase-Zellen zeichneten sich durch einen erhöhten DNA Gehalt aus, wenn sie in die nächste S-Phase eintraten. In vielen tierischen Zellen führt dies meist zu nicht überlebensfähigen Tochterzellen [99]. Dictyostelium Zellen scheinen mit einer erhöhten Ploidie trotzdem überleben zu können.

3.2.4 CP55 hat eine SAS-6-ähnliche Funktion in der Mitose

Bei BLAST Untersuchungen des CP55 Proteins in anderen Organismen konnten keine direkten Homologen gefunden werden. Jedoch könnte CP55 ein funktionelles Homologes zu SAS-6 sein. SAS-6 gehört zu einer Proteinfamilie, die für die Centriolenverdopplung in *C. elegans* und humanen Zellen benötigt wird [100]. Sie zeichnet sich durch eine konservierte PISA Domäne, eine relativ einheitliche Proteingröße und Struktur aus [100]. In niederen Eukaryoten wie *S. cerevisiae* und *S. pombe* konnten bisher keine Proteine, mit PISA Domäne gefunden werden. Es existieren aber Protisten wie *Plasmodium falciparum* und *Giardia lamblia*, in denen die Domäne nachgewiesen werden konnte. Ein Alignment dieser Domäne mit der CP55 Proteinsequenz deutet darauf hin, dass CP55 ebenfalls eine PISA Domäne von AS 166 bis AS 219 besitzen könnte (siehe Abbildung 37). Damit beginnt die Domäne wie bei

den anderen SAS-6 homologen Proteinen ebenfalls vor einer coiled-coil Region. Zudem besitzt CP55 mit 470 AS eine vergleichbare Länge wie SAS-6 und die coiled-coil Regionen sind gleichartig verteilt. Somit besteht die Möglichkeit, dass CP55 strukturell ähnlich wie SAS-6 gefaltet wird. Eine Überexpression von SAS-6 führt zu überzähligen, Centriol-artigen Foci, die auch andere centriolare Proteine enthalten. Die CP55 Überexpression resultierte ebenfalls in zusätzlichen Centrosomen mit den bekannten Core Proteinen CP39 und CP91 sowie einer Mikrotubuli nukleierenden Corona. SAS-6 RNAi-Zellen zeichneten sich durch die Bildung monopolarer Spindeln aus [99]. Ein ähnlicher Phänotyp konnte auch bei CP55 k/o Zellen beobachtet werden (siehe Abbildung 26 B). Die centrosomale Core-Region im Dictyostelium Centrosom ist das Äquivalent zu den Centriolen in tierischen Zellen. Zudem ist CP55 das bisher einzige charakterisierte Core-Protein, das während der Mitose am Spindelpol verbleibt und eine wichtige Funktion bei der Verdopplung oder Teilung der Core-Region in

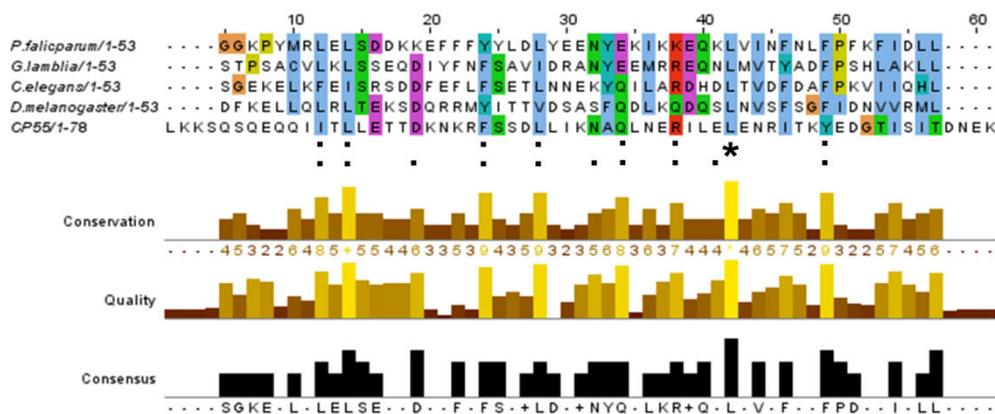


Abbildung 37: Sequenzvergleich der potentiellen CP55 PISA Domäne mit anderen Organismen. Die jeweiligen Spezies sind angegeben (linke Spalte). Die Aminosäure (AS) Glycin (G) ist in orange, Prolin (P) in gold und kleine hydrophobe AS (A, V, L, I, M, F, W) in blau gezeigt. Hydroxyl-oder Aminogruppen enthaltene AS (S, T, N, Q) sind in grün, negativ geladene AS (D, E) in magenta, positiv geladene AS (R, K) in rot, Histidin (H) und Tyrosin (Y) in himmelblau dargestellt. „*“ = identisch, „+“ = Konservierung in Größe und der hydrophilen/hydrophoben Eigenschaften, „-“ = Konservierung in Größe oder der hydrophilen/hydrophoben Eigenschaften.

der Prophase besitzt. Zusammengenommen gibt es zwischen CP55 und SAS-6 einige strukturelle und funktionelle Gemeinsamkeiten. Das mögliche Vorhandensein eines SAS-6-ähnlichen Proteins in Dictyostelium erscheint zunächst etwas überraschend, da SAS-6 an der Bildung der Centriolen beteiligt ist und eine solche Struktur in dieser Form in Dictyostelium bisher nicht bekannt ist. Die Tochtercentriolen besitzen eine Cartwheel-Struktur (siehe Schema Abbildung 38 B). Diese bestehen aus einem zentralen „Hub“ (mit SAS-6) von dem Speichen (z.B. Cep135) ausstrahlen, die durch eine Stecknadelkopf-ähnliche Struktur („Pinhead“) abgeschlossen sind (SAS-4, γ -Tubulin u.a.) [25].

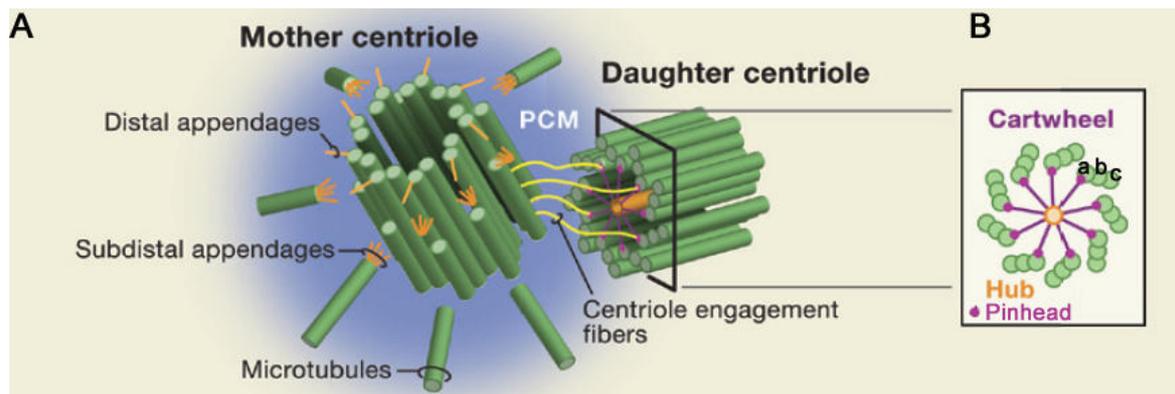


Abbildung 38: Aufbau der Centriolen. (A) Mutter- und Tochtercentriole, die Mikrotubuli sind in grün und die PCM in blau dargestellt. (B) zeigt schematisch den Aufbau der Cartwheel-Struktur. Mit a, b, c sind die Mikrotubuli des Triplets gekennzeichnet. Geändert nach Bettencourt-Dias und Glover 2009 [25].

Das im „Pinhead“ lokalisierte Protein SAS-4 interagiert dort mit γ -Tubulin-Ringkomplexen, welche die Centriol-Mikrotubuli nukleieren [27]. Die Core-Region in Dictyostelium, die keine Mikrotubuli besitzt, wird als das funktionelle Äquivalent zu den Centriolen angesehen, während die Corona mit ihren γ -Tubulin enthaltenden Mikrotubuli-Nukleationskomplexen als Äquivalent der PCM gesehen wird [33]. Die Core-Region könnte aber auch nur das Äquivalent zum zentralen „Hub“ mit seinen Speichen und „Pinheads“ in den Centriolen sein. In diesem Falle wäre die Corona ein Äquivalent der γ -Tubulin-Komplexe, die für das Assembly der Centriolmikrotubuli an der „Pinhead“-Struktur verantwortlich sind, und würde zugleich in einer erweiterten Funktion die Rolle der PCM übernehmen. In diesem Modell wäre die Corona also eher das Äquivalent der Nukleationskomplexe der Centriolmikrotubuli, als das der PCM. CP55 könnte somit das erste identifizierte Homologe eines SAS-Proteins in einem Organismus mit acentriolären Centrosom sein. Da Dictyostelium ebenfalls ein Cep192/SPD-2 Ortholog exprimiert, könnten weitere bisher noch nicht identifizierte Homologe zu anderen Proteinen der Centriolbiogenese existieren wie z.B. SAS-5, ZYG-1 oder SAS-4. In der Fortsetzung dieses Projektes wird über verschiedene Methoden wie z.B. pull-down-Experimenten versucht mögliche Interaktionspartner zu isolieren.

3.3 Schlussfolgerungen

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass CP55 und CP148 zwei außerordentlich wichtige Proteine des Dictyostelium Centrosoms sind. CP148 ist das erste charakterisierte Corona-Protein, das nicht an der Mikrotubuli-Nukleation beteiligt ist. Es ist Zellzyklus-reguliert und essentiell für den Aufbau der Corona. CP148 dient dabei als Gerüstprotein und Organisator für alle anderen

bisher bekannten Corona-Komponenten. In diesem Zusammenhang konnte erstmals den astralen Mikrotubuli eine wichtige Rolle beim Transport der Coronaproteine zugesprochen werden. Neben seiner Funktion als Gerüstprotein ist CP148 verantwortlich für den radialen Aufbau des Interphase-Mikrotubuli-Arrangements, während es in der Mitose keinen Einfluss auf die Mikrotubuli-Spindel besitzt. Somit wurde mit dieser Arbeit erstmalig gezeigt, dass die Rekrutierung von Mikrotubuli-Nukleationskomplexen zum mitotischen- und Interphase-Centrosom auf verschiedenen Wegen erfolgt. Darüber hinaus wird CP148 für die Centrosomen-Kern-Centromer-Verbindung benötigt. Dieses Ergebnis zeigt, dass diese Verbindung über eine Interaktion von Corona-Proteinen und nicht, wie bisher angenommen, durch Proteine der Core-Region erfolgt. CP55, als Protein der Core-Region, ist über den gesamten Zellzyklus am Centrosom lokalisiert. Eine Überexpression des Proteins resultierte in überzähligen Centrosomen, die alle untersuchten centrosomalen Proteine enthielten. Es besitzt eine stabilisierende und ordnende Funktion bezüglich der Corona. Zudem reguliert CP55 den Zeitpunkt der Corona-Neubildung in der Telophase über eine funktionelle Interaktion mit CP148. Überraschenderweise besitzt das centrosomale CP55 auch einen Einfluss auf die Ernährung der Zellen durch Phagozytose, indem es an der Reassemblierung der dispergierten Golgi-Vesikel nach der Mitose beteiligt ist. Eine weitere wichtige Rolle spielt CP55 bei der Centrosomenverdopplung und damit verbunden bei der Erhaltung der Ploidie. Mit seinen Eigenschaften könnte CP55 das erste SAS-6-ähnliche Protein in einem Organismus mit acentriolären Centrosom darstellen.

4. Material und Methoden

4.1 Reagenzien, Antikörper und andere Materialien

4.1.1 Chemikalien, Reagenzien, Antibiotika

Alle Standard Chemikalien und Reagenzien wurden von AppliChem GmbH (Darmstadt), Biomol (Hamburg), Roth (Karlsruhe) und Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) mit dem Reinheitsgrad *zur Analyse* bezogen. Alle Antibiotika wurden von Roth (Karlsruhe) verwendet, außer Penicillin/Streptomycin von PAA GmbH (Pasching, Österreich). Die Herstellung der verschiedenen Lösungen erfolgte stets mit destilliertem Wasser.

4.1.2 Antikörper

Primäre Antikörper

Anti-actin, mAb, 264-236-1	[101]
Anti-GFP, Kaninchen Antiserum	[102]
Anti-GFP, mAb 264-236-1	Chemicon (Billerica, MA, USA)
Anti-Cenp68, Kaninchen Antiserum, aufgereinigt	[43]
Anti-CP39, Kaninchen Antiserum, aufgereinigt	Meyer, nicht veröffentlicht
Anti-CP55, Kaninchen Antiserum, aufgereinigt	diese Arbeit
Anti-CP91, Kaninchen Antiserum, aufgereinigt	Putzler, nicht veröffentlicht
Anti-CP148, Kaninchen Antiserum, aufgereinigt	diese Arbeit
Anti-CP224, mAb, 2/165	[69]
Anti-CP224, DdCP224Hind, Kaninchen Antiserum	[103]
Anti- γ -tubulin, Kaninchen Antiserum	[36]
Anti-NE81, Kaninchen Antiserum	[44]
Anti-SUN, Kaninchen Antiserum	[43]
Anti-TACC, Kaninchen Antiserum	[22]
Anti-tubulin, mAb YL1/2	Chemicon (Billerica, MA, USA)

Sekundäre Antikörper:

Ziege anti-Maus Alexa Fluor 488 and 568	Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
Ziege anti-Kaninchen Alexa Fluor 488 and 568	Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
Ziege anti-Ratte Alexa Fluor 488 and 568	Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
Ziege anti-Maus alkalische Phosphatase Konjugat	Sigma (St. Louis, MO, USA)
Ziege anti-Kaninchen alkalische Phosphatase Konjugat	Sigma (St. Louis, MO, USA)

Ziege anti-Maus Meerrettich Peroxidase Konjugat Dianova (Hamburg)

Ziege anti-Kaninchen Meerrettisch Peroxidase Konjugat Dianova (Hamburg)

4.1.3 Enzyme / Polymerasen

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

weitere Materialien

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

4.1.4 Allgemeine Puffer und Lösungen

Spezielle Puffer werden in der zugehörigen Methode beschrieben.

6x Laemmli Probenpuffer für SDS-PAGE

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

6x TAE (Ladepuffer für Gelelektrophorese)

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

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 Trypsin Inhibitor; 50 µg/ml Aprotinin; 50 µg/ml Pepstatin;
100 mM Benzamidine

Harnstoff Probenpuffer für SDS-PAGE (LöA)

10 % SDS; 9 M Urea; 5 % 2-mercaptoethanol

Mowiol (Einbettmedium für Immunfluoreszenz)

120 mg/ml Polyvinyl Alkohol 4-88; 30 % Glycerin; 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

Phosphate Puffer / Soerensen Puffer [104]

14,6 mM KH₂PO₄; 2 mM Na₂PO₄; pH 6,0

SDS Laufpuffer

100 mM Tris/HCl; pH 8,3; 0,1 % SDS; 100 mM Glycin

TAE Laufpuffer (für die Gelelektrophorese)

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

TBS

20 mM Tris/HCl; 150 mM NaCl; pH 7,4

TBST

20 mM Tris/HCl; 150 mM NaCl; 0,05 % Tween-20; pH 7,4

TE buffer

10 mM Tris; 1 mM EDTA; pH 8,0

4.1.5 Verwendete Plasmide

p1ABsr8	[71]
Cherry-histone 2B	[22]
pLPBLP	[64]
pIS76	[41]
pIS77	[41]
pIS296	diese Arbeit
pIS297	[41]

pIS235	[41]
pIS298	diese Arbeit
pMALc2	New England Biolabs (Ipswich, MA, USA)

4.1.6 Verwendete Software und Online Programme zu *in silico* Analyse

Adobe Photoshop CS5 Extended v12.0 x64, ApE plasmid editor v.1.10.4, Biorad Quantity One 4.0.3, Carl Zeiss Axiovision 4.8, Endnote X3 Bld 4094, MacBiophotonics ImageJ v.1.42l, Microsoft Office 2007, Varian Cary Win UV simple reads 2.0.

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

4.2 Biologische Stämme

4.2.1 Bakterien Stämme:

Escherichia coli TOP10 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) und DH5 α wurden für Klonierungen, *Escherichia coli* KS1000 und Rosetta (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) für die bakterielle Proteinexpression verwendet. *Klebsiella aerogenes* [105] wurde zur Kultivierung von Dictyostelium genutzt.

4.2.2 Dictyostelium Stämme

Der *D. discoideum* Stamm AX2-214, ein axenisch wachsendes Derivat des Isolats NC-1 [106] wurde in dieser Studie als „Wildtyp-Stamm“ (AX2) verwendet. Alle in dieser Studie generierten Mutanten basieren auf AX2-Zellen. Des Weiteren erfolgte die Verwendung bereits vorhandener Dictyostelium-Stämme, die nicht in dieser Arbeit erzeugt wurden:

GFP- α -tubulin	[35]
GFP-CP55	[41]
GFP-CP148	[41]
TACC-GFP	[22]

4.3 Molekularbiologische Methoden

4.3.1 Verwendete Oligonukleotide

Alle in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden von biomers.net GmbH (Ulm) bezogen.

Tabelle 1: Ausgewählte Oligonukleotide die während dieser Arbeit verwendet wurden

Interne Nummer und Name (forward / reverse)	Sequenz in 5'→3' Richtung
#1 CP148-KO-PstI-for	AAAAC TGCAGATAGTGGTAATAGTGGTGT TAGTGG
#2 CP148-KO-SalI-for	ACGCGTCGACATTGGGAAGTGCTGGTAGGTATTG
#3 CP148-KO-HindIII-rev	TTAAAGCTTTGTTTTTATTTTATTTTATTTTAAAT
#4 CP148-KO-test-rev	ACCATGTGTGGACTTTTTTCAAACCAATC
#19 CP148-Cterm-SalI-for	GGCGTCGACAATAGTGGTAATAGTGGTGT TAG
#25 Bsr for	CTCAT TCCACTCAAATATACCCGAAATTA
#26 Bsr rev	CAGTTACTCGTCCTATATACG
#27 CP55-1Sal (f)	GATACGCGTCGACTAATGAATAATATAAATAATGAT
#28 CP55-2Bam (r)	GAGGGATCCTTATTGAAATGAACAATTTGATGG
#29 SW4-1SalI (f)	GATACGCGTCGACTAATGTTACCGAATAATAGTCCATTTTC
#30 SW4-2BamHI (r)	CTCGGATCCTTATAAACCTCGGTCTCTTTTTTC
#31 CP55-test-ko-rev	GAGTAACAAGAGAAATACCATTACCCTATC
#34 CP148RNAi AflIIIfor (f)	TAAATTCTTAAGCAATGTTACCGAATAATAGTCC
#35 CP148RNAi KpnIrev (r)	GCAATGGTACCTTATTAATAATTTAAATTATTGTATTACTAC
cp55-ko5UTRSalI	ATGTTGGTTCGACCAAATGTTAATGGTCTCTCC
cp55-ko5UTRrev-HindIII	TTAAAGCTTGACGCTCGATAAAAACATTG
cp55-ko-PstI	CAACTGCAGCCACACAACGTGAACAATC
sgGFP 605	ACCTGTCCACACAATCTGCC
myc-rev	CTTCTTCTGATAATAATTTTTGTTC

4.3.2 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die Amplifizierung von präparativen DNA Fragmenten aus gDNA, cDNA oder von Plasmid DNA für Klonierungen wurde stets mit der PhusionTM High-Fidelity DNA Polymerase (Finnzymes, Espoo, Finnland) und den mitgelieferten Puffern „HF“ sowie „GC“ durchgeführt. Für eine 50 µl Reaktion wurden laut Protokoll 0,5 µl (1,0 U) Enzym, 5 µl dNTPs (0,2 mM jedes) und 5 µl (50 mM) von jedem Primer eingesetzt. Die Menge an Template DNA variierte je nach Art der DNA. Bei Plasmid DNA wurden 10 ng pro 50 µl Ansatz und bei gDNA bzw. cDNA wurden 50-250 ng pro 50 µl Ansatz eingesetzt. Die genauen Zeiten für Denaturierung, Annealing und Elongation wurden entsprechend dem

mitgelieferten Protokoll von Finnzymes angepasst. Die Berechnung der Primer-Annealingtemperatur erfolgte mittels http://www.finnzymes.fi/tm_determination.html sowie dem Plasmid Programm APE. Bei Reaktionen zur Amplifizierung von CP148 Fragmenten wurde stets eine Elongationstemperatur von 68 °C verwendet und die Zeit entsprechend um +15 Sekunden pro kb angepasst. Des Weiteren erfolgte nach Bedarf eine Erhöhung der MgCl₂ Konzentration in 0,2 mM Schritten pro 50 µl Reaktion um ein sauberes Signal zu erhalten. Für analytische PCR Reaktionen wurde die Taq-Polymerase verwendet. Ein typischer 25 µl Ansatz enthielt 2,5 µl dNTPs (2 mM von jedem), 2,5 µl Primer (25 mM), 1 µl Taq Polymerase (1 U) und 2,5 µl vom 10-fach PCR Puffer. Der initiale Denaturierungsschritt erfolgte bei 95 °C für 2 bis 5 min (abhängig von DNA Typ), gefolgt von 33 Zyklen von Denaturierung (95 °C für 30 s), Annealing (48 °C bis 58 °C für 30 s) und der Elongation (68 °C bis 72 °C für 60 s bis 180 s). Die Zeit für den finalen Elongationsschritt betrug 5 bis 10 min bei 68 °C bis 72 °C. Alle Reaktionen wurden zum Erreichen des jeweiligen Reaktionsvolumens mit H₂O aufgefüllt.

10-fach PCR Puffer für Taq-Polymerase Reaktionen

100 mM Tris/HCl, pH 8,3; 500 mM KCl; 15 mM MgCl₂; 0,1 % Gelatine

4.3.3 RNA Präparation aus Dictyostelium-Zellen

In dieser Arbeit wurde die Präparation von RNA ausschließlich zu Herstellung von cDNA benötigt. Polyadenylierte RNA, die als Matrize für die RT-PCR-Reaktionen diente, wurde gemäß den Anweisungen des Herstellers unter Verwendung des RNA Isolation Spin-Kit (Appllichem, Darmstadt) isoliert. Die isolierte Gesamt-RNA wurde in DEPC-behandeltem H₂O eluiert und entweder sofort für die RT-PCR-Reaktion verwendet oder aufbewahrt. Für die Lagerung der isolierten RNA wurden 1/10 Volumen vom 2 M Kaliumacetat pH 5,5 und 2,33 Volumina 100% Ethanol hinzugegeben. Das RNA-Präzipitat wurde durch Zentrifugation bei 14000 rpm für 15 min (Hettich Universal 32R, Rotor 1653) pelletiert und bei -70 °C eingefroren.

4.3.4 Reverse-Transkriptions-PCR (RT-PCR)

Um aus einer isolierten RNA eine für PCR verwendbare cDNA zu gewinnen wurde die Methode der reversen Transkriptions-PCR verwendet. Unter der Verwendung von Oligo-dT-Primern erfolgte die RT-PCR-Reaktion an Gesamt-RNA um unspezifische cDNA, die anschließend als Matrize für PCR-Reaktionen diente, zu isolieren. Dazu wurde das ProtoScript® First Strand cDNA Synthesis Kit (NEB, Ipswich, MA, USA) nach

Anweisungen des Herstellers verwendet. Die Reaktion erfolgte in einem Eppendorf Thermomixer comfort (Eppendorf, Hamburg) unter Verwendung von 1 µg Gesamt-RNA. Für die darauffolgenden PCR-Reaktionen zur Amplifizierung von spezifischen Gen-Sequenzen wurden 2 µl cDNA Lösung eingesetzt.

4.3.5 Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA Fragmenten

Die DNA-Fragmente wurden mittels 1 %-iger Agarose Gele in TAE-Laufpuffer ihrer Größe nach aufgetrennt. Die dafür verwendeten Gele hatten die Abmessungen 6 cm x 9,5 cm und 10 cm x 15 cm (BioRad „Wide-Mini Systems“). Vor der Beladung wurden die DNA-Proben mit 6 x TAE Ladepuffer versetzt. Anschließend wurde das Gel je nach Taschengöße mit einem Probenvolumen von 5 µl bis 50 µl beladen. Für eine Abschätzung der Größen, wurden 5 µl vom 1 kb Standard (GeneRuler™, 1 kb DNA Ladder, Fementas) aufgetragen. Durch das Anlegen einer Spannung von 5 V/cm wurden die DNA-Proben ihrer Größe nach aufgetrennt. Um das Trennungsmuster sichtbar zu machen wurden die Gele im Anschluss in 1 µg/ml Ethidiumbromid in TAE Laufpuffer für 30 min gefärbt. Die so angefärbten DNA-Banden wurden mit dem Gel Doc 2000-System (BioRad, Hercules, CA) mit UV-Beleuchtung sichtbar gemacht und dokumentiert.

4.3.6 Aufreinigung von PCR Produkten, DNA-Fragmenten nach Restriktionsverdau sowie die Gelextraktion von DNA aus Agarosegelen

PCR Produkte, DNA Fragmente und DNA aus Agarosegelen wurden mit dem Nucleospin Extract II-Kits (Macherey & Nagel, Düren) gemäß den Anweisungen des Herstellers aufgereinigt. Bei der Gelextraktion von DNA Banden wurden die Agarosegele vorher mit einem ECX-20-M UV-Strahler beleuchtet (Peqlab, Erlangen) und die entsprechende Bande mit einer sauberen Rasierklinge herausgeschnitten.

Eine weitere Methode zur Aufreinigung von PCR-Fragmenten und Restriktionsverdau bis 200 µl Probenvolumen ist die Verwendung von Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (zur besseren Entfernung von DNA modifizierenden Enzymen). 200 µl Probe wurde mit 100 µl Phenol und 100 µl einer Mischung von Chloroform/Isoamylalkohol versetzt. Nach der Vermischung der Probe durch Vortexen erfolgte eine 1-minütige Zentrifugation bei voller Geschwindigkeit mit der Tischzentrifuge (BioRad). Der Überstand wurde abgenommen und verworfen. Zur Probe wurden nun erneut 200 µl Chloroform/Isoamylalkohol hinzugegeben, vermischt (Vortex) und bei voller Geschwindigkeit zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 1/10 Volumen 3 M Ammoniumacetat oder NaAcetat versetzt sowie das 2,5-fache Volumen 100% Ethanol hinzugegeben. Nach gründlichem

vermischen (Vortex) wurde die Probe 30 Minuten bei -20°C inkubiert, anschließend bei voller Geschwindigkeit (Tischzentrifuge) zentrifugiert und das Pellet mit 70 % Ethanol gewaschen. Das getrocknete Pellet wurde in H_2O unter Schütteln bei 50°C resuspendiert.

4.3.7 DNA-Verdau durch Restriktionsendonukleasen

Für alle Verdau wurden die FastDigest[®] Enzyme von Fermentas (Vilnius, Litauen) verwendet. Die Mengenzugabe an Enzymen, Temperatur, Puffer und zusätzlichen Reagenzien die für einen Ansatz benötigt wurden, erfolgte immer laut Protokoll des Herstellers. Die Zeit pro Verdau Reaktion variierte je nach Ansatz von 15 min bis 12 h. PCR Produkte wurden in der Regel über Nacht verdaut. Die erhaltenen Proben wurden mittels Nucleospin Extract II-Kit (Macherey & Nagel, Düren) aufgereinigt und in einer Gelelektrophorese auf ihre Richtigkeit überprüft.

4.3.8 Dephosphorylierung von DNA-Enden

Um eine ungewollte Religation von Plasmiden zu verhindern wurden diese im Anschluss an den Restriktionsverdau dephosphoryliert. Dafür wurde die Antarctic Phosphatase (NEB, Ipswich, MA, USA) verwendet und wie vom Hersteller angegeben eingesetzt. Als Alternative zur separaten Reaktion erfolgte die Dephosphorylierung bei geeigneten Proben gleichzeitig mit dem Restriktionsverdau. Dabei wurden $1\ \mu\text{l}$ Antarctic Phosphatase in der letzten Stunde des Restriktionsverdaus hinzugefügt. Anschließend erfolgte eine Inaktivierung der Phosphatase bei 65°C für 15 min sowie die anschließende Aufreinigung mittels Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol.

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

Gereinigte DNA-Fragmente und Vektoren wurden in einer Restriktionsreaktion (4.3.7) mit den entsprechenden Enzymen geschnitten um $5'$ überhängende klebrige Enden zu erhalten. Die Produkte wurden mittels geeigneter Methoden aufgereinigt (4.3.6), ggf. dephosphoryliert (4.3.8) und überprüft (4.3.5). In einem Standard Ligationsansatz wurde 3 bis 5-mal so viel Insert wie Plasmid verwendet (molar gesehen), was vorher auf einem Agarosegel beim Vergleich der Plasmid-Insert Konzentrationen abgeschätzt wurde. Die ATP-abhängige Katalyse der Ligation mittels T4-DNA Ligase (NEB, Ipswich, MA, USA) erfolgte in einem Reaktionsansatz nach Herstellerangaben und einer Inkubation über Nacht bei 16°C oder bei Raumtemperatur (RT) für 2 h. Anschließend wurden zum Ligationsansatz $100\ \mu\text{l}$ bis $200\ \mu\text{l}$ kompetente Zellen (*E. coli*) hinzugegeben und für 30 min auf Eis inkubiert. Es folgten ein Hitzeschock von 90 s bei 42°C und eine erneute Inkubation für 5 min auf Eis. Der Ansatz wurde auf LB^{amp} -Platten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

4.3.10 Mini-Plasmid Präparation aus *E. coli* Zellen

Die erhaltenen Klone nach der Transformation des Ligationsansatzes wurden mit einem Zahnstocher gepickt und damit ein 2 ml Reaktionsgefäß beimpft. Nach 12-stündiger Inkubation wurden die Zellen geerntet (2 min, maximale Geschwindigkeit Tischzentrifuge). Der Überstand wird verworfen und das Pellet in 200 µl Lösung I resuspendiert. Nach Zugabe von 200 µl Lösung II und vorsichtigem Invertieren wurden die Proben für 5 min bei RT inkubiert, um die Zellen zu lysieren. Nach Zugabe von 200 µl Lösung III wird der Ansatz für 5 min auf Eis inkubiert, wodurch Proteine und auch genomische Bakterien-DNA ausgefällt werden. Die Proben wurden anschließend bei maximaler Geschwindigkeit für 10 min zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß, mit bereits 350 µl vorgelegtem Isopropanol (entspricht 0,7 Vol. %), überführt. Nach einem gründlichem Mischen (Vortex) wurde die ausgefällte DNA bei maximaler Geschwindigkeit (Tischzentrifuge) pelletiert und anschließend mit 70 %-igem Ethanol gewaschen. Die Trocknung des DNA-Pellets erfolgte bei 50 °C. Anschließend wurde die Plasmid DNA in 50 µl H₂O oder TE-Puffer resuspendiert. Lösung I bis III wurden nach den Angaben analog der Lösungen im Nucleobond PC 100 Kit (Macherey und Nagel, Düren) hergestellt.

4.3.11 Midi-Plasmid Präparation aus *E. coli*

Für Midi-Plasmid Präparationen wurde das Nucleobond PC 100 Kit (Macherey und Nagel, Düren) verwendet.

4.3.12 Bestimmung der DNA Konzentration

Die zu bestimmenden Proben wurden 1:200 in Wasser verdünnt und einer Wellenlänge von 260 nm in einem Cary 50-Spektrometer (Varian) gemessen. Eine OD₂₆₀ = 0,1 entsprach einem DNA Gehalt von 1 µg/µl.

4.3.13 Präparation genomischer DNA aus *Dictyostelium*

Für die Präparation von genomischer DNA wurde das Kit NucleoSpin[®] Tissue von Macherey-Nagel laut Herstellerangaben verwendet. Als Abänderung zum Herstellerprotokoll erfolgte die Elution der DNA in 50-70 µl Elutionspuffer.

4.3.14 Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*

Eine einzelne Kolonie einer Übernachtskultur von TOP10-Zellen auf LB-Platten wurde in 5 ml ψb-Medium überführt und bis zu einer OD₆₀₀ = 0,3 bei 37 ° C inkubiert. Mit dieser Vorkultur wird anschließend ein mit 100 ml vorgewärmten ψb-Medium gefüllter Kolben beimpft. Die Zellen werden bei 37 °C geschüttelt bis eine OD₆₀₀ = 0,5 erreicht ist. Nach einer Inkubation

von 5 min auf Eis werden die Zellen geerntet und in eiskaltem TfbI Puffer resuspendiert, erneut 5 min auf Eis inkubiert und abzentrifugiert. Die Zellen werden in 4 ml Puffer TfbII gelöst, für 15 min auf Eis gehalten und in flüssigem Stickstoff (200 µl Aliquots) eingefroren.

Ψb-Medium

20 g/l Tryptone; 5 g/l Hefeextrakt; 5 g/l MgSO₄ (wasserfrei); pH auf 7,6 mit KOH einstellen

TfbI

30 mM Kaliumacetat; 100 mM Rubidiumchlorid (RbCl); 10 mM CaCl₂; 15 % Glycerin; pH auf 6,0 mit 0,2 M Essigsäure einstellen, 50 mM von MnCl₂ hinzugeben und pH auf 5,8 einstellen

TfbII

10 mM MOPS; 75 mM CaCl₂; 10 mM Rubidiumchlorid (RbCl); 15 % Glycerin; pH auf 6,5 mit KOH einstellen

4.3.15 Retransformation eines Plasmids in *E. coli*

Für eine erneute Transformation kompetenter Bakterien mit einem bereits vorliegenden, aufgereinigtem Plasmid werden von diesem 0,5 µg zu 40 µl kompetenten *E. coli* Zellen gegeben und für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wird die Suspension auf LB^{Amp} Platten ausplattiert und bei 37 °C über Nacht inkubiert.

4.3.16 Transformation von DNA in *Dictyostelium* (Elektroporation)

Alle hier aufgeführten Schritte werden, soweit nicht anders angegeben, mit eiskaltem Puffer und auf Eis durchgeführt. Pro Transformation werden 3-5 x 10⁷ Dictyostelium-Zellen, die eine maximale Dichte von 5 x 10⁶ Z/ml während der Kultivierung nicht überschritten haben, aus Schüttel- oder adhärenter-Kultur geerntet und zweimal mit Phosphatpuffer (je 10 ml Volumen) gewaschen. Nach einem weiteren Waschschrift mit Elektroporations-Puffer (EP) werden die Zellen in 700 µl EP resuspendiert. Zu dieser Suspension wird 15 µg bis 30 µg DNA hinzugegeben, vermischt und in eine sterile Elektroporationsküvette (4 mm Abstand zwischen den Elektroden, Peqlab, Erlangen) überführt. Nach einer 5-minütigen Inkubation auf Eis erfolgt die Elektroporation mit zwei Impulsen bei 1,1 kV, 3 µF in einer Gene Pulser Elektroporationsapparatur (Biorad, Hercules, CA, USA). Nach der Elektroporation wird die Suspension bei RT für 10 min belassen. Anschließend werden die Zellen in ein steriles 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, in dem bereits jeweils 1 mM MgCl₂ und CaCl₂ (Endkonzentration)

vorgelegt ist. Das Gemisch wird vorsichtig auf einem Rotator für weitere 15 min bei RT gerührt. Wenn die verwendete Resistenz Blastocidin S ist, wird die Zellsuspension in 25 ml HL5c Medium gegeben und auf eine 24 well Platte aufgeteilt. Um eine Kontamination mit Bakterien zu verhindern, wird dem Medium Penicillin/Streptomycin (P/S) hinzugegeben. Nach 24 h Erholungszeit erfolgt der Selektionsdruck auf die Plasmidinsertion mit 4 µg/ml Blastocidin S (Endkonzentration) in HL5c. Nach ungefähr 1 bis 2 Wochen können die Wachsenden Klone aus den Wells für weitere Untersuchungen bzw. Subklonierungen entnommen werden. Wenn G418 zur Selektion verwendet wird, werden die Zellen nach der 15-minütigen Inkubation in eine 50 ml Zellkulturflasche mit 25 ml HL5c mit P/S gegeben und 24 h bei 22 °C inkubiert. Am darauffolgenden Tag wird die Kultur geerntet, 1-mal mit Phosphatpuffer gewaschen und in einer Lösung (2,5 ml) von *Klebsiella aerogenes* (KA) mit 10 µg/ml G418 und P/S resuspendiert. Die dafür benötigten Bakterien werden frisch geerntet. Deshalb muss am ersten Tag der Transformation KA auf SM-Agar-Platten ausgestrichen und bei 37 °C über Nacht bebrütet werden. Eine SM-Platte die dicht mit KA bewachsen ist, ergibt 5 ml Suspension. 500 µl der Dictyostelium-KA-Suspension wird auf frisch hergestellten Phosphat-Agarplatten mit 100 pg/ml G418 ausplattiert. Nach ungefähr 2 Wochen können Plaques resistenter Zellen gepickt werden. Es handelt sich dabei jeweils um Einzelklone.

4.3.17 Herstellung der in dieser Arbeit verwendeten Plasmide und Dictyostelium Stämme

Bei Amplifizierung von DNA Fragmenten zur Herstellung der verschiedenen Plasmide / Konstrukte wurde entweder cDNA, gDNA oder auch Plasmid-DNA als Template verwendet. Die PCR-Produkte wurden wie beschrieben (4.3.6) gereinigt, mit Restriktionsendonukleasen geschnitten, wiederum gereinigt und in den jeweiligen Plasmid ligiert. Die so entstandenen Plasmide wurden durch Sequenzierung (GATC Biotech, Konstanz) auf mögliche Fehler überprüft und ggf. neu generiert. Die verwendeten Primer und Ausgangsvektoren für diese Arbeit sind in Abschnitt 4.1.5 und 4.3.1 angegeben. Für die N-terminale Fusion von GFP wurden die Ausgangsvektoren pIS76 oder pIS77 [41] verwendet. Die dafür generierten PCR Produkte waren, wenn nicht anders angegeben, immer mit SalI- und BamHI-Restriktionsstellen flankiert. Für eine Insertion des Konstrukts wurde das entsprechende Zielplasmid sowie auch das PCR Produkt mit SalI und BamHI verdaut. Das Plasmid wurde zusätzlich noch dephosphoryliert um eine Religation zu verhindern.

Herstellung eines MBP-CP148 Fusionsproteins als Antigen zu Herstellung eines polyklonalen Antikörpers

Dafür wurde ein C-terminales CP148 DNA Fragment ausgewählt, das die AS 940 bis AS 1297 kodiert und damit eine Länge von 1074 bp besitzt. Flankiert wurde das Fragment von SalI und BamHI. Das mit dem #19 (SalI forward) und #30 (BamHI reverse) amplifizierte PCR Fragment wurde in das ebenfalls mit SalI/BamHI geschnittene Zielplasmid pMALc2 (NEB, Frankfurt, Germany) ligiert. Das MBP-CP148 Konstrukt (pOK20) wurde anschließend in einem Bakterienstamm (*E. coli* Rosetta und KS1000) exprimiert und 1 mg des Protein zur Immunisierung an PAB Productions, Herbertshausen und preclinics, Potsdam gesendet. Das daraus erhaltene Antiserum wurde wie in 4.4.11 beschrieben aufgereinigt.

Herstellung einen CP148 Knockout Plasmids und Dictyostelium Stamms

Die Erzeugung eines CP148 Knockout Stamms wurde durch den teilweisen Ersatz des chromosomalen CP148 Wildtyp Genlocus durch ein homologes Rekombinationsereignis mit Blasticidin-Resistenz-Kassette erreicht. Das CP148 Knockout Konstrukt wurde unter Verwendung des pLPBLP Vektor [64] generiert. Beide komplementären Sequenzen, welche die BSR Kassette von beiden Seiten flankieren, wurden mittels PCR auf genomischer Dictyostelium-DNA als Matrize durch die Verwendung geeigneter Linker-Primer erhalten. Des 5'-Fragment aus der CP148 5'UTR mit einer Länge von 1050 bp wurde in den pLPBLP über SalI und HindIII -Restriktionsstellen stromaufwärts der Blasticidin-Resistenz-Kassette ligiert. Anschließend wurden die letzten 1073 bp der kodierenden Sequenz von CP148 stromabwärts der Blasticidin-Resistenz-Kassette über PstI/BamHI-Restriktionsstellen eingefügt (pOK11). Das Knockout-Konstrukt (30 µg) wurde in einem 200 µl Ansatz mit PvuII verdaut und vor der Transformation in Dictyostelium AX2 Zellen gereinigt. Um die korrekte Insertion zu überprüfen wurden PCR screens mit geeigneten Primern durchgeführt. Es konnte, wie in den Ergebnissen beschrieben, kein CP148 k/o Stamm isoliert werden.

Herstellung einen CP55 Knockout Plasmids und Dictyostelium Stamms

Die Generierung des CP55 k/o-Plasmids erfolgte Analog zur Herstellung des CP148 k/o-Plasmids. Das 5'-SalI/HindIII-Fragment aus der 5' nicht-kodierenden Sequenz beginnt aus an der Basen-Position -240 der 5' UTR (597 bp) und das 3'-PstI/BamHI-Fragment, welches 671 bp der kodierenden Sequenz umfasst, endet an Basenposition 2414 der genomischen Sequenz. Das resultierende Knockout-Plasmid (pIS296) wurde mit PvuII vor der Transformation von Dictyostelium-Zellen verdaut.

Herstellung eines CP148 RNAi Konstrukts und Dictyostelium Stamms

Das CP148 RNAi Plasmid wurde exakt nach der beschriebenen Methode von Samereier *et al.* [22] generiert. Dazu wurden zum Einen mit Sali/BamHI Linker Primern ein Fragment von 440 bp (beginnend im kodierenden Bereich von CP148 bei bp 1 bis bp 440) in sense Richtung und zum Anderen mit AflIII und KpnI Linker Primern ein 440 bp langes Antisense Konstrukt amplifiziert. Das Sense Konstrukt wurde über Sali/BamHI stromabwärts in den Polylinker des mCherry Vektors pIS193 und das Antisense Konstrukt über AflIII/KpnI in die mCherry Sequenz von pIS193 kloniert. Zwischen Sense und Antisense Konstrukt verblieb so nun eine Spacer Sequenz von 196 bp. Das Konstrukt (pOK48) wurde wie in 4.3.16 beschrieben in Dictyostelium AX2 Zellen transformiert und die potentiellen RNAi-Klone mittels Immunfluoreszenz und Western-Blot Analysen überprüft.

Transformation von Plasmiden in Dictyostelium

Die Generierung neuer Dictyostelium Stämme erfolgte nach dem Protokoll von 4.3.16 und sind in Tabelle 3 aufgelistet. Tabelle 2 zeigt ausgewählte Plasmide und Bakterienstämme, die während dieser Arbeit hergestellt wurden. Die Richtigkeit der Sequenzen wurde durch Sequenzierungen (GATC Biotech AG, Konstanz) unter Verwendung geeigneter Primer überprüft.

Tabelle 2: Plasmide und Bakterienstämme

Nr.	Name	Beschreibung	Klonierung	E.Coli	Resistenz
pOK20	pMAL-C2-CP148 Cterm	pMAL-P2 mit Cterm CP148 f. Expression;	Sal/Bam	ja	Amp
pOK26	Rosetta-Cterm CP148	pOK20 in Rosetta		Rosetta	Amp
pOK27	KS1000-Cterm CP148	pOK20 in KS1000		KS1000	Amp
pOK44	GFP-DdLimΔcoil	Markierung der Phagocytic-Cups		ja	Amp/G418
pOK45	CP55pmut in pIS76	Punktmut.KENZuREN in GFP-Bla Vector	S/B	ja	Amp/Bla
pOK46	CP148N in pIS193	RNAi CP148 Teilkonstrukt in Cherry Vector pIS193	S/B	ja	Amp/G418
pOK47	CP55pmut in pIS77	Punktmut.KENZuREN in GFP-G418 Vector	S/B	ja	Amp/G418
pOK48	CP148N in pOK46	CP148RNAi Kon-strukt in pIS193	KpnI/AflIII	ja	Amp/G418
pOK49	GFP-NdRA	NdRA Kinase von A.M. Taubenberger,		ja	Amp/G418
pOK54	pIS298 mit Pmut12	Punktmutation in EF- hand Position 12 in	BglIII/Bam	ja	Amp/G418

Tabelle 3: Auswahl an hergestellten Dictyostelium-Stämmen

Nr.	Name Plasmid	Beschreibung	Resistenz
OK1	pIS296	CP55 k/o	Bla
OK2	pIS175 in OK1	GFP-TubA in OK1	Bla/G10
OK3	pAE2	MARS-CP55 in GFP-CP148	Bla/G10
OK16	pAE3-K7	GFP-CP55 K7	G10
OK17	pAE3-K13	GFP-CP55 K13	G10
OK18	pIS296 Fragment in AX2	K2A-CP55 k/o in AX2	Bla
OK19	pIS296 in AX2	K15B-CP55ko	Bla
OK21	pOK39 in AX2	GFP CP148cΔN in pIS76	Bla
OK24	GFP-CP55 in OK19	GFP-CP55 CP55ko OK19 „RESCUE“	Bla/G10
OK28	pIS235 in AX2	GFP-CP55 in AX2	Bla
OK30	pOK44 in OK18	GFP-LimAE coil K9 in CP55 k/o	Bla/G10
OK31	pOK44 in OK18	GFP-LimAE coil K21 in CP55 k/o	Bla/G10
OK32	pOK44 in OK19	GFP-LimAE coil K17 in CP55 k/o	Bla/G10
OK33	CP148 RNAi pOK48	CP148RNAi in AX2 KI-1	G10 ?
OK34	pOK48 in AX2	CP148RNAi in AX2 KII-2	G10
OK38	pOK48 in IS13	CP148 RNAi in GFP-α-Tubulin	Bla/G10
OK46	pOK48 in GFP-Tacc Dom	CP148RNAi in GFP-Tacc-Domain	Bla/G10
OK47	pOK48 in IS155	CP148RNAi in GFP-CP55	Bla/G10
OK50	pIS272 in IS198	Cherry Histon in GFP-CP148	Bla/G10

4.4 Biochemische Methoden

4.4.1 Gewinnung von Proteinproben aus Dictyostelium-Zellen

Zur Gewinnung von cytosolischen Dictyostelium Proben wurde eine gut bewachsene Dictyostelium Kultur ($3-5 \times 10^6$ Z/ml) bei 4°C geerntet und dreimal mit kaltem Phosphatpuffer gewaschen. Beim letzten Waschschrift wurden 2 μM Cytochalasin A (Endkonzentration, Sigma-Aldrich) hinzugegeben. Die Lyse der Zellen erfolgte analog der Centrosomenpräparation mit dem 8-fachen Volumen an Lysepuffer. Um einen kernfreien Cytoplasmaüberstand zu erhalten, wurde das Lysat in einer vorgekühlten Eppendorfzentrifuge für 10 min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Zur Analyse von cytosolischen Extrakten in der SDS-PAGE wurde der Überstand entweder mit 6 x Harnstoff-Probenpuffer (LöA, Endkonzentration 1x) versetzt und für 3 min bei 70 °C inkubiert oder mit 6 x Laemmli-Probenpuffer versetzt und anschließend bei 95 °C für 5 min gekocht. Zur Gewinnung von Gesamtzellextrakten wurden Dictyostelium Zellen abzentrifugiert und das Pellet in 2 x Harnstoff Probenpuffer aufgenommen (LöA, Endkonzentration 1 x). In eine Geltasche wurden bei der SDS-PAGE ca. 5×10^5 Zellen geladen.

4.4.2 Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Amidoschwarz-Test

Für eine quantitative Abschätzung der Proteinexpression müssen in Westernblot-Analysen gleiche Proteinmengen der einzelnen Proben aufgetragen werden. Die Zentrifugation erfolgte immer mit einer Tischzentrifuge. Alle Zentrifugationsschritte wurden bei maximaler Geschwindigkeit für 5 min durchgeführt. Für jede Probe erfolgte eine 3-fache Bestimmung, um den Fehler zu verringern. Im Falle zu starker Abweichung der 3 erhaltenen Werte voneinander wurde der Test nochmals wiederholt. Die Bestimmung erfolgte mit Hilfe des Amidoschwarz-Tests. Als Referenz diente eine BSA Eichgerade. 10 mg BSA wurden in 10 ml Wasser eingewogen. Von dieser Stammlösung wurden jeweils 4 µg, 8 µg und 12µg BSA (BSA Stammlösung in Wasser oder PBS mit 1 µg/µl) in 300 µl Färbelösung gegeben (Vortex) und für 5 min bei RT inkubiert. Anschließend werden die Proben bei maximaler Geschwindigkeit für 5 min zentrifugiert, 2-mal mit 750 µl Waschlösung gewaschen und das erhaltene Pellet in 700 µl 0,1 M NaOH aufgenommen (Vortex). In einem Photometer wurde die Färbung der Lösung bei 615 nm Pharmacia Novaspec II Photometer (GE Healthcare, Uppsala, Schweden) gemessen. Die Werte für BSA bei OD₆₁₅ sollten 0,15 bei 4 µg, 0,30 bei 8 µg und 0,45 bei 12 µg BSA betragen. Für die Messung der eigentlichen Proben erfolgte analog zur Bestimmung der Eichgerade. Von den in LÖA vorliegenden Proteinproben wurden 5 µl Probe in 300 µl Färbelösung gegeben. Fortsetzung analog zu BSA Eichgeraden. Die Werte der Eichgeraden wurden anschließend in ein Diagramm übertragen, so dass die Proteinkonzentration der Proben bestimmt werden konnte.

Waschlösung: Essigsäure/MeOH im Verhältnis 1:10

Färbelösung: 5,2 mg Amidoschwarz in 20 ml Waschlösung

4.4.3 Proteinpräzipitation mit Methanol / Chloroform und Trichloressigsäure

Methanol/Chloroform Präzipitation

Diese Methode wurde hauptsächlich für verdünnte Proteinlösungen mit hohen Salzkonzentrationen, Phospholipiden und Detergenzien für die Fällung von Proteinfractionen bis 150 µl verwendet. 150 µl einer Proteinfraction wurden mit 600 µl Methanol und 150 µl Chloroform gemischt, anschließend 450 µl H₂O hinzugegeben und abermals durchgemischt (Vortex). Nach der Zentrifugation in einer Eppendorf Tischzentrifuge wurde die obere Phase verworfen und das zurückbleibende Chloroform-Kissen mit dem präzipitierten Protein mit dem 3-fachen Volumen Methanol vermischt (Vortex). Die nun ausfallende Proteinfraction wurde durch Zentrifugation bei maximaler Geschwindigkeit für 2 min bei Raumtemperatur

(RT) pelletiert, der Überstand vorsichtig abgenommen und das Pellet in einer geeigneten Menge Harnstoff Probenpuffer aufgenommen.

Präzipitation mit Trichloressigsäure (TCA)

Für größere Volumina können Proteine mit 10 % TCA gefällt werden. Die wässrige Proteinprobe wurde mit einer 100 %-igen TCA-Stammlösung (Endkonzentration 10 %) versetzt und gemischt. Nach einer anschließenden Zentrifugation bei maximaler Geschwindigkeit für 10 min in einer Eppendorf Tischzentrifuge wurde der Überstand vorsichtig abgenommen und das Pellet dreimal mit Isopropanol gewaschen. Anschließend wurde das Pellet in einer geeigneten Menge 2 x Harnstoff-Probenpuffer (LöA) resuspendiert und bei 70 °C für 3 min erwärmt.

4.4.4 Proteinauftrennung mit Hilfe von SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Mittels SDS-PAGE können Proteine anhand ihrer Masse in einem diskontinuierlichen PAA-Gel aufgetrennt werden. Die Vorbereitung der Proteinproben erfolgte entweder durch Zugabe von 1/5 Volumen 6 x Laemmli-Puffer, gefolgt von einer Inkubation bei 95 °C für 5 min, oder alternativ durch die Zugabe der gleichen Menge an LöA (Harnstoff-Probenpuffer) mit einer anschließenden Inkubation bei 70 °C für 120 Sekunden. Das aufgetragene Probenvolumen war abhängig von der Probe und dem Volumen der Tasche im SDS-Gel. Es wurden immer 5 µl vom Molekulargewicht Standard (PageRuler™ Prestained Protein Ladder, Fermentas) aufgetragen. Die Auftrennung der Proteine erfolgte mit dem Biorad-Mini-System (Biorad, Hercules, CA, USA) unter der Verwendung von diskontinuierlichen Gelen mit 6 % bzw. 12,5 % Polyacrylamid (siehe Tabelle 4). Dafür wurde in den ersten 30 min eine konstante Stromstärke von 15 mA angelegt, so dass sich die Proben in einer Laufebene im Sammelgel anreichern konnten. Anschließend wurde die Stromstärke auf konstante 30 mA erhöht, bis die gewünschte Probenauftrennung erreicht war.

Trenngel Puffer

2 M Tris/HCl, pH 8,7; 0,4 % SDS

Sammelgel Puffer

0,25 M Tris/HCl, pH 6,8; 0,4 % SDS

Tabelle 4: Rezept zur Herstellung zweier Gele für die SDS-PAGE

Stammlösungen	12,5 % Sammelgel	12,5 % Trenngel	6 % Sammelgel	6 % Trenngel
30 % Acrylamide	930	3700 µl	-	-
30 % Acrylamide/ 0,8 % PDA	-	-	660 µl	2000 µl
1 % Bisacrylamid	930 µl	930 µl	-	-
Trenngel Puffer	-	2500 µl	-	2500 µl
Sammelgel Puffer	1000 µl	-	1000 µl	-
H ₂ O	1777 µl	1800 µl	2400 µl	5500 ml
10 % APS	35 µl	45 µl	30 µl	50 µl
Temed	7 µl	9 µl	5 µl	5 µl

4.4.5 Coomassie R250 Färbung von SDS-Gelen

Bei diesen Gelen wurde ein unmarkierter Standard von Sigma (St. Louis, MO, USA) verwendet. Für den Nachweis von Proteinen wurden die SDS-Gele mit Coomassie gefärbt. Dafür wurde das Gel für 1-2 h in einer Coomassie-Färbung Lösung inkubiert, danach mit Wasser gespült und anschließend entfärbt.

Coomassie R250-Färbelösung:

0,25 % Coomassie R250 (Sigma-Aldrich), 50 % Methanol, 10 % Essigsäure

Entfärbelösung: 25 % Isopropanol, 10 % Essigsäure

4.4.6 Westernblot und Immundetektion von Proteinen

Das verwendete Protokoll ist mit einigen Abänderungen nach dem von Kyhse-Anderson *et al.* [107] durchgeführt wurden. Nach der SDS-PAGE wurden die aufgetrennten Proteine auf eine Nitrocellulose-Membran durch Anlegen einer Stromstärke von 1 mA/cm² übertragen. Dafür wurde eine halbtrockene Blotting-Apparatur (Peqlab, Erlangen) verwendet. Der Blot (Nitrocellulosemembran) wurde anschließend mit Ponceau S-Lösung gefärbt. Ponceau S färbt reversibel alle Proteine, so dass anhand dieser Färbung auch die Proteinmengen, die aufgetragen wurden, abgeschätzt werden konnten. Darauf folgend wurde die Blotting-Membran durch Inkubation in einer Lösung aus 5 % Magermilchpulver (wenn die Entwicklung über die ECL Reaktion erfolgen sollte) bzw. Fischgelatine (bei alkalischer Phosphatase Reaktion) in TBST für 1 h oder über Nacht blockiert. Die Bindung der primären Antikörper wurde in 1,6 % Magermilchpulver in TBST für 1 h durchgeführt, gefolgt von 3-maligem Waschen mit TBST. Die sekundären Antikörper, konjugiert mit

Meerrettichperoxidase oder alkalischer Phosphatase wurden 1:10000 in TBST verdünnt und der Blot darin mindestens 1 h inkubiert. Anschließend wurde die Membran zweimal mit TBST und einmal mit TBS gewaschen. Im Falle der Meerrettichperoxidase als sekundärer Antikörper erfolgte die Entwicklungsreaktion mit ECL. Jeweils 400 µl der ECL Reagenzien Lösung A und Lösung B (Luminol und Enhancer Lösung A und Stable Peroxidase Lösung B; AppliChem) wurden für 30 s mit der Proteinseite der Membran inkubiert, die überschüssige Flüssigkeit abgesaugt und der Blot in Frischhaltefolie eingeschlagen. Danach wurde er in einer Röntgenfilm-Haltevorrichtung (Kisker, Steinfurt) platziert. In der Dunkelkammer wurde ein Röntgenfilm (Fuji Super RX, Fujifilm, Tokyo) auf den Blot gelegt und je nach gewünschter Signalstärke für 1 s bis 30 min belichtet. Der so belichtete Röntgenfilm wurde anschließend in Entwicklerlösung (T32, Calbe Chemie, Calbe) für 2 min inkubiert, mit Wasser gespült und in Fixierlösung (Superfix, Tetenal, Norderstedt) für 2 min fixiert. Bei Verwendung des Sekundärantikörpers, der mit alkalischer Phosphatase konjugiert ist, erfolgt die Entwicklung direkt auf der Membran. Zu 10 ml alkalische Phosphatase Reaktionspuffer wurden 45 µl NBT (Stammlösung: 75 mg/ml in 70 % DMF) und 35 µl BCIP (50 mg/ml in 100 % DMF) hinzugefügt und die Membran darin in Dunkelheit inkubiert. Nachdem die gewünschte Färbeintensität erreicht war, wurde die Reaktion durch gründliches Spülen mit Wasser gestoppt.

Blot Puffer 1: 300 mM Tris; 20 % Methanol

Blot-Puffer 2: 30 mM Tris; 20 % Methanol

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

Ponceau S-Lösung: 0,1 % Ponceau S; 5 % Essigsäure

Alkalische Phosphatase-Reaktionspuffer: 100 mM Tris/Cl; 100 mM NaCl; 50 mM MgCl₂; pH 9,5

4.4.7 Densitometrische Bestimmung der Expressionsstärke von Proteinen

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

4.4.8 Isolierung von Dictyostelium Kernen und Centrosomen

Wenn nicht anders angegeben, wurden alle Schritte auf Eis bzw. mit eiskalten Puffern und vorgekühlten Zentrifugen durchgeführt, um einen Proteinabbau zu verhindern. Die Proben, Centrosomen oder auch Zellkerne, wurden anschließend für SDS-PAGE oder

Immunfluoreszenz Experimente weiter verwendet. Die Isolierung wurde nach einem modifizierten Protokoll von Graf *et al.* [10] durchgeführt. Es wurden ungefähr 1×10^9 Zellen mit einer maximalen Dichte von 4×10^6 Z/ml geerntet und zweimal mit 30 ml Phosphat-Puffer gewaschen. Einem dritten Waschschriff mit 20 ml Phosphat-Puffer wurden $2 \mu\text{M}$ Cytochalasin A (Endkonzentration) hinzugefügt. Das Zellpellet wurde in 10 ml Lysepuffer resuspendiert und für 1 min gut gemischt (Vortex). Anschließend erfolgte der mechanische Aufschluss des Lysats unter Verwendung einer $5 \mu\text{m}$ Nucleopore Membran (Whatman, Maidstone, UK), woran sich eine sofortige Zentrifugation 4000 rpm (Hettich Rotanta, 5624 Rotor) für 10 min anschloss. Die im Lysat enthaltenen Kerne wurden pelletiert und damit auch die an den Kernen gebundenen Centrosomen. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 10 ml Pyrophosphat-Puffer resuspendiert, für 1 min gevortext und wie oben beschrieben bei 4000 rpm erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde mit 2 mg Heparin ergänzt, vermischt und für 5 min inkubiert auf Eis. Diese Lösung enthält nun bereits 30 % Saccharose und wurde anschließend vorsichtig auf einen Saccharose-Gradienten geladen. Dieser bestand aus 1 ml 80 % und 1 ml 50 % Saccharose-Lösung und wurde in einem Beckman SW-40 Röhrchen vorbereitet. Der Gradient wurde für 1 h bei 40000 g (21000 rpm, Beckman Optima L-100K Ultrazentrifuge, SW-40 Rotor) zentrifugiert und danach sofort auf Eis gestellt. Mit einer Schlauchpumpe und Glaskapillaren (Flussrate $200 \mu\text{l}$ pro min) wurden ca. $500 \mu\text{l}$ der 80 % Saccharose-Fraktion vom dem Boden des SW-40 Röhrchen entfernt und verworfen. Darauf folgend wurde aus dem Boden des Röhrchens wieder 1 ml Saccharose-Lösung abgenommen und in einem neuen Gefäß gesammelt. Diese Fraktion, welche die Grenze der 80 % und 50 % Saccharose-Lösungen darstellt, enthält die Centrosomen. Für Immunfluoreszenz Experimente wurden 10 bis $30 \mu\text{l}$ der Centrosom-Fraktion in 1 ml eiskaltem Phosphatpuffer verdünnt und auf Deckgläser durch Zentrifugation bei 4500 rpm (Hettich Rotanta, 5624 Rotor) sedimentiert. Die Fixierung und Immunmarkierung von isolierten Centrosomen erfolgte nach dem Protokoll für ganze Zellen wie in 4.6.1 beschrieben. Wichtig ist, dass während des gesamten Isolationsprozesses kein DTT oder gleichwertige Reduktionsmittel verwendet werden, wenn die GFP-Fluoreszenz von isolierten Centrosomen analysiert werden soll. Für SDS-PAGE wurde die centrosomale Fraktion mit 6 x Laemmli-Puffer ergänzt und bei $95 \text{ }^\circ\text{C}$ für 5 min inkubiert.

1 x Protease-Inhibitor-Cocktail: 1 mM Pefabloc SC; $25 \mu\text{g/ml}$ Leupeptin; $10 \mu\text{g/ml}$ Tosyl-Arginin-Methylester; $10 \mu\text{g/ml}$ Sojabohnen-Trypsin-Inhibitor; $1 \mu\text{g/ml}$ Aprotinin; $1 \mu\text{g/ml}$ pepstatine; 2 mM Benzamidin; 1 mM Na-ATP

Lysepuffer: 100 mM Na-PIPES; pH 6,9; 2 mM MgCl₂; 10 % (w/v) Saccharose; frisch zugesetzt: 1 × Protease-Inhibitor-Cocktail; 0,25 % Triton X-100; 1 mM DTT; 2 μM Cytochalasin A

Pyrophosphat-Puffer: 100 mM Na-PIPES; pH 6,9; 2 mM MgCl₂; 30 % (w/v) Saccharose; frisch hinzugefügt: 1 × Protease Inhibitor Cocktail; 40 mM Tetra-Natriumpyrophosphat; 1 % Triton X-100; 1 mM DTT; 2 μM Cytochalasin A

Saccharose-Lösungen, die für die Saccharose-Gradienten verwendet wurden:

10 mM Na-PIPES; pH 6,9; 2 mM MgCl₂; Saccharose (50 % bzw. 80 %); frisch zugesetzt: 1 × Proteaseinhibitorcocktail; 0,1 % Triton X-100; 2 mM DTT

4.4.9 Expression von Fusionsproteinen in Bakterien

Bakteriell exprimierte Fusionsproteine können in vielerlei Hinsicht experimentell weiterverwendet werden. In dieser Arbeit wurden die Proteine, meist an MBP-fusioniert, zur Herstellung und Aufreinigung von Antikörpern verwendet. Am Vortag wurde eine 50 ml Vorkultur in LB^{Amp} bei 37 °C unter Schütteln über Nacht bebrütet. Die Vorkultur wird am nächsten Morgen auf zwei Schikanekolben mit je 400 ml vorgewärmten LB^{Amp} Medium (mit 10 mM Glukose) aufgeteilt und bei 37 °C bis zu einer OD₆₀₀ 0,6 bis 1,0 (Dauer ca. 2-3 h) inkubiert. Anschließend erfolgt die Induktion der Proteinexpression mit IPTG (0,3 M IPTG Endkonzentration) für 1-6 h bei 14 °C bis 37 °C. Die Zellen wurden bei 4000 rpm (Hettich Rotanta 460R, 5645 Rotor) geerntet und das Pellet in 15 ml TE-Puffer aufgenommen und bei -20°C gelagert.

4.4.10 Aufreinigung bakteriell exprimierter Proteine (MBP-Fusionsproteine)

Um einen Protein-Abbau zu verhindern wurden alle folgenden Schritte auf Eis und / oder mit eiskaltem Puffer durchgeführt. Nach dem Auftauen des aus 4.4.9 erhaltenen Bakterienpellets wurde die Zellsuspension für 3 min in einem Sonifizierstab (Ultraschallprozessor, Dr. Hielscher GmbH) mit den Einstellungen Amplitude 100%, Cycle zwischen 0,6 und 0,7 beschallt. Die unlösliche Fraktion wurde durch Zentrifugation bei 10.000 rpm für mindestens 30 min (Beckman Avanti JE Zentrifuge, JA-25.50 Rotor, 4 °C) vom Überstand getrennt. Der Überstand wurde mit NaCl (100 mM Endkonzentration) versetzt und wurde vorsichtig auf eine Säule mit 1 ml Amylose-Harz (NEB, Ipswich, MA, USA) geladen. Die Fließgeschwindigkeit für die Bindung des MBP-Fusionsproteins an das Harz wurde auf etwa einen Tropfen pro 10 s eingestellt. Das Amylose-Harz wurde anschließend mit einmal mit 10 ml MBP-Säulenpuffer und einmal mit 10 ml PBS gewaschen (maximale Durchflussgeschwindigkeit). Zur Elution wurden 10 mM Maltose in PBS gelöst und das

MBP-Fusionprotein mit einer Tropfgeschwindigkeit von einem Tropfen pro 10 Sekunden in 500 µl Fraktionen eluiert. Die Säule wurde anschließend mit 20 %-igem Ethanol in MBP-Säulenpuffer gewaschen und bei 4°C aufbewahrt in MBP/Ethanol aufbewahrt.

MBP Säulenpuffer: 200 mM NaCl; 10 mM Tris/HCl, pH 7,5; 1 mM EDTA

4.4.11 Aufreinigung von Antikörpern

Ungefähr 0,5 mg MBP-Fusionsprotein (MBP-CP55 bzw. MBP-CP148) wurde für die Aufreinigung des Antikörpers aus Serumproben verwendet. Ein 15 ml Falcon wurde mit 1000 µl NHS-activated Sepharose (GE Healthcare, Uppsala) befüllt und mit 1 mM eiskaltem HCl gewaschen (Vortex). Die Beads wurden anschließend pelletiert, der Überstand verworfen und die Lösung mit dem enthaltenen MBP-Fusionprotein hinzugegeben. Es folgte eine Inkubation über Nacht bei Raumtemperatur auf dem Rotator. Am nächsten Tag wurden die Beads aus dem Falcon in ein leeres Säulenröhrchen mit Filter überführt und mit einem Säulenvolumen Puffer A gewaschen, so dass ca. 1 cm Pufferlösung über dem Säulenmaterial für eine 15-minütige Inkubation übrig blieb. Es folgte ein Waschschrift mit Puffer B, anschließend mit Puffer A und einer einstündigen Inkubation (wieder 1 cm Puffer über dem Säulenmaterial). Das Waschen mit Puffer B folgte sowie eine erneute einstündige Inkubation mit Puffer A gefolgt mit dem letzten Waschschrift mit Puffer B. Zu diesem Zeitpunkt konnte die Säule bei 4 °C in TBS 0,1 % NaN₃ gelagert werden. Vor dem Gebrauch wurde die Säule dreimal mit TBS gewaschen. Für die Antikörper-Aufreinigung wurden die Seren im Verhältnis 1:10 in TBS verdünnt und auf die Säule geladen. Die Flussrate wurde auf ein Tropfen pro 10 Sekunden begrenzt. Nach dem dreimaligen Waschen mit PBS wurden die spezifischen Antikörper durch Zugabe von 100 mM Glycin pH 2,7 zu Fraktionen von 600 µl eluiert und sofort mit 1 M Tris/HCl pH 9,5 neutralisiert. Die Antikörper Fraktionen wurden in Immunblot-Experimenten getestet und ihre Konzentration im Photometer bei 280 nm bestimmt. Eine OD₂₈₀ von 1,0 entspricht einer Proteinkonzentration von 0,7 mg/ml.

Puffer A: 1 M Tris/HCl; pH 8,5

Puffer B: 0,1 M Natriumacetat; 0,5 M NaCl; pH 4,0

4.5 Zellbiologische Methoden

4.5.1 Kultivierung und Konservierung von *E.coli*

E. coli Zellen wurden bei 37 ° C entweder in LB-Medium schüttelnd bei 240 rpm oder auf LB-Agar-Platten unter Zusatz des jeweiligen Antibiotikums kultiviert. Die Expression von Plasmiden, bei denen höhere Bakterienzellichten benötigt werden oder bei denen die Bakterien zu Rekombination neigen, wurde Terrific Broth-Medium (TB) verwendet. Für eine dauerhafte Sicherung eines Bakterienstammes wurden 600 µl einer Schüttelkultur in der exponentiellen Phase mit der gleichen Menge Einfriermedium versetzt, gemischt und bei -70 °C eingefroren.

LB-Medium: 10 g/l Trypton; 5 g/l Hefeextrakt; 10 g/l NaCl; pH 7,0

LB-Agarplatten: LB-Medium mit 1,5 % Agar

Terrific Broth-Medium (TB-Medium) [108]: 900 ml einer Lösung aus 13,2 g/l Trypton; 26,4 g/l Hefeextrakt und 4,4 ml Glycerin wurden mit 100 ml eines Puffers, bestehend aus 0,17 M KH₂PO₄ und 0,72 M K₂HPO₄, gemischt. Beide Lösungen müssen vor dem Mischen separat autoklaviert werden!

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

4.5.2 Kultivierung und Konservierung von *K. aerogenes*

Klebsiella aerogenes wurde ähnlich wie *E. coli* entweder in Schüttelkultur oder auf SM-Agarplatten kultiviert.

SM-Agarplatten: 10 g/l Peptone (Oxoid); 1 g/l Hefeextrakt (Oxoid); 10 g/l Glukose; 20 g/l Bacto Agar; 1,6 g/l K₂HPO₄; 2,2 g/l KH₂PO₄; 1 g/l MgSO₄; pH 6,5

4.5.3 Kultivierung und Konservierung von Dictyostelium Zellen

Dictyostelium-Zellen wurden entweder axenisch in HL5c Medium (Formedium, Hunsanton, UK) in Schüttelkultur (150 rpm, Certomat R, Sartorius, Göttingen) bei 21 °C oder als adhärente Kultur in Zellkulturflaschen mit den entsprechenden Antibiotikaresistenzen (Blasticidin S 4 µg/ml, G418 10 µg/ml) kultiviert. In Flüssigkultur betrug die Zelldichte von Dictyostelium Zellen maximal 5 x 10⁶ Z/ml, um phänotypische Veränderungen zu vermeiden. Generell wurden die Kulturen nicht länger als vier Wochen, Stämme für Transformationen nur zwei Wochen verwendet. Alternativ wurde Dictyostelium auf einem Bakterienrasen von Klebsiella (SM-Agar-Platten) angezüchtet. Diese Methode wurde entweder zum Vereinzeln der Dictyostelium-Klone, zur Regulation der Expression von GFP-Fusionsproteinen (G418

Resistenz) oder für mutante Dictyostelium Stämme verwendet, die Schwierigkeiten beim Wachstum in Flüssigkultur hatten. Das Medium von Dictyostelium Kulturen in Zellkulturflaschen wurde in der Regel zwei- bis dreimal wöchentlich gewechselt. Sporen, die von Dictyostelium als Reaktion auf Nahrungsmangel gebildet werden, können über Jahrzehnte eingefroren werden. Dafür wurde eine axenisch gewachsene Dictyostelium Kultur geerntet und zweimal mit Phosphatpuffer gewaschen. Das Pellet wurde erneut in 10 ml Phosphatpuffer resuspendiert und auf Phosphatagarplatten gegeben. Nach 30-minütiger Inkubation wurde der Überstand vorsichtig abgesaugt und die Platte anschließend getrocknet. Sobald Fruchtkörper voll entwickelt waren, wurden die Sporen mit 4 ml sterilem Phosphat-Puffer pro Platte geerntet und bei $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Neue Kulturen konnten dann durch das Auftauen von $100\text{ }\mu\text{l}$ Sporensuspension pro 20 ml Medium mit dem entsprechenden Antibiotika erhalten werden. Da einige Mutanten nach Sporenbildung ihren Phänotyp verlieren, können Dictyostelium Zellen ebenfalls lebend eingefrorenen und im flüssigen Stickstoff aufbewahrt werden. Von einer vorgekühlten, dicht bewachsenen Kulturflasche ($2\text{-}4 \times 10^6\text{ Z/ml}$) werden $900\text{ }\mu\text{l}$ in ein vorgekühltes Cryogefäß, das bereits $100\text{ }\mu\text{l}$ Pferdeserum enthält, pipettiert und invertiert. Zu dieser Suspension wurde anschließend $100\text{ }\mu\text{l}$ DMSO hinzugefügt und invertiert. Die Proben wurden für zwei Stunden auf $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, anschließend für fünf Stunden auf $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ abgekühlt und danach in flüssigem Stickstoff gelagert. Der Auftauvorgang muss möglichst schnell erfolgen. Dafür wurde die im Cryogefäß enthaltene Kultur bei RT angetaut, mit 10 ml HL5c Medium verdünnt und anschließend geerntet. Das Pellet wurde in 5 ml frischem HL5c-Medium aufgenommen.

HL5c Medium: 5 g/l Hefeextrakt (Difco); 2,5 g/l Bacto-Trypton (Difco); 2,5 g/l Casein-Pepton (Merck); 5 g/l Proteosepepton (Oxoid); 10 g/l Glukose; 1,2 g/l KH_2PO_4 ; 0,35 g/l Na_2HPO_4 ; pH 6,5

Phosphat-Agarplatten: 14,6 mM KH_2PO_4 ; 2 mM Na_2PO_4 ; 15 g/l Bacto-Agar; pH 6,0

4.5.4 Herstellung TRITC markierter Hefen

Alle Zentrifugationsschritte wurden bei 2500 rpm für 5 mindurchgeführt.

5 g handelsüblicher Trockenhefe wurden in 50 ml 1 x PBS für 30 min unter Rühren auf einer Heizplatte im Becherglas gekocht. Anschließend wurden die Hefezellen 5-mal mit 1 x PBS und 2-mal mit Phosphatpuffer gewaschen (5 min, 2500 rpm, Hettich Rotanta 460R, 5645 Rotor). Mittels Verdünnung in Phosphatpuffer wurden die Zellen auf eine Dichte von $1 \times 10^9\text{ Z/ml}$ eingestellt und bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Für die Markierung mit TRITC wurden 2×10^{10} Zellen in 20 ml 50 mM Na_2HPO_4 pH 9,2 resuspendiert und 2 mg TRITC, gelöst in $200\text{ }\mu\text{l}$

DMSO, hinzugefügt. An eine Inkubation von 30 min bei 37 °C unter Schütteln folgte ein zweifacher Waschschrift mit 50 mM Na₂HPO₄. Darauf folgte ein erneutes viermaliges Waschen mit Phosphatpuffer, an das sich das Einstellen der Konzentration auf 1 x 10⁹ Z/ml mit Phosphatpuffer anschloss. Die Suspension wurde anschließend in 1,5 ml Reaktionsgefäßen aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

4.5.5 Wachstumsversuch

Um zu überprüfen, ob sich eine Mutation auf die Wachstumsgeschwindigkeit der Mutante im Vergleich zum Kontrollstamm auswirkt, wurde ein Wachstumsexperiment durchgeführt. Die Ausgangszellkonzentration betrug, in einem dreifachen Ansatz, jeweils 5 x 10⁴ Z/ml in einem Gesamtvolumen von 25 ml. Anschließend erfolgte nach ausgewählten Zeitabständen die Bestimmung der Zelldichte mit einer Neubauer *improved* Zählkammer. Die Kulturen sollten in 24 h wenigstens 2-mal mit einem Abstand von mindestens 8 h gezählt werden. Das Experiment wurde nach Erreichen der stationären Phase (ungefähr 1-2 x 10⁷ Z/ml) beendet. Die Auswertung und grafische Darstellung erfolgte unter Verwendung von Microsoft Excel 2007.

4.5.6 Überprüfung der Phagozytose von *K. aerogenes* durch Dictyostelium

Für diesen Versuch wurden zunächst SM-Agarplatten (SM-Platte) (siehe 4.5.2) mit *K.aerogenes* (KA) hergestellt. Eine Suspension aus 20µl KA (Glycerinstock) und 200 µ PP wurde auf einer SM-Platte ausplattiert und ÜN bei 37°C bebrütet. Am nächsten Tag erfolgte das Animpfen mit den zu testenden Dictyostelium-Stämmen. Zuvor erfolgte eine Markierung auf der Petri-Schale für die jeweilige Probe. Pro SM-Platte mit KA wurden 2 Markierungen (Proben) für CP55 k/o und eine für AX2 gesetzt. Es wurden je 20 µl eines Stamms mit einer Zelldichte von 2,5 x 10⁶ Z/ml (entspricht 5 x 10⁴ Zellen) verwendet und auf den Bakterienrasen gegeben. Der so entstandene Kreis wurde als Ausgangswert definiert (0 Tage). Die Inkubation erfolgte bei 22 °C. Da die CP55 k/o Stämme augenscheinlich kein Wachstum zeigten, wurden zur Bestimmung der Plaquedurchmesser größere Zeitabstände gewählt (ca. alle 4 Tage).

4.6 Mikroskopische Methoden

4.6.1 Fixierung und indirekte Immunfluoreszenz von Dictyostelium Zellen

Adhärente oder in Schüttelkultur wachsende Dictyostelium-Zellen wurden geerntet und wenn nötig mit Phosphatpuffer auf eine Dichte von 5-10 x 10⁵ Z/ml verdünnt. Die Suspension wurde auf 12 mm-Deckgläschen in Titerplatten überführt und für mindestens 15 Minuten bei

22 °C inkubiert. Zellen, die aufgrund genetischer Manipulation innerhalb kurzer Zeit nicht am Substrat haften können, wurden über Nacht für 24 h auf dem Deckglas inkubiert.

Je nachdem welcher Antikörper verwendet werden sollte wurde entweder mit Glutaraldehyd oder Methanol fixiert. Letzteres eignet sich zur Färbung der Core-Proteine sowie von CP224, CP148 und des Golgi-Apparats. Die Glutaraldehydfixierung wurde bei Färbungen der Mikrotubuli, von CP148 und der Kernmembranproteine Sun1 sowie NE81 verwendet.

Glutaraldehydfixierung

Herstellen der Fixierlösung: Pro Deckgläschen (Präparat) wird 1 ml Fixans benötigt. Zu 50 % PHEM-Puffer (Stammlösung 100 %) wurden 0,5 % Glutaraldehyd (Endkonzentration, Stammlösung 25 %), 0,5 % Triton X-100 (Endkonzentration, Stammlösung 25 %) hinzugefügt und gemischt. *Fixierung der Zellen:* Das Medium wurde abgesaugt und auf jede Probe 1 ml Fixans für 5 min bei Raumtemperatur gegeben. Hierbei ist es wichtig, dass die Zellen nicht austrocknen und sofort nach dem Absaugen des Mediums mit dem Fixans überschichtet werden. Die Zellen wurden anschließend 3-mal für 5 min mit Phosphatpuffer gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit einer Borhydridlösung (1 mg/ml frisch gelöst in Phosphatpuffer) überschichtet und darin mindestens 10 min lang inkubiert. Danach erfolgte je ein einmaliges Waschen mit Phosphatpuffer und PBS, so dass die Zellen nun für die Immunfärbung verwendet werden konnten.

Methanolfixierung

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

Immunfärbung von fixierten Dictyostelium-Proben:

Die fixierten Präparate wurden in eine feuchte Kammer überführt, um eine Austrocknung aufgrund der verwendeten kleinen Volumina zu verhindern. Als primäre Antikörper (AK) wurden Hybridomazellüberstände (monoklonale Antikörper) und/oder Antiseren verwendet. Bei Gebrauch zweier primärer AK wurde das Antiserum wenn möglich im Überstand des monoklonalen AKs verdünnt. Wenn dies nicht möglich war, erfolgte eine Verdünnung in AKV (Antikörper Verdünnungspuffer). Die Präparate wurden je nach verwendetem Antikörper für 1-3 h inkubiert und anschließend 3-mal für 5 min mit PBS gewaschen. Um das Zielprotein in der Immunfluoreszenz-Mikroskopie sichtbar zu machen, wurden die Präparate

mit einem sekundären AK gefärbt, der mit einem entsprechenden Fluoreszenzfarbstoff konjugiert war. Bei Verwendung der Alexa-Farbstoffe wurde der sekundäre AK 1:1000, bei Nutzung der Cy-Farbstoffe 1:500 in PBS verdünnt. Die Inkubation erfolgte für mindestens 1 h (Raumtemperatur) bei Dunkelheit. Danach wurden die Proben 2-mal mit PBS gewaschen und für 15 min zur Markierung der DNA in einer DAPI-Färbelösung (1 mg/ml in PBS) inkubiert. Während dessen erfolgte die Vorbereitung eines Objektträgers, auf dem nach 1-maligem Waschen des Präparats für 5 min mit PBS die Einbettung in Mowiol folgte. Die Präparate wurden unter Lichtabschluss und bei 4 °C aufbewahrt.

Antikörper-Verdünnungs-Puffer (AKV)

0,02 % NaN₃ in 0,1 % BSA Lösung

PHEM Puffer [109]

60 mM PIPES; 25 mM HEPES; 10 mM EGTA; 2 mM MgCl₂; pH 6,9

4.6.2 Weitfeld- und konfokale-Spinning-Disk-Mikroskopie

Immunfluoreszenz-Präparate wurden mit einem Zeiss Axiovert 200M CellObserver HS-System (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Jena) mikroskopiert und dokumentiert. Als Lichtquelle dienten entweder ein Sutter DG-4 Wellenlängenwechsler mit Xenonlampe (Sutter Instruments, Novato, CA, USA) oder eine HXP120C Quecksilberhalidlampe. Des Weiteren ist das System mit einer Piezo-Bühne ASI (Applied Scientific Instruments, Eugene, OR, USA) ausgestattet. Für die Aufnahme fixierter Zellen wurde immer eine Zeiss AxioCam MRm Rev. 3 CCD-Kamera, für Imaging Aufnahmen eine AxioCam HSm CCD-Kamera verwendet. Bei der Aufnahme der fixierten Zellen wurde entweder das 100x/1,4 PlanApo oder 40x/1,3 Plan-Neofluar genutzt, während Live-Cell-Imaging Aufnahmen ausschließlich unter Verwendung des 63x/1,3 LCI Plan-Neofluar Objektivs erfolgten. Alle fixierten Zellen wurden in Bildstapel mit einem Abstand von 0,125 µm bis 0,250 µm von Bild zu Bild (Z-Ebene) aufgenommen. Die Nachbearbeitung der Rohdaten erfolgte mittels iterativer Dekonvolution mit berechneter PSF. Zur Berechnung der PSF wurde ein Präparat mit 200 nm großen fluoreszierenden Beads (TetraSpeck™ beads, Invitrogen) hergestellt. Von diesem wurden mindestens 120 Bildstapel mit einem Abstand von 0,050 µm aufgenommen. Die PSF wurde aus den so entstandenen Rohdaten und der PSF-Erzeugen-Funktion von Axio-Vision berechnet. Eine Maximalintensitätsprojektion zur Darstellung der Bilder wurde mit MBF-ImageJ durchgeführt.

Für die Aufnahme von lebenden Zellen mit dem Weitfeldsystem wurde ein Bildabstand von 1 µm für die einzelnen Ebenen gewählt und die Rohdaten mit der Dekonvolutionsmethode

„inverse-Filter“ berechnet. Alternativ wurden die Zellen mit einem konfokalem-Spinning-Disk-System (CellObserver SD, Carl Zeiss Microimaging GmbH Göttingen, Germany) aufgenommen, das mit 2 Evolve EM-CCD Kameras (Photometrics, Tucson, AZ, USA) und einem Rapp UGA-40-2L Galvo Scanner (Rapp Optoelectronics, Hamburg, Germany) sowie einem 473 nm punktfokussierten Diodenlaser (Rapp Optoelectronics, Hamburg, Germany) ausgestattet ist. Für Live-Cell-Imaging Aufnahmen wurden ungefähr 1×10^6 Zellen in ein Glasbodenschälchen überführt (Fluoridish, WPI, Berlin, Germany). Nach einer mindestens 15-minütigen Inkubationszeit, in der sich die Zellen am Boden absetzten, wurde das Medium vorsichtig abgesaugt und durch LoFlo Medium (Formedium, Hunstanton, UK) ersetzt. Des Weiteren wurde 2 mg/ml Ascorbinsäure (Endkonzentration) als Radikalfänger zur Vermeidung phototoxischer Defekte hinzugegeben.

Für FRAP Experimente wurde zudem die Agar-Overlay Technik nach Fukui *et al.* [110] angewendet. Dadurch wurden die Zellen flach gedrückt und in ihrer Bewegung eingeschränkt, ohne die Intrazellulären Bewegungsprozesse zu beeinflussen. Der Zeitraffer der Akquisition betrug 4 Stacks pro Minute (bei einer Bildrate von 10 fr/s) und einem Positionsabstand von 1 μm zwischen den Z-Ebenen. Pro Bildstapel wurden 7 Ebenen aufgenommen. Für die FRAP-Experimente wurde 100x/1,4 PlanApo-Objektiv verwendet. Der Bleichvorgang erfolgte mit der „click and fire“-Funktion des über die RAPP-Software gesteuerten 473 nm punktfokussierten Lasers. Um verschiedene Experimente vergleichen zu können, wurden die Einstellungen konstant gehalten. Die aufgenommenen FRAP-Filme wurden mit Hilfe von ImageJ in einer maximalen Intensitätsprojektion auf eine Ebene gebracht. Anschließend erfolgte die Auswertung des Bleichvorgangs mit ImageJ. Die Messungen der Intensität der Fluoreszenz begannen 2 Zeitpunkte vor dem eigentlichen Bleichvorgang. Für jeden Zeitpunkt wurde die Intensität des Signals der eigentlichen Probe, der Kontrolle (zur Bestimmung des „Autobleachings“ während der Aufnahme) und auch des Hintergrunds in einer definierten, konstant gehaltenen „Region-of-interest“ ROI (5x5 Pixel) gemessen. Die Bewegung der Centrosomen wurde durch eine entsprechende Repositionierung der ROI kompensiert. Die so erhaltene Tabelle mit den Daten aus gemessener Fläche und Fluoreszenzstärke wurde in Microsoft Excel überführt und dort weiterbearbeitet. Zur Vereinfachung der Berechnungen wurde ein linearer Bleichvorgang angenommen. Die Auswertung der Daten erfolgte nach dem Protokoll von Samereier *et al.* [111]. Alle Software-Anwendungen wurden mit AxioVision 4.8 und MacBiophotonics Image J v.1.42l durchgeführt.

4.6.3 Bestimmung des DNA Gehalts von Dictyostelium Zellen

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

4.6.4 Bestimmung der Zellfläche von Dictyostelium-Zellen

Die Messung der Zellfläche als Maß der Größe der Dictyostelium Zellen erfolgte in Phasenkontrastaufnahmen mit ImageJ. Die Auswertung der Messdaten erfolgte anschließend mit Microsoft Excel 2007.

4.6.5 Elektronenmikroskopie von Dictyostelium-Zellen (apl. Prof. Dr. Otto Baumann)

Die Elektronenmikroskopie von Dictyostelium-Zellen wurde im Prinzip wie in Ueda *et al.* beschrieben durchgeführt [46]. Die Vorbereitung der Zellen (Absetzen auf dem Deckglas) erfolgte wie in 4.6.1 beschrieben, nach dem Absetzen wurden die Zellen einmal mit Phosphatpuffer gewaschen. Die Fixierung erfolgte für 30 min mit 1 % frischem Glutaraldehyd in PHEM Puffer, der 0,5 % Triton X-100 enthielt. Nach dem Waschen der Deckgläser für 3×5 min mit 50 mM Na-Cacodylat-Puffer (pH 7,0), wurden die Proben für 30 min in Na-Cacodylat-gepuffertem 1 %-igem OsO_4 nachfixiert. Nach der Dehydrierung der Präparate in einer aufsteigenden Ethanol-Reihe (50 %, 60%, 70%, 90%, 100%, 2 x 100 % wasserfrei) und Aceton (2 x 100 % wasserfrei) für je 5 min wurden die Proben in Einbettmittel (siehe unten) eingebettet. Ultradünne Schnitte wurden auf einem Philips CM100 Elektronenmikroskop angesehen und dokumentiert.

2 x PHEM Puffer: 24 mM PIPES; 10 mM HEPES; 3,2 mM EGTA; 2 mM MgCl_2 ; pH 7,0

Einbettmittel: Agar Scientific, Agar low viscosity resin kit R1078; für 4 Präparate: LV Resin 12 g; VH1 Hardener 2 g; VH2 Hardener 10 g; LV Accelerator 0,625 g

Phosphatpuffer: 14,6 mM KH_2PO_4 ; 2 mM Na_2HPO_4

OsO_4 : 4%ige Lösung in Ampullen; Ampulle immer vollständig aufbrauchen

0,4 M Na-cacodylate Puffer (Arsenhaltig!)

5. Literaturverzeichnis

1. Schaap, P., *Evolutionary crossroads in developmental biology: Dictyostelium discoideum*. Development, 2011. **138**(3): p. 387-96.
2. Fortunato, A., et al., *Co-occurrence in nature of different clones of the social amoeba, Dictyostelium discoideum*. Mol Ecol, 2003. **12**(4): p. 1031-8.
3. Gräf, R., *Microtubule Organization in Dictyostelium*. eLS. John Wiley & Sons Ltd, Chichester, 2009 [Wiley: 10.1002/9780470015902.a0021852]).
4. Williams, R.S., et al., *Towards a molecular understanding of human diseases using Dictyostelium discoideum*. Trends Mol Med, 2006. **12**(9): p. 415-24.
5. Li, G., et al., *Molecular basis for resistance to the anticancer drug cisplatin in Dictyostelium*. Microbiology, 2000. **146** (Pt 9): p. 2219-27.
6. Shkilnyy, A., et al., *Unprecedented, low cytotoxicity of spongelike calcium phosphate/poly(ethylene imine) hydrogel composites*. Macromol Biosci, 2009. **9**(2): p. 179-86.
7. Eichinger, L., et al., *The genome of the social amoeba Dictyostelium discoideum*. Nature, 2005. **435**(7038): p. 43-57.
8. Martens, H., et al., *RNAi in Dictyostelium: the role of RNA-directed RNA polymerases and double-stranded RNase*. Mol Biol Cell, 2002. **13**(2): p. 445-53.
9. Koch, K.V., et al., *Identification and isolation of Dictyostelium microtubule-associated protein interactors by tandem affinity purification*. Eur J Cell Biol, 2006. **85**(9-10): p. 1079-90.
10. Gräf, R., et al., *Isolation of nucleation-competent centrosomes from Dictyostelium discoideum*. Eur J Cell Biol, 1998. **76**(3): p. 167-75.
11. Reinders, Y., et al., *Identification of novel centrosomal proteins in Dictyostelium discoideum by comparative proteomic approaches*. J Proteome Res, 2006. **5**(3): p. 589-98.
12. St Johnston, D. and B. Sanson, *Epithelial polarity and morphogenesis*. Curr Opin Cell Biol, 2011. **23**(5): p. 540-6.
13. Ehrhardt, D.W., *Straighten up and fly right: microtubule dynamics and organization of non-centrosomal arrays in higher plants*. Curr Opin Cell Biol, 2008. **20**(1): p. 107-16.
14. Linck, R.W. and R.E. Stephens, *Functional protofilament numbering of ciliary, flagellar, and centriolar microtubules*. Cell Motil Cytoskeleton, 2007. **64**(7): p. 489-95.
15. Kollman, J.M., et al., *Microtubule nucleation by gamma-tubulin complexes*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2011. **12**(11): p. 709-21.
16. Raynaud-Messina, B. and A. Merdes, *Gamma-tubulin complexes and microtubule organization*. Curr Opin Cell Biol, 2007. **19**(1): p. 24-30.
17. Zeng, C.J., Y.R. Lee, and B. Liu, *The WD40 repeat protein NEDD1 functions in microtubule organization during cell division in Arabidopsis thaliana*. Plant Cell, 2009. **21**(4): p. 1129-40.
18. Kollman, J.M., et al., *Microtubule nucleating gamma-TuSC assembles structures with 13-fold microtubule-like symmetry*. Nature, 2010. **466**(7308): p. 879-82.
19. Daunderer, C. and R. Gräf, *Molecular analysis of the cytosolic Dictyostelium gamma-tubulin complex*. Eur J Cell Biol, 2002. **81**(4): p. 175-84.
20. Koonce, M.P. and A. Khodjakov, *Dynamic microtubules in Dictyostelium*. J Muscle Res Cell Motil, 2002. **23**(7-8): p. 613-9.

21. Kimble, M., et al., *Microtubule organization and the effects of GFP-tubulin expression in dictyostelium discoideum*. Cell Motil Cytoskeleton, 2000. **47**(1): p. 48-62.
22. Samereier, M., et al., *Analysis of Dictyostelium TACC reveals differential interactions with CP224 and unusual dynamics of Dictyostelium microtubules*. Cell Mol Life Sci, 2011. **68**(2): p. 275-87.
23. McIntosh, J.R., *Spindle structure and the mechanisms of chromosome movement*. Basic Life Sci, 1985. **36**: p. 197-229.
24. Dauderer, C., M. Schliwa, and R. Gräf, *Dictyostelium discoideum: a promising centrosome model system*. Biol Cell, 1999. **91**(4-5): p. 313-20.
25. Bettencourt-Dias, M. and D.M. Glover, *SnapShot: centriole biogenesis*. Cell, 2009. **136**(1): p. 188-188 e1.
26. Nigg, E.A. and T. Stearns, *The centrosome cycle: Centriole biogenesis, duplication and inherent asymmetries*. Nat Cell Biol, 2011. **13**(10): p. 1154-60.
27. Azimzadeh, J. and W.F. Marshall, *Building the centriole*. Curr Biol, 2010. **20**(18): p. R816-25.
28. Hatch, E. and T. Stearns, *The life cycle of centrioles*. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 2010. **75**: p. 425-31.
29. David, R., *Cell cycle: building the centriole*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2011. **12**(6): p. 342.
30. Nielsen, M.G., et al., *Axoneme-specific beta-tubulin specialization: a conserved C-terminal motif specifies the central pair*. Curr Biol, 2001. **11**(7): p. 529-33.
31. Lee, S. and K. Rhee, *CEP215 is involved in the dynein-dependent accumulation of pericentriolar matrix proteins for spindle pole formation*. Cell Cycle, 2010. **9**(4): p. 774-83.
32. Haren, L., T. Stearns, and J. Luders, *Plkl-dependent recruitment of gamma-tubulin complexes to mitotic centrosomes involves multiple PCM components*. PLoS One, 2009. **4**(6): p. e5976.
33. DICTENBERG, J.B., et al., *Pericentrin and gamma-tubulin form a protein complex and are organized into a novel lattice at the centrosome*. J Cell Biol, 1998. **141**(1): p. 163-74.
34. Fong, K.W., et al., *CDK5RAP2 is a pericentriolar protein that functions in centrosomal attachment of the gamma-tubulin ring complex*. Mol Biol Cell, 2008. **19**(1): p. 115-25.
35. Rehberg, M. and R. Gräf, *Dictyostelium EB1 is a genuine centrosomal component required for proper spindle formation*. Mol Biol Cell, 2002. **13**(7): p. 2301-10.
36. Euteneuer, U., et al., *Dictyostelium gamma-tubulin: molecular characterization and ultrastructural localization*. J Cell Sci, 1998. **111** (Pt 3): p. 405-12.
37. Blau-Wasser, R., et al., *CP250, a novel acidic coiled-coil protein of the Dictyostelium centrosome, affects growth, chemotaxis, and the nuclear envelope*. Mol Biol Cell, 2009. **20**(20): p. 4348-61.
38. Dauderer, C., M. Schliwa, and R. Gräf, *Dictyostelium centrin-related protein (DdCrp), the most divergent member of the centrin family, possesses only two EF hands and dissociates from the centrosome during mitosis*. Eur J Cell Biol, 2001. **80**(10): p. 621-30.
39. Rehberg, M., et al., *Dictyostelium LIS1 is a centrosomal protein required for microtubule/cell cortex interactions, nucleus/centrosome linkage, and actin dynamics*. Mol Biol Cell, 2005. **16**(6): p. 2759-71.
40. Kuhnert, O., et al., *Functional characterization of CP148, a novel key component for centrosome integrity in Dictyostelium*. Cell Mol Life Sci, 2012.

41. Schulz, I., et al., *Identification and cell cycle-dependent localization of nine novel, genuine centrosomal components in Dictyostelium discoideum*. Cell Motil Cytoskeleton, 2009. **66**(11): p. 915-28.
42. Gräf, R., *DdNek2, the first non-vertebrate homologue of human Nek2, is involved in the formation of microtubule-organizing centers*. J Cell Sci, 2002. **115**(Pt 9): p. 1919-29.
43. Schulz, I., et al., *Dictyostelium Sun1 is a dynamic membrane protein of both nuclear membranes and required for centrosomal association with clustered centromeres*. Eur J Cell Biol, 2009. **88**(11): p. 621-38.
44. Krüger, A., et al., *Characterization of NE81, the first lamin-like nucleoskeleton protein in a unicellular organism*. Mol Biol Cell, 2012. **23**(2): p. 360-70.
45. Ding, R., et al., *The spindle pole body of Schizosaccharomyces pombe enters and leaves the nuclear envelope as the cell cycle proceeds*. Mol Biol Cell, 1997. **8**(8): p. 1461-79.
46. Ueda, M., M. Schliwa, and U. Euteneuer, *Unusual centrosome cycle in Dictyostelium: correlation of dynamic behavior and structural changes*. Mol Biol Cell, 1999. **10**(1): p. 151-60.
47. De Souza, C.P., et al., *Partial nuclear pore complex disassembly during closed mitosis in Aspergillus nidulans*. Curr Biol, 2004. **14**(22): p. 1973-84.
48. Wei, J.H. and J. Seemann, *Unraveling the Golgi ribbon*. Traffic, 2010. **11**(11): p. 1391-400.
49. Schneider, N., et al., *Golvestin-GFP fusions as distinct markers for Golgi and post-Golgi vesicles in Dictyostelium cells*. Biol Cell, 2000. **92**(7): p. 495-511.
50. Tang, D., et al., *The ubiquitin ligase HACE1 regulates Golgi membrane dynamics during the cell cycle*. Nat Commun, 2011. **2**: p. 501.
51. Tang, D., et al., *Molecular mechanism of mitotic Golgi disassembly and reassembly revealed by a defined reconstitution assay*. J Biol Chem, 2008. **283**(10): p. 6085-94.
52. Neuhaus, E.M., W. Almers, and T. Soldati, *Morphology and dynamics of the endocytic pathway in Dictyostelium discoideum*. Mol Biol Cell, 2002. **13**(4): p. 1390-407.
53. Cosson, P. and T. Soldati, *Eat, kill or die: when amoeba meets bacteria*. Curr Opin Microbiol, 2008. **11**(3): p. 271-6.
54. Gabriel, D., et al., *The contractile vacuole network of Dictyostelium as a distinct organelle: its dynamics visualized by a GFP marker protein*. J Cell Sci, 1999. **112** (Pt 22): p. 3995-4005.
55. Bozzaro, S. and L. Eichinger, *The professional phagocyte Dictyostelium discoideum as a model host for bacterial pathogens*. Curr Drug Targets, 2011. **12**(7): p. 942-54.
56. Gerisch, G., et al., *GFP-golvestin constructs to study Golgi tubulation and post-Golgi vesicle dynamics in phagocytosis*. Eur J Cell Biol, 2004. **83**(6): p. 297-303.
57. Schulz, I., et al., *An improved method for Dictyostelium centrosome isolation*. Methods Mol Biol, 2006. **346**: p. 479-89.
58. Schulz, I., et al., *Identification and cell cycle-dependent localization of nine novel, genuine centrosomal components in Dictyostelium discoideum*. Cell Motil Cytoskeleton, 2009. **66**(11): p. 915-28.
59. Flory, M.R., et al., *Identification of a human centrosomal calmodulin-binding protein that shares homology with pericentrin*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(11): p. 5919-23.
60. Yap, K.L., et al., *Diversity of conformational states and changes within the EF-hand protein superfamily*. Proteins, 1999. **37**(3): p. 499-507.

61. Gräf, R., et al., *Regulated expression of the centrosomal protein DdCP224 affects microtubule dynamics and reveals mechanisms for the control of supernumerary centrosome number*. *Mol Biol Cell*, 2003. **14**(10): p. 4067-74.
62. Kaller, M., U. Euteneuer, and W. Nellen, *Differential effects of heterochromatin protein 1 isoforms on mitotic chromosome distribution and growth in Dictyostelium discoideum*. *Eukaryot Cell*, 2006. **5**(3): p. 530-43.
63. Xiong, H., et al., *Dictyostelium Sun-1 connects the centrosome to chromatin and ensures genome stability*. *Traffic*, 2008. **9**(5): p. 708-24.
64. Faix, J., et al., *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*, 2004. **32**(19): p. e143.
65. Schneider, N., et al., *A Lim protein involved in the progression of cytokinesis and regulation of the mitotic spindle*. *Cell Motil Cytoskeleton*, 2003. **56**(2): p. 130-9.
66. Gerisch, G., *Self-organizing actin waves that simulate phagocytic cup structures*. *PMC Biophys*, 2010. **3**(1): p. 7.
67. Rauchenberger, R., et al., *Coronin and vacuolin identify consecutive stages of a late, actin-coated endocytic compartment in Dictyostelium*. *Curr Biol*, 1997. **7**(3): p. 215-8.
68. Lefkir, Y., et al., *The AP-1 clathrin-adaptor is required for lysosomal enzymes sorting and biogenesis of the contractile vacuole complex in Dictyostelium cells*. *Mol Biol Cell*, 2003. **14**(5): p. 1835-51.
69. Gräf, R., C. Dauderer, and M. Schliwa, *Cell cycle-dependent localization of monoclonal antibodies raised against isolated Dictyostelium centrosomes*. *Biol Cell*, 1999. **91**(6): p. 471-7.
70. Ma, S., et al., *Dynein intermediate chain mediated dynein-dynactin interaction is required for interphase microtubule organization and centrosome replication and separation in Dictyostelium*. *J Cell Biol*, 1999. **147**(6): p. 1261-74.
71. Gräf, R., C. Dauderer, and M. Schliwa, *Dictyostelium DdCP224 is a microtubule-associated protein and a permanent centrosomal resident involved in centrosome duplication*. *J Cell Sci*, 2000. **113** (Pt 10): p. 1747-58.
72. Brito, D.A., et al., *Pushing forces drive the comet-like motility of microtubule arrays in Dictyostelium*. *Mol Biol Cell*, 2005. **16**(7): p. 3334-40.
73. Yingling, J., et al., *Neuroepithelial stem cell proliferation requires LIS1 for precise spindle orientation and symmetric division*. *Cell*, 2008. **132**(3): p. 474-86.
74. Grishchuk, E.L., I.S. Spiridonov, and J.R. McIntosh, *Mitotic chromosome biorientation in fission yeast is enhanced by dynein and a minus-end-directed, kinesin-like protein*. *Mol Biol Cell*, 2007. **18**(6): p. 2216-25.
75. Gable, A., et al., *Dynamic reorganization of Eg5 in the mammalian spindle throughout mitosis requires dynein and TPX2*. *Mol Biol Cell*, 2012.
76. Meyer, I., O. Kuhnert, and R. Gräf, *Functional analyses of lissencephaly-related proteins in Dictyostelium*. *Semin Cell Dev Biol*, 2011. **22**(1): p. 89-96.
77. Vinogradova, M.V., et al., *Structural dynamics of the microtubule binding and regulatory elements in the kinesin-like calmodulin binding protein*. *J Struct Biol*, 2008. **163**(1): p. 76-83.
78. Friedman, D.B., et al., *The 110-kD spindle pole body component of Saccharomyces cerevisiae is a phosphoprotein that is modified in a cell cycle-dependent manner*. *J Cell Biol*, 1996. **132**(5): p. 903-14.
79. Wang, Z., et al., *Conserved motif of CDK5RAP2 mediates its localization to centrosomes and the Golgi complex*. *J Biol Chem*, 2010. **285**(29): p. 22658-65.
80. Karsenti, E. and I. Vernos, *The mitotic spindle: a self-made machine*. *Science*, 2001. **294**(5542): p. 543-7.

81. Zheng, Y., *G protein control of microtubule assembly*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2004. **20**: p. 867-94.
82. Rieder, C.L., S. Faruki, and A. Khodjakov, *The centrosome in vertebrates: more than a microtubule-organizing center*. Trends Cell Biol, 2001. **11**(10): p. 413-9.
83. Conduit, P.T., et al., *Centrioles regulate centrosome size by controlling the rate of Cnn incorporation into the PCM*. Curr Biol, 2010. **20**(24): p. 2178-86.
84. Kraemer, N., et al., *What's the hype about CDK5RAP2?* Cell Mol Life Sci, 2011. **68**(10): p. 1719-36.
85. Lucas, E.P. and J.W. Raff, *Maintaining the proper connection between the centrioles and the pericentriolar matrix requires Drosophila centrosomin*. J Cell Biol, 2007. **178**(5): p. 725-32.
86. Delaval, B. and S.J. Doxsey, *Pericentrin in cellular function and disease*. J Cell Biol, 2010. **188**(2): p. 181-90.
87. Starr, D.A. and H.N. Fridolfsson, *Interactions between nuclei and the cytoskeleton are mediated by SUN-KASH nuclear-envelope bridges*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2010. **26**: p. 421-44.
88. T. KITANISHI, H.S., and Y. FuKuI*, *Disruption of Microtubules and Retardation of Development of Dictyostelium with Ethyl N-Phenylcarbamate and Thiabendazole*. PROTOPLASMA, 1983. **Protoplasma** (120): p. 185--196.
89. Kastner, P.M., M. Schleicher, and A. Müller-Taubenberger, *The NDR family kinase NdrA of Dictyostelium localizes to the centrosome and is required for efficient phagocytosis*. Traffic, 2011. **12**(3): p. 301-12.
90. Sutterlin, C. and A. Colanzi, *The Golgi and the centrosome: building a functional partnership*. J Cell Biol, 2010. **188**(5): p. 621-8.
91. Lopez-Sanchez, I., M. Sanz-Garcia, and P.A. Lazo, *Plk3 interacts with and specifically phosphorylates VRK1 in Ser342, a downstream target in a pathway that induces Golgi fragmentation*. Mol Cell Biol, 2009. **29**(5): p. 1189-201.
92. Colanzi, A., et al., *The Golgi mitotic checkpoint is controlled by BARS-dependent fission of the Golgi ribbon into separate stacks in G2*. EMBO J, 2007. **26**(10): p. 2465-76.
93. Wang, Y.Z., et al., *VCIP135 acts as a deubiquitinating enzyme during p97-p47-mediated reassembly of mitotic Golgi fragments (vol. 164, Pg. 973, 2004)*. Journal of Cell Biology, 2004. **166**(3): p. 433-433.
94. Wang, Y.Z., et al., *VCIP135 acts as a deubiquitinating enzyme during p97-p47-mediated reassembly of mitotic Golgi fragments*. Journal of Cell Biology, 2004. **164**(7): p. 973-978.
95. Matson, D.R. and P.T. Stukenberg, *Spindle poisons and cell fate: a tale of two pathways*. Mol Interv, 2011. **11**(2): p. 141-50.
96. Brito, D.A. and C.L. Rieder, *Mitotic checkpoint slippage in humans occurs via cyclin B destruction in the presence of an active checkpoint*. Curr Biol, 2006. **16**(12): p. 1194-200.
97. Tresse, E., et al., *Autophagy and autophagic cell death in Dictyostelium*. Methods Enzymol, 2008. **451**: p. 343-58.
98. Lee, K., A.E. Kenny, and C.L. Rieder, *Caspase activity is not required for the mitotic checkpoint or mitotic slippage in human cells*. Mol Biol Cell, 2011. **22**(14): p. 2470-9.
99. Tillement, V., et al., *Spindle assembly defects leading to the formation of a monopolar mitotic apparatus*. Biol Cell, 2009. **101**(1): p. 1-11.
100. Leidel, S., et al., *SAS-6 defines a protein family required for centrosome duplication in C-elegans and in human cells*. Nature Cell Biology, 2005. **7**(2): p. 115-U19.

101. Westphal, M., et al., *Microfilament dynamics during cell movement and chemotaxis monitored using a GFP-actin fusion protein*. *Curr Biol*, 1997. **7**(3): p. 176-83.
102. Faix, J., et al., *Recruitment of cortexillin into the cleavage furrow is controlled by Rac1 and IQGAP-related proteins*. *EMBO J*, 2001. **20**(14): p. 3705-15.
103. Hestermann, A. and R. Gräf, *The XMAP215-family protein DdCP224 is required for cortical interactions of microtubules*. *BMC Cell Biol*, 2004. **5**: p. 24.
104. Malchow, D., et al., *Membrane-bound cyclic AMP phosphodiesterase in chemotactically responding cells of Dictyostelium discoideum*. *Eur J Biochem*, 1972. **28**(1): p. 136-42.
105. Williams, K.L. and P.C. Newell, *A genetic study of aggregation in the cellular slime mould Dictyostelium discoideum using complementation analysis*. *Genetics*, 1976. **82**(2): p. 287-307.
106. Raper, K.B., *Dictyostelium discoideum, a new species of slime mold from decaying forest leaves*. *Journal of Agricultural Research*, 1935. **50**: p. 0135-0147.
107. Kyhse-Andersen, J., *Electroblotting of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose*. *J Biochem Biophys Methods*, 1984. **10**(3-4): p. 203-9.
108. Sambrook, J. and D.W. Russell, *Molecular cloning : a laboratory manual*. 3rd ed. 2001, Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
109. Schliwa, M. and J. van Blerkom, *Structural interaction of cytoskeletal components*. *J Cell Biol*, 1981. **90**(1): p. 222-35.
110. Fukui, Y., S. Yumura, and T.K. Yumura, *Agar-overlay immunofluorescence: high-resolution studies of cytoskeletal components and their changes during chemotaxis*. *Methods Cell Biol*, 1987. **28**: p. 347-56.
111. Samereier, M., et al., *Live cell-imaging techniques for analyses of microtubules in Dictyostelium*. *Methods Cell Biol*, 2010. **97**: p. 341-57.

Abkürzungen

APS	Ammoniumperoxodisulfat
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat
cAMP	cyclisches Adenosin Monophosphat
cDNA	komplementäre DNA
gDNA	genomische DNA
kDa	kilo-Dalton
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
Dd	<i>Dictyostelium discoideum</i>
DMSO	Dimethylsulfoxide
DTT	Dithiothreitol
monoSP& biSP	monopolare Spindel bipolare Spindel
MT	Mikrotubuli
MTOC	Microtubuli-organisierendes Zentrum
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
NHS	N-hydroxysuccinimid
PAA	Poly-Acrylamid-Gel
PSF	Punktspreizfunktion („point spread function“)
rpm	Umdrehungen pro Minute („revolutions per minute“)
RT-PCR	Reverse transcription polymerase chain reaction
SPB	Spindelpolkörper
siRNA	Small interfering RNA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
UTR	untranslatierte Region
WT	Wildtyp

Danksagungen

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Ralph Gräf für die Bereitstellung des sehr interessanten Arbeitsthemas und dem sehr gut ausgestatteten Arbeitsplatz. Für die Unterstützung bei Fragen sowie Problemen jeglicher Art, den Kaffee-Pad-Spenden und auch für alles Andere, was nicht unbedingt mit der Arbeit zu tun hatte, vielen Dank Ralph!

Natürlich darf in diesem Zusammenhang Frau Dr. Irene Meyer nicht vergessen werden. Ohne sie hätte ich mich hier nicht so schnell eingearbeitet und die neuen Methoden kennengelernt. Ein großes DANKE natürlich auch für das Lesen meiner Manuskripte.

Für die Bereitschaft meine Dissertation zu begutachten möchte ich mich bei Prof. Dr. Bernd Walz, Prof. Dr. Markus Maniak und PD Dr. Annette Müller-Taubenberger bedanken!

Natürlich muss auch der Rest der Arbeitsgruppe (Anita, Anne, Belinda, Carmen, Matthias, Petros, Sandra, Sascha, Tatjana) erwähnt werden, also vielen Dank an die gesamte AG Zellbiologie für das angenehme Arbeitsklima. Vielen Dank auch für die netten Kaffeerunden am Nachmittag, die für mich, vor allem während meiner Schreiberei, eine sehr gute Auszeit waren. Petros, dir muss ich aber nochmal einen Extra-danke für dein Korrekturlesen aussprechen! Für die großartige Betreuung bei allen Angelegenheiten in der Elektronenmikroskopie danke ich Prof. Dr. Otto Baumann!

Bei diesen ganzen Lobeshymnen, darf ich natürlich meine Freundin Marina (du musstest ja meine Launen ertragen, vor allem wenn ich Hunger hatte☺) und meine Eltern – ohne die das Alles so ohne weiteres nicht möglich gewesen wäre – nicht vergessen. Vielen Dank dafür!