

Institut für Biochemie und Biologie

Abteilung Zellbiologie

**Molekulare Charakterisierung von CP75,
einem neuen centrosomalen Protein in
*Dictyostelium discoideum***

Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

Vorgelegt der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität Potsdam

von

Tatjana Peter



Online veröffentlicht auf dem
Publikationsserver der Universität Potsdam:
URN urn:nbn:de:kobv:517-opus4-96472
<http://nbn-resolving.de/urn:nbn:de:kobv:517-opus4-96472>

Ehrenwörtliche Versicherung

Hiermit erkläre ich, dass die vorliegende Arbeit selbstständig und ausschließlich mit angegebenen Mitteln angefertigt wurde und an keiner anderen Hochschule angereicht worden ist.

Tatjana Peter

Potsdam, März 2016

Wissenschaftliche Beiträge

Vortrag

Annual International *Dictyostelium* Meeting in Madrid (2012)

Tatjana Peter, Anne Krüger, Irene Meyer, Ralph Gräf

Molecular and microscopic characterization of CP75, a novel *Dictyostelium* centrosome protein

Publikation

“A lamin in lower eukaryotes?”

Petros Batsios, Tatjana Peter, Otto Baumann, Reimer Stick, Irene Meyer and Ralph Gräf.

Nucleus. 2012 May 1;3(3):237-43

Poster

1. 38. Jahrestagung der DGZ in Köln (2015)

Tatjana Peter, Ralph Gräf, Irene Meyer

Functional analyses of centrosome-associated protein CP75 in *Dictyostelium discoideum*

2. 35. Jahrestagung der DGZ in Dresden (2012)

Tatjana Peter, Anne Krüger, Ralph Gräf, Irene Meyer

Molecular and microscopic characterization of CP75, a novel *Dictyostelium* centrosome protein

Zusätzliches Material auf der beigefügten CD

Film 1: GFP-Ddlim Δ coli + CytA

Film 2: GFP-CP75O/E + CytA

Film 3: CP75-RNAi

Film 4: GFP-CP75 FRAP

Die CD enthält eine digitale Kopie dieser Arbeit.

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS

ZUSAMMENFASSUNG	I
SUMMARY	III
1 EINLEITUNG	1
1.1 Der Modellorganismus <i>Dictyostelium discoideum</i>	1
1.2 Centrosomen und Spindelbildung	2
1.3 Mikrotubuli	4
1.3.1 Detyrosinierung/Tyrosinierung von Tubulin	5
1.4 Aktin-Cytoskelett	6
1.5 Ziele der Arbeit	7
2 ERGEBNISSE	8
2.1 Struktur und Sequenzanalyse von CP75	8
2.2 Untersuchung der subzellulären Lokalisation von CP75 mit Hilfe des polyklonalen Antikörpers	8
2.2.1 Die Lokalisation des endogenen CP75 ist abhängig von den Mitosephasen	11
2.2.2 CP75 ist ein centrosomales Protein der Core-Region	12
2.3 Untersuchung von GFP-CP75	13
2.3.1 Überexpression von GFP-CP75 hemmt die Expression des endogenen CP75	13
2.3.2 Überexpression von GFP-CP75 führt zum Verbleiben von GFP-CP75 am Centrosom während der Mitose und zur Kolo­kalisation mit F-Aktin	15

Inhaltsverzeichnis

2.3.3	GFP-CP75 zeigt keine signifikante Mobilität am Centrosom -----	19
2.4	Untersuchung von GFP-CP75 Deletionsmutanten -----	19
2.4.1	GFP-CP75-C lokalisiert während des ganzen Zellzyklus am Centrosom und am Zellcortex -----	20
2.4.2	Die centrosomale Lokalisation von GFP-CP75-N ist abhängig von den Mitosephasen -----	21
2.4.3	Expression von GFP-CP75-N führt zur Bildung verlängerter Centrosomen -----	22
2.4.4	Expression von GFP-CP75-N führt zur Bildung überzähliger Centrosomen -----	25
2.5	Funktionelle Untersuchung von CP75 -----	25
2.5.1	CP75-RNAi führt zur Bildung überzähliger Centrosomen-----	27
2.5.2	CP75-Knockdown führt zur Akkumulation detyrosinierter Mikrotubuli -	29
2.5.3	Detyrosinierte Mikrotubuli sind resistent gegen Thiabendazol (TBZ) ----	31
2.5.4	CP75-RNAi-Zellen haben Probleme bei der Spindelbildung-----	32
2.6	Untersuchung einer potentiellen Plk-Phosphorylierungsstelle in CP75 -----	34
2.6.1	GFP-CP75-Plk-S143A lokalisiert am Centrosom während der Mitose ---	36
2.6.2	Nichtphosphorylierbare Punktmutation führt zur Akkumulation von detyrosinierten Mikrotubuli -----	38
2.6.3	GFP-CP75-Plk-S143A zeigt überzählige Centrosomen und starke Defekte in der Cyto- und Karyokinese-----	39
2.7	Identifizierung der potentiellen Interaktionspartner von CP75 -----	40
2.7.1	BioID-Methode -----	40
2.7.2	CP75 interagiert mit drei weiteren Core-Proteinen des Centrosoms-----	43

Inhaltsverzeichnis

2.7.3	CP75-Knockdown hat keinen Einfluss auf die centrosomale Lokalisation seiner Interaktionspartner-----	45
2.7.4	CP75 zeigt keine direkte Interaktion mit Aktin-----	46
3	DISKUSSION-----	48
3.1	CP75 ist ein Bestandteil der inneren Lage der Core-Struktur -----	48
3.2	Regulation von CP75-----	48
3.3	Lokalisation von CP75 am Zellcortex -----	52
3.4	Funktion von CP75 in der Zelle -----	53
3.5	Die Rolle von CP75 bei der posttranslationalen Modifikation von Tubulin-----	55
4	MATERIAL UND METHODEN -----	58
4.1	Material -----	58
4.1.1	Chemikalien und Antibiotika -----	58
4.1.2	Antikörper -----	58
4.1.3	Puffer und Lösungen -----	59
4.1.4	Plasmide -----	60
4.1.5	Bakterien und <i>Dictyostelium discoideum</i> Stämme -----	61
4.1.6	Software und Online-Datenbanken-----	61
4.2	Molekularbiologische Methoden -----	61
4.2.1	Verwendete Oligonukleotide-----	61
4.2.2	Agarosegelelektrophorese -----	62
4.2.3	DNA Extraktion aus Agarosegelen-----	63

Inhaltsverzeichnis

4.2.4	Mini-Präparation von Plasmid DNA aus <i>E. coli</i> -----	63
4.2.5	Midi-Präparation von Plasmid DNA aus <i>E. coli</i> -----	63
4.2.6	Präparation genomischer DNA aus <i>Dictyostelium</i> -----	64
4.2.7	Bestimmung der DNA Konzentration -----	64
4.2.8	Polymerase-Kettenreaktion (PCR) -----	64
4.2.9	<i>Overlap-Extension-PCR</i> -----	65
4.2.10	Verdau von DNA mit Restriktionsenzymen -----	66
4.2.11	Ligation und Transformation von DNA -----	66
4.2.12	Konstruktion der verwendeten Plasmide -----	66
4.2.13	Herstellung chemisch kompetenter Zellen -----	68
4.2.14	Transformation von <i>Dictyostelium</i> Zellen-----	68
4.3	Biochemische Methoden-----	70
4.3.1	Gewinnung von Gesamtzellextrakten aus <i>Dictyostelium</i> Zellen -----	70
4.3.2	Methanol-Chloroform Proteinpräzipitation -----	70
4.3.3	Amidoschwarz-Test zur Bestimmung der Proteinkonzentration -----	70
4.3.4	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese -----	71
4.3.5	Coomassie Färbung von SDS-Gelen -----	72
4.3.6	Western Blot und Immunfärbung-----	72
4.3.7	Expression und Aufreinigung von MBP-Fusionsproteinen -----	73
4.3.8	Aufreinigung von Antikörpern-----	74
4.3.9	Isolierung von <i>Dictyostelium</i> Centrosomen-----	75

Inhaltsverzeichnis

4.3.10	BioID -----	76
4.4	Zellbiologische Methoden -----	77
4.4.1	Kultivierung und Konservierung von <i>Escherichia coli</i> -----	77
4.4.2	Kultivierung und Konservierung von <i>Dictyostelium discoideum</i> -----	78
4.4.3	Fixierung und indirekte Immunfluoreszenz von <i>Dictyostelium</i> -----	78
4.4.4	Weitfeldmikroskopie -----	79
4.4.5	Konfokalmikroskopie -----	79
5	LITERATURVERZEICHNIS -----	81
	ABKÜRZUNGEN -----	89
	LEBENS LAUF -----	91
	DANKSAGUNG -----	93

Zusammenfassung

Das Centrosom ist ein Zellkern-assoziiertes Organell, das nicht von einer Membran umschlossen ist. Es spielt eine wichtige Rolle in vielen Mikrotubuli-abhängigen Prozessen wie Organellenpositionierung, Zellpolarität oder die Organisation der mitotischen Spindel. Das Centrosom von *Dictyostelium* besteht aus einer dreischichtigen Core-Struktur umgeben von einer Corona, die Mikrotubuli-nukleierende Komplexe enthält. Die Verdoppelung des Centrosoms in *Dictyostelium* findet zu Beginn der Mitose statt. In der Prophase vergrößert sich die geschichtete Core-Struktur und die Corona löst sich auf. Anschließend trennen sich die beiden äußeren Lagen der Core-Struktur und bilden in der Metaphase die beiden Spindelpole, die in der Telophase zu zwei vollständigen Centrosomen heranreifen. Das durch eine Proteom-Analyse identifizierte Protein CP75 lokalisiert am Centrosom abhängig von den Mitosephasen. Es dissoziiert von der Core-Struktur in der Prometaphase und erscheint an den Spindelpolen in der Telophase wieder. Dieses Verhalten korreliert mit dem Verhalten der mittleren Lage der Core-Struktur in der Mitose, was darauf hinweist, dass CP75 eine Komponente dieser Schicht sein könnte. Die FRAP-Experimente am Interphase-Centrosom zeigen, dass GFP-CP75 dort nicht mobil ist. Das deutet darauf hin, dass das Protein wichtige Funktionen im Strukturerehalt der centrosomalen Core-Struktur übernehmen könnte. Sowohl die C- als auch die N-terminale Domäne von CP75 enthalten centrosomale Targeting-Domäne. Als GFP-Fusionsproteine (GFP-CP75-N und -C) lokalisieren die beiden Fragmente am Centrosom in der Interphase. Während GFP-CP75-C in der Mitose am Centrosom verbleibt, verschwindet GFP-CP75-N in der Metaphase und kehrt erst in der späten Telophase zurück. GFP-CP75-C und GFP-CP75O/E kolokalisieren mit F-Aktin am Zellcortex, zeigen aber keine Interaktion mit Aktin mit der BioID-Methode. Die N-terminale Domäne von CP75 enthält eine potentielle Plk1-Phosphorylierungssequenz. Die Überexpression der nichtphosphorylierbaren Punktmutante (GFP-CP75-Plk-S143A) ruft verschiedene Phänotypen wie verlängerte oder überzählige Centrosomen, vergrößerte Zellkerne und Anreicherung von detyrosinierten Mikrotubuli hervor. Die ähnlichen Phänotypen konnten auch bei GFP-CP75-N und CP75-RNAi beobachtet werden. Der Phänotyp der detyrosinierten Mikrotubuli bringt erstmals den Beweis dafür, dass

in *Dictyostelium* posttranslationale Modifikation an Tubulinen stattfindet. Außerdem zeigten CP75-RNAi-Zellen Defekte in der Organisation der mitotischen Spindel. Mittels BioID-Methode konnten drei potentielle Interaktionspartner von CP75 identifiziert werden. Diese drei Proteine CP39, CP91 und Cep192 sind ebenfalls Bestandteile des Centrosoms.

Summary

The centrosome is a nonmembranous, nucleus-associated organelle. It plays crucial roles in a variety of microtubule-dependent processes, such as organelle positioning, cell polarization and mitotic spindle organization. The *Dictyostelium* centrosome consists of a core structure with three major layers, surrounded by a corona containing microtubule-nucleation complexes. *Dictyostelium* centrosome replication starts at the onset of mitosis. In prophase, the core structure enlarges and the corona disappears. Afterwards, the core structure splits and the outer layers form two spindle poles maturing to two new, complete centrosomes in telophase. CP75 is one of nine novel proteins identified in a centrosomal proteome analysis. Endogenous CP75 localizes to the centrosome in a cell cycle-dependent manner. It dissociates from the core structure in early prometaphase and reappears at spindle poles in telophase. Since this pattern fits to the disappearance and reappearance of the central layer of the core structure, this indicates that CP75 is a constituent of this layer. During interphase FRAP experiments reveal that GFP-CP75 exhibits no mobility at the centrosome. This indicates a role in structural maintenance of the centrosomal core. Both the C- and N-terminal domains of CP75 contain a centrosomal targeting domain. Fused to GFP (GFP-CP75-N and -C) both fragments localized to the centrosome in interphase, but only GFP-CP75-N disappears from the centrosome during mitosis. GFP-CP75-C and GFP-CP75O/E also colocalized with F-actin at the cell cortex. But it shows no direct interaction with actin in BioID. The N-terminal domain of CP75 contains Plk1 phosphorylation sites. Overexpression of phosphorylation site-deficient mutant of GFP-CP75 (GFP-CP75-Plk-S143A) causes different phenotypes like enlarged and disrupted nuclei, enlarged and supernumerary centrosomes and detyrosinated microtubules. A very similar phenotype was observed upon overexpression of GFP-CP75-N and upon knockdown of CP75 expression by RNAi. The phenotype of detyrosinated microtubules for the first time shows that posttranslational modification of Tubulin takes place in *Dictyostelium*. Live cell imaging showed that lack of CP75 caused defect in spindle formation. CP75 interacts in BioID with CP39, CP91 and Cep192, three other components of the centrosome.

1 Einleitung

1.1 Der Modellorganismus *Dictyostelium discoideum*

Dictyostelium discoideum ist ein Vertreter der Amoebozoa und wurde 1935 durch den US-amerikanischen Biologen Kenneth Bryan Raper entdeckt und isoliert (Raper, 1935). Das natürliche Habitat der 10-20 µm großen Amöbe ist der Waldboden, wo sie sich von Bakterien ernährt. Im vegetativen Zustand ist *D. discoideum* ein Einzeller, der sich durch mitotische Zellteilung vermehrt. Durch Nahrungsmangel wird cAMP gesteuerte Aggregation und Zelldifferenzierung des amöboiden Einzelllers ausgelöst. Die Zellaggregate von bis zu 10⁵ Amöben bilden sogenannte *slugs*, die sich kriechend fortbewegen können (Eichinger and Rivero, 2006). Ein *slug* entwickelt sich durch Zelldifferenzierung zu einem Fruchtkörper, der aus keimungsfähigen Sporenzellen und Stielzellen besteht. Diese Zellen sterben nach der vollständigen Bildung des Fruchtkörpers ab. Die Tatsache, dass die einzellige Amöbe in der Lage ist sich zu einem multizellulären Organismus zu entwickeln und dabei etwa 20% der Zellen für die Ausbildung des Stiels opfert, gab *D. discoideum* die Bezeichnung „soziale Amöbe“ (Fortunato *et al.*, 2003).

Der Modellorganismus *D. discoideum* eignet sich gut für die Erforschung grundlegender zellulärer Prozesse wie Chemotaxis, Cytokinese, Signaltransduktion, Zellbewegung und Zelldifferenzierung (Chisholm and Firtel, 2004; King and Insall, 2009; Robinson and Spudich, 2004; Weijer, 2009). Von großem Vorteil ist seine einfache Kultivierung. Die Zellen wachsen axenisch in einem einfachen und günstigen Medium in Schüttelkultur, Zellkulturflaschen oder in Anwesenheit von Bakterien auf Agar-Platten. Die Generationszeit in axenischem Flüssigmedium beträgt ca. 10 Stunden, auf Agar-Platten mit Bakterien ca. 4 Stunden (Eichinger, 2003). Es stehen viele biologische Techniken zur Verfügung, die in *D. discoideum* erfolgreich etabliert wurden. Dazu gehören unter anderem Überexpression, Verminderung der Expression durch RNAi und Ausschalten von Genen durch das Knockout-Verfahren. Außerdem gibt es eine große Auswahl an verschiedenen Tags, die für Proteinexpressionen, Protein-Interaktionsstudien und fluoreszierende Fusionsproteine genutzt werden (Eichinger and Rivero, 2006). Mit der Sequenzierung des haploiden und aus sechs Chromosomen bestehenden Genoms von *D. discoideum* wurde eine solide

Grundlage für proteomische Analysen geschaffen (Eichinger *et al.*, 2005). Viele Proteine von *D. discoideum* weisen Homologien zu tierischen Proteinen auf, darunter zahlreiche, die mit humanen Krankheiten in Verbindung gebracht werden. Aus diesem Grund wurde *D. discoideum* bei der Untersuchung humaner Krankheiten, wie zum Beispiel Lissenzephalie oder Erkrankungen der weißen Blutkörperchen, eingesetzt (Rehberg *et al.*, 2005; Williams *et al.*, 2006). Auch für die Centrosomenforschung erlangte der Modellorganismus an Bedeutung, nachdem eine Methode zur Centrosomenisolation etabliert werden konnte (Gräf *et al.*, 1998; Schulz *et al.*, 2006). Durch umfangreiche Proteomanalysen konnten viele Proteine des *Dictyostelium*-Centrosoms identifiziert werden, was eine gute Grundlage für die weitere Centrosomenforschung darstellt (Reinders *et al.*, 2006).

1.2 Centrosomen und Spindelbildung

Das Centrosom fungiert als Mikrotubuli-Organisationszentrum (MTOC) bei Eukaryoten und ist in viele zelluläre Prozesse wie Organisation der Kernteilungsspindel, Organellenpositionierung und Zellpolarität involviert. Das Centrosom ist ein membranfreies Organell, das sich in vegetativen Zellen ein Mal pro Zellzyklus verdoppelt. Es ist mit dem Zellkern assoziiert und befindet sich normalerweise in der Mitte der Zelle (Azimzadeh, 2014). Die Evolution brachte unterschiedliche Centrosomen-Typen hervor, die sich in Form und Größe unterscheiden (s. Abb.1 A). Der meist verbreitete Typ findet sich sowohl in tierischen Zellen als auch in begeißelten Algen und ist durch Centriolen gekennzeichnet, die in eine pericentrioläre Matrix (PCM) eingebettet sind. Die PCM enthält eine Vielzahl von Gerüstproteinen, die Mikrotubuli-Nukleationskomplexe binden. Bei Wirbeltieren bestehen Centriolen aus jeweils neun Mikrotubuli Triplets, die sich zylindrisch anordnen. In der G1-Phase besitzt das centrioläre Centrosom zwei Centriolen. In der S-Phase verdoppelt sich jedes Centriol und bildet damit ein Centriolen-Paar (Nigg and Stearns, 2011).

Demgegenüber stehen acentrioläre Centrosomen, wie man sie bei Pilzen und vielen Vertretern der Amoebozoa findet. Solche Centrosomen sind in der Evolution möglicherweise mehrfach unabhängig entstanden. Sie enthalten keine Centriolen dafür aber eine geschichtete Plaque-ähnliche Struktur (Gräf *et al.*, 2015). Das am besten untersuchte acentrioläre Centrosom ist der Spindelpolkkörper

Einleitung

von *Saccharomyces cerevisiae*. Es besteht im Wesentlichen aus drei aufeinander gestapelten Plaques und ist permanent in die Zellkernmembran integriert. Der Spindelpolkkörper organisiert sehr einfaches intranukleäres und extranukleäres Mikrotubuli Cytoskelett und ist damit für Zellkernpositionierung und Chromosomensegregation während der Mitose verantwortlich (Elserafy *et al.*, 2014). Das Centrosom von *D. discoideum* enthält ebenfalls eine geschichtete Core-Struktur, die aber zusätzlich von Corona umgeben ist. Corona stellt ein amorphes elektronendichtes Material dar und ist ein Äquivalent zu PCM. Anders als bei *S. cerevisiae* aber ähnlich wie bei *S. pombe* befindet sich das Centrosom von *D. discoideum* während der Interphase im Cytosol und wird in der Mitose in die Zellkernmembran integriert (Ding *et al.*, 1997; Gräf *et al.*, 2015). Mit der fortschreitenden Erforschung des *Dictyostelium*-Centrosoms wurden schon einige centrosomale Proteine identifiziert und näher charakterisiert. Darunter sind die Corona-Komponenten Centrin A, Lis1, EB1, TACC, CP224, CP248/250, CP148 und Proteine des γ Tubulin Komplexes (Blau-Wasser *et al.*, 2009; Dauderer and Gräf, 2002; Dauderer *et al.*, 2001; Euteneuer *et al.*, 1998; Gräf *et al.*, 2000; Kuhnert *et al.*, 2012b; Mana-Capelli *et al.*, 2010; Rehberg and Gräf, 2002; Rehberg *et al.*, 2005; Samereier *et al.*, 2010a). Zu den bekannten Proteinen der Core-Region gehören DdNek2(Gräf, 2002), CP55 (Kuhnert *et al.*, 2012a), CP44, CP91, CP39 (Putzler *et al.*, 2016; Schulz *et al.*, 2009b) und CP75, das mit dieser Arbeit charakterisiert werden konnte.

Der Centrosomen-Zyklus von *D. discoideum* wurde detailliert elektronenmikroskopisch analysiert (Ueda *et al.*, 1999). Die Verdopplung des Centrosoms in *D. discoideum* ist nicht wie in tierischen Zellen oder in Bäckerhefe mit der DNA Synthese synchronisiert. Die ersten Hinweise auf die Duplikation findet man am Übergang von der G2- zur M-Phase (s. Abb. 1 B). In der Prophase vergrößert sich die Core-Struktur, und die Corona, mit ihren Mikrotubuli-Nukleationskomplexen und den Interphase-Mikrotubuli, verschwindet. In der Prometaphase kommt es zum Auflösen der zentralen Schicht der Core-Struktur. Dabei trennen sich die beiden äußeren Lagen und lagern sich in die Kernhülle ein. *D. discoideum* weist eine eher geschlossene Form der Mitose mit weitgehend intakter Kernhülle auf (O'Day and Budniak, 2015). Die beiden äußeren Lagen, die in die Kernhülle integriert sind, bilden die Spindelpole. Von den Spindelpolen

Einleitung

ausgehend werden Spindelmikrotubuli gebildet. Der Abstand zwischen den Spindelpolen vergrößert sich bis sie sich schließlich in der Metaphase an den gegenüberliegenden Polen des Zellkerns einfinden. Mit der fortschreitenden Mitose beginnt der Faltungsprozess der Spindelpole, woraufhin die cytosolische Seite der Spindelpole innen liegt. Der Faltungsprozess ist in der Telophase abgeschlossen. Die Ausbildung der inneren Lage der Core-Struktur und der Corona vervollständigen das neue Centrosom. Somit erfolgt die Verdopplung des *Dictyostelium*-Centrosoms genauso wie bei centriolären Centrosomen der tierischen Zellen auf semikonservative Weise. Das bedeutet, dass beide Tochter-Centrosomen ein Teil des Mutter-Centrosoms enthalten (Gräf *et al.*, 2000).

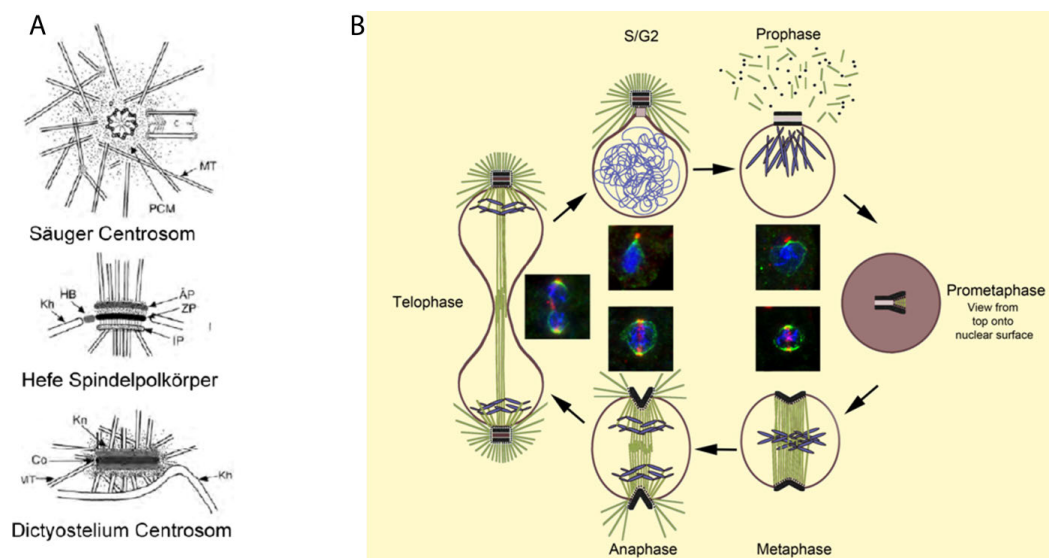


Abbildung 1: Die unterschiedlichen Centrosomen-Typen (A) und der Centrosomen-Zyklus von *Dictyostelium discoideum* (B). Abbildung modifiziert (Dauderer *et al.*, 1999; Gräf, 2009)

1.3 Mikrotubuli

Mikrotubuli gehören neben Aktin und Intermediärfilamenten zu den wichtigsten Komponenten des Cytoskeletts. Cytosolische Mikrotubuli sind an vielen zellulären Prozessen wie Organellenpositionierung, Formgebung der Zelle und der Zellbewegung beteiligt. Außerdem sind sie Bestandteile der komplexen zellulären Strukturen wie Centrosomen, Cilien und Flagellen. Eine wichtige Funktion der Mikrotubuli ist die Bildung der mitotischen Spindel und des Midbodys. Mikrotubuli sind röhrenförmige Strukturen mit einem Außendurchmesser von 25 nm. Ein einzelner Mikrotubulus ist in der Regel aus 13 Protofilamenten aufgebaut, die zusammen die Röhrenstruktur bilden. Die

Protofilamente bestehen aus Tubulin-Heterodimeren, die sich wiederum aus α - und β -Tubulin zusammensetzen (Linck and Stephens, 2007). Die Hauptrolle bei der Mikrotubuli-Nukleation spielt die ubiquitäre Tubulin-Isoform γ -Tubulin. Diese befindet sich am Minus-Ende jedes Mikrotubulus und bildet dort zusammen mit anderen Proteinen γ -Tubulin-Komplexe. Es sind zwei Typen dieser Komplexe bekannt: γ -TuRC und γ -TuSC. Der erste der beiden ist ein großer ringförmiger Komplex, der aus acht verschiedenen Proteinen (γ -Tubulin, GCP2, GCP3, GCP4, GCP5, GCP6, GCP7 und GCP8) besteht (Teixido-Travesa *et al.*, 2010). Der zweite ist ein kleiner Komplex bestehend aus γ -Tubulin, GCP2 und GCP3. Man findet beide γ -Tubulin-Komplexe sowohl in tierischen als auch in pflanzlichen Zellen. In Hefen und in *Dictyostelium* ist dagegen nur γ -TuSC vertreten (Daunderer and Gräf, 2002; Kollman *et al.*, 2011).

Mikrotubuli sind sehr heterogen bezüglich ihrer Länge und weisen eine hohe Dynamik auf, in dem sie einen ständigen Prozess der Polymerisation und Depolymerisation durchlaufen, der an GTP-Hydrolyse gekoppelt ist. Diese Eigenschaft, die eine große Vielfalt an Mikrotubuli Funktionen ermöglicht, wird durch Interaktion von Mikrotubuli mit anderen Proteinen beeinflusst. Dabei sind Kontrollmechanismen erforderlich, die durch posttranslationale Modifikationen geschaffen werden, wie z. Bsp. Acetylierung/Deacetylierung, Polyglutamylierung, Polyglycylierung, Detyrosinierung/Tyrosinierung, Palmitoylierung und Phosphorylierung. Diese Prozesse wurden ausführlich in tierischen Zellen untersucht und beschrieben (Janke and Bulinski, 2011). In *Dictyostelium* gab es bisher noch keine Untersuchungen darüber, ob Tubuline posttranslational modifiziert werden. Die vorliegende Arbeit gibt erste Hinweise darauf, dass auch in *Dictyostelium* posttranslationale Modifikationen an Tubulinen stattfinden könnten.

1.3.1 Detyrosinierung/Tyrosinierung von Tubulin

Der Detyrosinierungs-/Tyrosinierungszyklus gehört zu den am besten beschriebenen posttranslationalen Modifikationen von Mikrotubuli (Janke and Bulinski, 2011). Das Anhängen des C-terminalen Tyrosinrestes ans α -Tubulin wird durch das Enzym Tubulin-Tyrosin-Ligase (TTL) ATP- und Magnesiumionen-abhängig katalysiert (Raybin and Flavin, 1977). Die

Detyrosinierung wird durch eine immer noch unerforschte Carboxypeptidase katalysiert. Daraufhin kann das detyrosinierte Tubulin durch eine Deglutamylase zum $\Delta 2$ -Tubulin umgewandelt werden. Diese Form der Modifikation ist irreversibel und damit scheidet das $\Delta 2$ -Tubulin aus dem Detyrosinierungs-/Tyrosinierungszyklus aus (Paturle-Lafanechere *et al.*, 1991).

Im Allgemeinen haben posttranslationale Modifikationen eine erhebliche Auswirkung auf die Stabilität und Langlebigkeit von Mikrotubuli. Auch wenn die Detyrosinierung selbst nicht direkt stabilisierend auf Mikrotubuli wirkt, ist sie charakteristisch für langlebige stabile Mikrotubuli in vielen Zelltypen, weil die depolymerisierende Enzyme, in diesem Fall Kinesine der Kinesin-13-Gruppe, vorrangig tyrosinierte Mikrotubuli abbauen (Khawaja *et al.*, 1988; Peris *et al.*, 2009; Webster *et al.*, 1987). Auch die Rekrutierung von +TIPs (Mikrotubuli-Plus-Ende bindende Proteine) erfolgt vorrangig an tyrosinierten Tubulinen (Peris *et al.*, 2006). So fungiert das C-terminale Tyrosin an α -Tubulinen als eine Art *ON/OFF*-Signal für verschiedene Mikrotubuliregulatoren (Garnham and Roll-Mecak, 2012).

1.4 Aktin-Cytoskelett

Aktin ist ein hochkonserviertes globuläres Protein, das durch Polymerisation ATP-abhängig polare Aktinfilamente (F-Aktin) bildet. Das Aktin-Cytoskelett, das aus Aktin, seinen assoziierten Proteinen und Motorproteinen besteht, ist für die äußere Form der Zelle, Zellbewegung, intrazelluläre Transportprozesse und vieles mehr verantwortlich (Pollard and Cooper, 2009). Diese Vielzahl an Funktionen kommt durch eine hochdynamische Interaktion zwischen den Komponenten des Aktin-Cytoskeletts sowie seine ständige Reorganisation zustande. Die Anzahl der Aktingene variiert drastisch innerhalb der Eukaryoten. Während *Saccharomyces cerevisiae* nur ein Aktingen besitzt, sind es bei der Maus 35 und bei *Arabidopsis thaliana* 10 Aktingene. *D. discoideum* besitzt 17 Aktingene, die identisches Protein kodieren (Joseph *et al.*, 2008; McKinney and Meagher, 1998). Es ist schon viel über das Aktin-Cytoskelett von *D. discoideum* bekannt. Eine Vielzahl der Aktin-assoziierten Proteine wurde identifiziert und näher charakterisiert. Darunter sind der Arp2/3-Komplex und die *WASP-related* Proteine, die in die Aktin-Polymerisation und -Nukleation involviert sind, sowie DdLim, das unter

anderem eine wichtige Rolle bei der Cytokinese spielt, und einige Motorproteine, wie z.B. Myosin, die mit Aktin interagieren und in viele zelluläre Prozesse involviert sind (Noegel and Schleicher, 2000).

1.5 Ziele der Arbeit

Das Centrosom ist der größte Proteinkomplex der Zelle und ist in allen Organismengruppen, außer in höheren Pflanzen und Bakterien, vertreten. Obwohl sich die Morphologie des Centrosoms in verschiedenen Organismen erheblich unterscheidet, so sind seine Funktionen jedoch universal. Mit der Entdeckung von *Dictyostelium* als Modellorganismus hat sich der Einzeller neben Hefen und tierischen Zellen zum alternativen Modell in der Centrosomenforschung entwickelt. In einer großen Proteomstudie wurden viele potentielle centrosomale oder Centrosom-assoziierte Komponenten identifiziert (Reinders *et al.*, 2006). Neun dieser Proteine wurden bereits als echte centrosomale Proteine verifiziert. CP75 ist eines davon. Seine centrosomale Lokalisation wurde mit Hilfe eines GFP-Fusionsproteins nachgewiesen (Schulz *et al.*, 2009b). In der vorliegenden Arbeit erfolgte eine Charakterisierung des endogenen Proteins in Bezug auf seine subzelluläre Lokalisation und sein Verhalten während der Mitose. Außerdem wurden verschiedene Mutanten generiert, die Aufschluss über die möglichen Funktionen von CP75 geben sollten. Die Untersuchung der Funktionen des Proteins sowie die Identifikation seiner potentiellen Interaktionspartner mittels BioID-Methode sollten zum besseren Verständnis des Aufbaus der centrosomalen Core-Struktur beitragen

2 Ergebnisse

2.1 Struktur und Sequenzanalyse von CP75

Im Rahmen der Proteomanalyse an isolierten Centrosomen von *Dictyostelium* wurden 34 neuen Kandidaten für centrosomale Proteine identifiziert (Reinders *et al.*, 2006). Neun von diesen Proteinen, unter anderem auch CP75, wurden durch Lokalisationsstudien näher untersucht (Schulz *et al.*, 2009b).

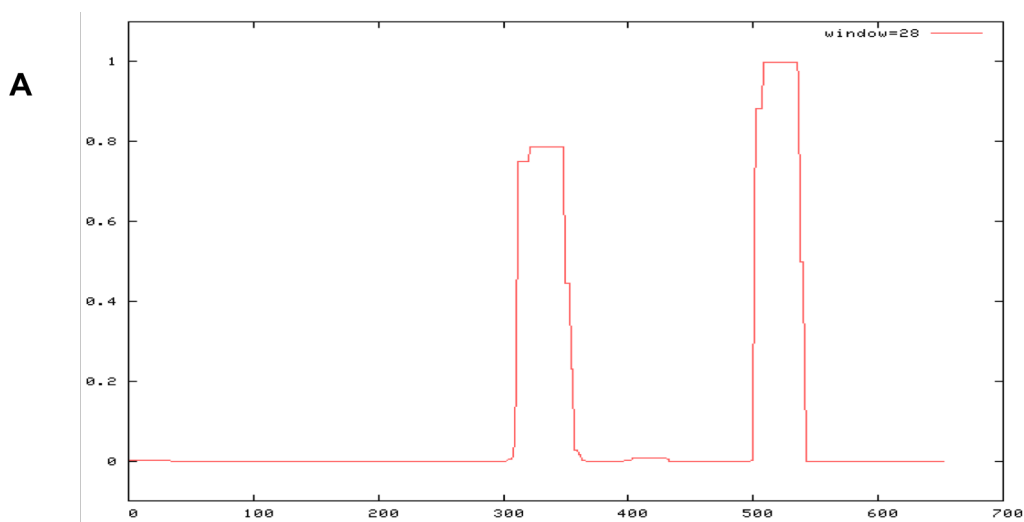
CP75 (DictyBase ID DDB_G0283111) ist 75,7 kDa groß und besteht aus 652 Aminosäuren. Durch die Analyse der Proteinsequenz mit dem Programm COILS (Lupas *et al.*, 1991) wurde eine *coiled-coil*-Domäne am C-terminalen Ende des CP75 an AS-Position 508-535 vorhergesagt (s. Abb. 2 A). Außerdem wurde eine Konsensussequenz für die *Polo-like*-Proteinkinase (Plk) am N-terminalen Ende mittels des Programms ELM (Dinkel *et al.*, 2015) vorhergesagt, die sich an AS-Position 140-146 befindet. Serin143 soll dabei spezifisch durch Plk phosphoryliert werden (s. Abb. 2 B). Der Vergleich der Aminosäuresequenzen mit dem Programm BLASTp ergab keine Homologien zu Proteinen anderer Organismengruppen. Innerhalb der Dictyostelidae weisen vier weitere *Dictyostelium*-Arten *Dictyostelium purpureum*, *Acytostelium subglobosum*, *Polysphondylium pallidum* und *Dictyostelium fasciculatum* Homologien zu CP75 auf.

2.2 Untersuchung der subzellulären Lokalisation von CP75 mit Hilfe des polyklonalen Antikörpers

Für die weiteren Untersuchungen des endogenen CP75 wurde ein polyklonaler Antikörper gegen das Protein generiert. Als Antigen für die Immunisierung zweier Kaninchen fungierte das N-terminale Fragment von CP75, bestehend aus 312 AS und fusioniert ans MBP (s. Abb. 3 A) (Anne Krüger, unveröffentlicht). Die Expression eines intakten, nicht degradierten Vollängenproteins in ausreichender Menge erwies sich als nicht möglich. Auch bei der Expression von MBP-CP75-N konnte Degradation des rekombinanten Proteins beobachtet werden, was aus der Gelfärbung ersichtlich ist (s. Abb. 3 A). Es konnte aber eine ausreichende Menge an Antigen für die Immunisierung aufgereinigt werden.

Ergebnisse

Das erhaltene Serum wurde über eine Affinitätschromatografie-Säule mit immobilisiertem MBP-CP75-N aufgereinigt und mittels Western Blot analysiert. Die dabei mit aufgereinigten anti-MBP-Antikörper stören bei Anwendungen im *Dictyostelium*-System allen Erfahrungen nach nicht (Ralph Gräf, unveröffentlicht). Der aufgereinigte Antikörper markierte im Western Blot eines Zelllysats das GFP-Fusionsprotein, das endogene jedoch nicht (s. Abb. 3 B und C). Mit isolierten Centrosomen als Probe konnte jedoch im Western Blot eine klare Bande bei ca. 95 kDa detektiert werden, die endogenes CP75 repräsentiert (s. Abb. 3 C). Das Ergebnis weicht zwar vom errechneten Molekulargewicht des Proteins von ca. 76 kDa ab, das Phänomen ist aber nicht ungewöhnlich und für solche *coiled-coil* reiche Proteinen wie Dynein und Tropomyosin bereits beschrieben worden (Dilbeck *et al.*, 1999).



B

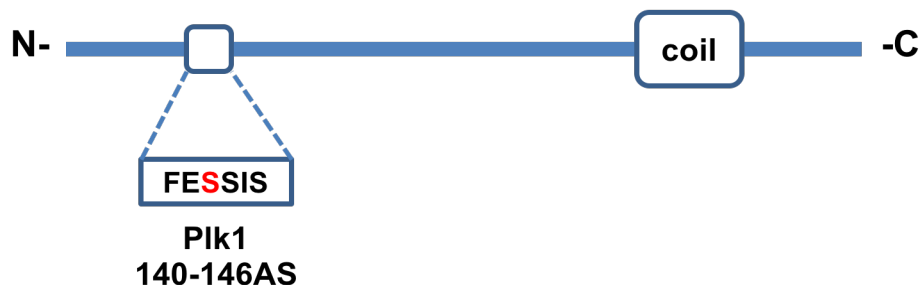


Abbildung 2: Strukturelle Eigenschaften von CP75

(A) Vorhersage möglicher *coiled-coil*-Domäne von CP75 basierend auf der Aminosäuresequenz. Die Ermittlung erfolgte durch das Programm COILS (www.ch.embnet.org) mit einer Fenstergröße von 28 AS. Die X-Achse zeigt die

Ergebnisse

Anzahl der Aminosäuren, die Y-Achse stellt die Wahrscheinlichkeit einer *coiled-coil*-Domäne dar. Wahrscheinlichkeit von 1 deutet auf eine *coiled-coil*-Domäne hin. (B) Schematische Darstellung von CP75. Die Untersuchung der Proteinsequenz mittels des Programms ELM ergab eine mögliche Konsensussequenz für die *Polo-like*-Proteinkinase (Plk1) an AS-Position 140-146. Serin143 (rot) soll dabei spezifisch phosphoryliert werden.

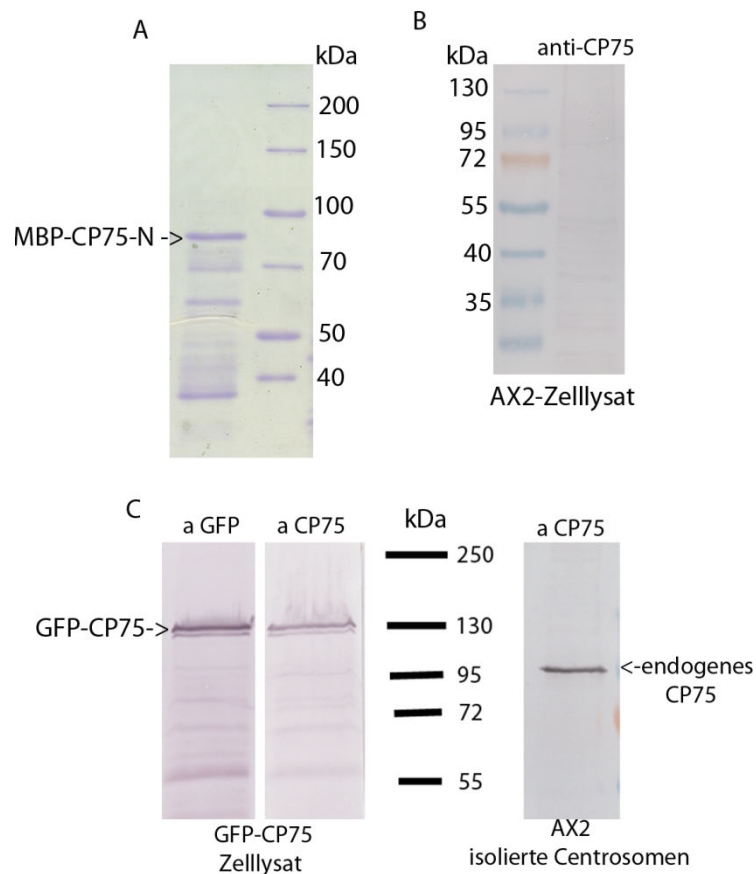


Abbildung 3: (A) Expression des N-terminalen Fragments von CP75 als MBP-Fusionsprotein. MBP-CP75-N wurde aufgereinigt und in SDS-PAGE analysiert. Die Färbung erfolgte mit Coomassie. (B, C) Western Blot Analyse der Spezifität von anti-CP75. (B) Der aufgereinigte Antikörper zeigte im AX2-Zelllysate keine spezifische Markierung. (C) Im GFP-CP75-Zelllysate markierte der anti-CP75 Antikörper GFP-CP75. Das endogene CP75 wurde erst bei isolierten Centrosomen sichtbar. Die Western Blot Färbungen erfolgten mit anti-CP75 (1:1000) und sekundären CIP-konjugierten Antikörper (*caly intestine alkaline phosphatase* von Sigma) (1:10000). Durch Nitroblau-Tetrazoliumchloride (NBT) und 5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat (BCIP) wurden die Banden visualisiert.

2.2.1 Die Lokalisation des endogenen CP75 ist abhängig von den Mitosephasen

Das Verhalten des endogenen CP75 während der Mitose wurde mittels Immunfluoreszenzmikroskopie mit anti-CP75 untersucht. Das endogene Protein zeigte ein Zellzyklus-reguliertes Verhalten. Während der Interphase und Prophase war ein klares Signal am Centrosom zu beobachten. In der Prometaphase spaltete sich das punktförmige Signal und es waren zwei dicht aneinander liegende Punkte zu sehen. Während der Metaphase und Anaphase konnte kein Signal an den Spindelpolen detektiert werden. Erst in der Telophase erschien es wieder (s. Abb. 4).

Ergebnisse

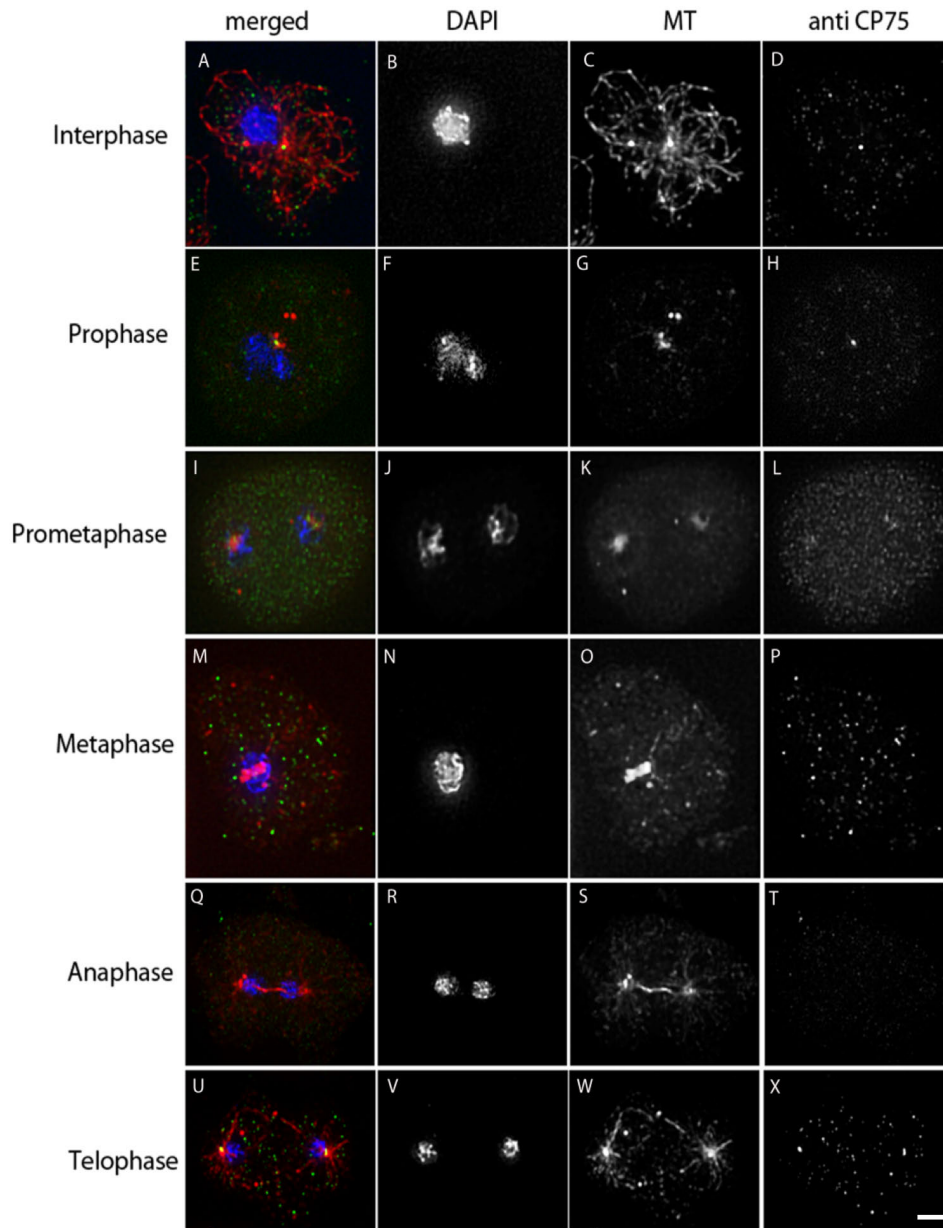


Abbildung 4: Das endogene CP75 lokalisiert am Centrosom abhängig von den Mitosephasen. AX2-Zellen wurden mit Methanol fixiert und mit anti-CP75 (grün) und anti Tubulin (MT, rot) markiert. DNA wurde mit DAPI (blau) gefärbt. Balken: 2 μm .

2.2.2 CP75 ist ein centrosomales Protein der Core-Region

Um die genaue centrosomale Lokalisation vom endogenen CP75 zu untersuchen, wurde Immunfluoreszenzmarkierung an isolierten Centrosomen durchgeführt. In Abbildung 5 ist ein punktförmiges Signal vom endogenen CP75 zu erkennen, das

Ergebnisse

vom ringförmigen Signal des Corona-Markers CP224 umgeben ist. Zusätzlich erfolgte die Analyse des CP75-Spots mit der *Plot-Profile*-Funktion von Image J. Im Diagramm ist das Signal für CP75 in grün dargestellt und zeigt ein Maximum entlang der Querschnittslinie durch das Centrosom. Das CP224-Signal ist in rot dargestellt und zeigt im Kurvenverlauf zwei Maxima, welche das CP75-Maximum begrenzen. Das Ergebnis deutet darauf hin, dass CP75 in der in die Corona eingebetteten centrosomalen Core-Region lokalisiert.

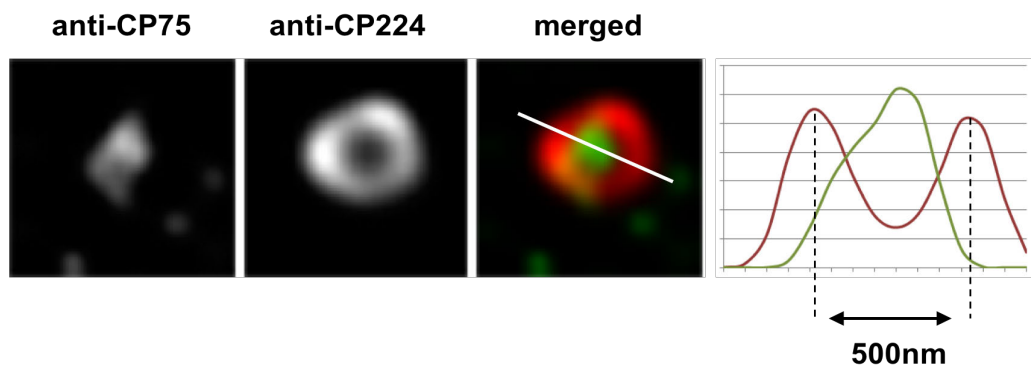


Abbildung 5 CP75 lokalisiert in der centrosomalen Core-Region. Isolierte Centrosomen wurden mit Methanol fixiert und mit anti-CP75 in grün und anti-CP224 in rot markiert. Das Plot rechts zeigt die Verteilung der Fluoreszenzintensität entlang des Centrosomenquerschnitts.

2.3 Untersuchung von GFP-CP75

2.3.1 Überexpression von GFP-CP75 hemmt die Expression des endogenen CP75

Bei der Erforschung von Funktionen eines zu untersuchenden Proteins können verschiedene Ansätze behilflich sein, unter anderem die Überexpression des Proteins in der Zelle. Diese gibt Hinweise auf die möglichen Funktionen des Proteins in der Zelle.

In dieser Arbeit wurden zwei Plasmide pIS76 und pIS77 zur Expression des GFP-CP75 genutzt (Schulz *et al.*, 2009b). Das Plasmid pIS76 ermöglicht Blasticidin-Selektion, die in der Regel zur einmaligen Integration des Plasmids im Genom führt. Dagegen wird bei Selektion mit G418 (pIS77) auf multiple, konkatemere Plasmid-Integration hin selektiert, da der Resistenzfaktor sonst nicht in

Ergebnisse

ausreichendem Maß exprimiert wird, was damit gleichzeitig für eine stärkere Überexpression des Proteins von Interesse sorgt (Barth *et al.*, 1998). Dieser Stamm wurde als GFP-CP75O/E bezeichnet.

Das Expressionslevel von GFP-CP75O/E im Vergleich zum endogenen CP75 im AX2-Stamm wurde densitometrisch im Western Blot bestimmt (s. Abb. 6). Für diese Bestimmung wurden Centrosomen isoliert, da das endogene CP75 im gesamten Zelllysate nicht nachweisbar ist (s. Abb. 3 B). Somit bezieht sich die Expressionsstärke auf isolierte Centrosomen, die gegenüber einem Gesamtextrakt ca. 1500-fach angereichert sind (Gräf *et al.*, 1998). Das Fusionsprotein ist gegenüber dem endogenen CP75 in Kontrollzellen 2,3-fach stärker konzentriert. Außerdem ist bei GFP-CP75O/E kaum endogenes CP75 im Centrosomenpräparat nachweisbar. Das spricht dafür, dass die Überexpression des GFP-Fusionsproteins die Expression des endogenen CP75 hemmt. Das bestimmte Mengenverhältnis gilt für die gesamte Zellpopulation und kann für jede einzelne Zelle abweichen.

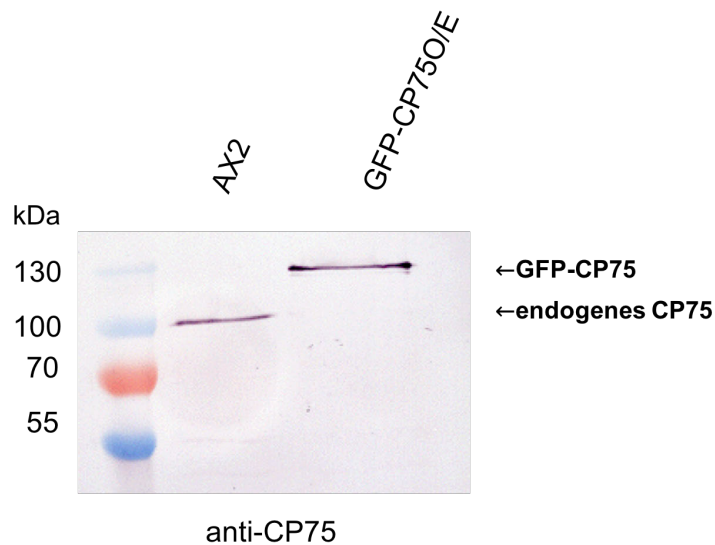


Abbildung 6: Überexpression von GFP-CP75 hemmt die Expression des endogenen CP75. Aus AX2- und GFP-CP75O/E-Zellen wurden Centrosomen isoliert. Nach der Proteinbestimmung mittels des Amidoschwarz-Tests wurde die gleiche Proteinmenge, je 3 µg pro Probe, auf SDS-Gel aufgetragen. Die Western Blot Markierungen erfolgten mit anti CP75 (1:500) und sekundären CIP-konjugierten Antikörper. GFP-CP75O/E wurde 2,3 fach stärker als das endogene CP75 in AX2 exprimiert (densitometrische Bestimmung mit Image J)

2.3.2 Überexpression von GFP-CP75 führt zum Verbleiben von GFP-CP75 am Centrosom während der Mitose und zur Kollokalisierung mit F-Aktin

Die ersten Untersuchungen von GFP-CP75 Zellen, die mit Blasticidin selektiert wurden, haben gezeigt, dass das Protein in der Interphase am Centrosom lokalisierte, während in der Metaphase kein Signal an den Spindelpolen detektiert werden konnte (Schulz *et al.*, 2009b). Die Untersuchungen der anderen Mitosestadien in der vorliegenden Arbeit haben ergeben, dass GFP-CP75 in diesen Zellen insgesamt die gleiche Lokalisation wie endogenes CP75 aufwies (Vergl. Abb. 4 und Abb.7). In der Prometaphase war das GFP-Signal als Doppelpunkt zu sehen. In der Meta- und der Anaphase verschwand das Signal und kam in der Telophase an den Spindelpolen wieder zurück (s. Abb. 7).

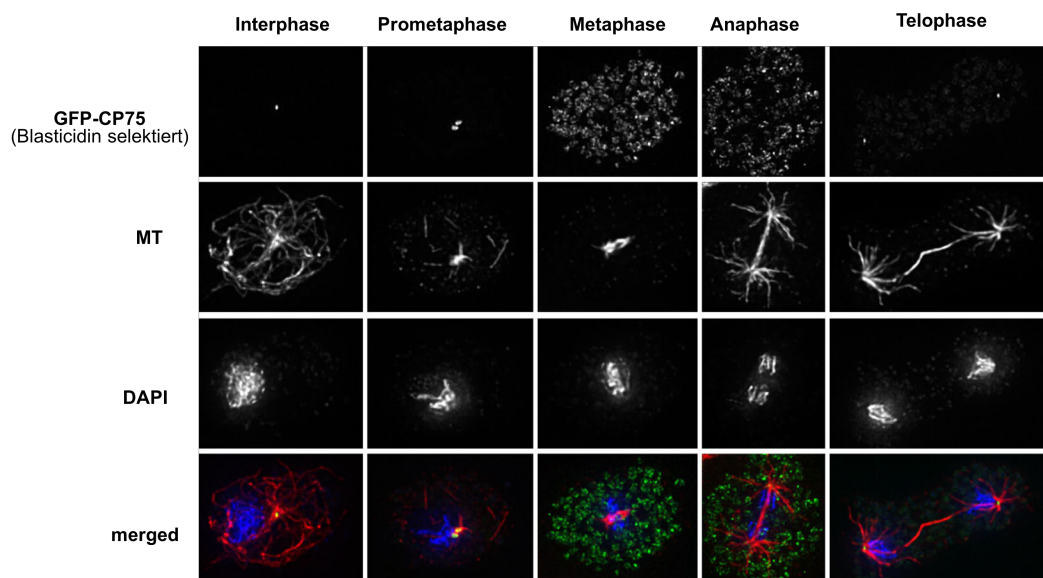


Abbildung 7: GFP-CP75 (grün) lokalisiert am Centrosom abhängig von den Mitosephasen. GFP-CP75 Zellen wurden mit Glutaraldehyd fixiert und mit anti-Tubulin (MT, rot) in markiert. DNA wurde mit DAPI (blau) gefärbt.

Im Gegensatz dazu führte die Überexpression von GFP-CP75 zum Verweilen des GFP-Signals an den Spindelpolen während der gesamten Mitose (s. Abb. 8). In Bezug auf Centrosomenzahl, Zellgröße und Wachstum zeigten die Zellen keine Auffälligkeiten.

Der zweite auffällige Phänotyp des überexprimierenden Stammes ist die Lokalisation des GFP-CP75 am Zellcortex (s. Abb. 9 Pfeil). Um das Aktin-

Ergebnisse

Netzwerk am Zellcortex zu markieren, wurde an den Fluoreszenzfarbstoff AlexaFluor 568 gekoppeltes Phalloidin benutzt. Phalloidin ist ein Phallotoxin des grünen Knollenblätterpilzes *Amanita phalloides*. Das Cyclopeptid hat eine hohe Affinität zu Aktin, die man sich in der Fluoreszenzmikroskopie zunutze macht (Wulf *et al.*, 1979). Die Verteilung des GFP-CP75-O/E-Signals korrelierte mit der Verteilung von F-Aktin. Die, mit Blasticidin selektierten GFP-CP75-Zellen (s. Abb. 9) oder mit anti-CP75 markierten AX2-Zellen (s. Abb. 4) zeigten dagegen kein Signal am Zellcortex und somit auch keine Kollokalisierung mit F-Aktin.

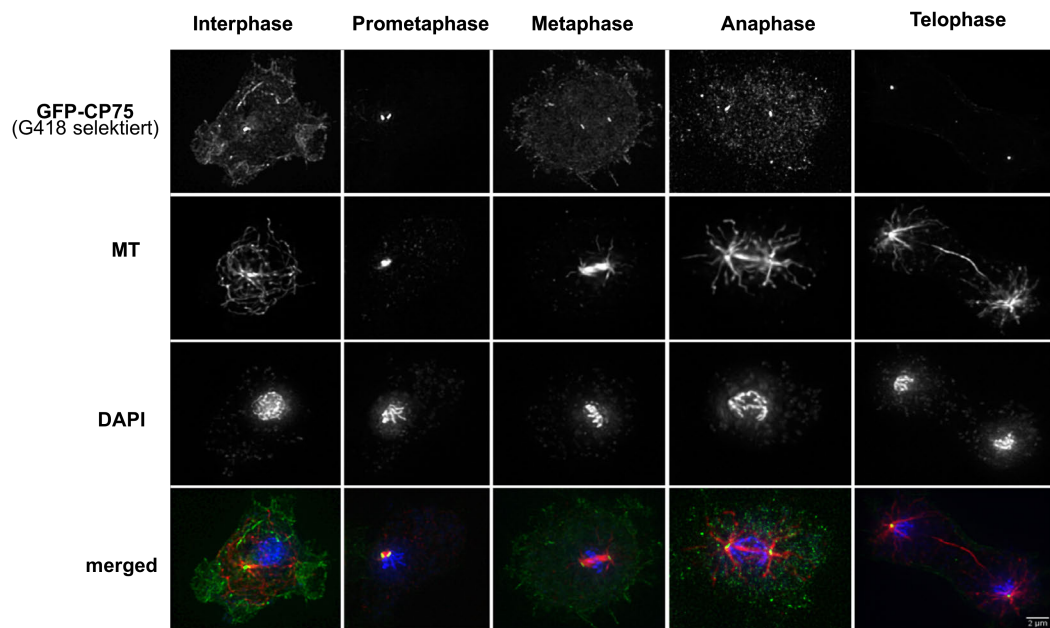


Abbildung 8: GFP-CP75O/E (grün) verbleibt am Centrosom während der ganzen Mitose. GFP-CP75-Zellen wurden mit Glutaraldehyd fixiert und mit anti-Tubulin (MT, rot) markiert. DNA wurde mit DAPI (blau) gefärbt.

Ergebnisse

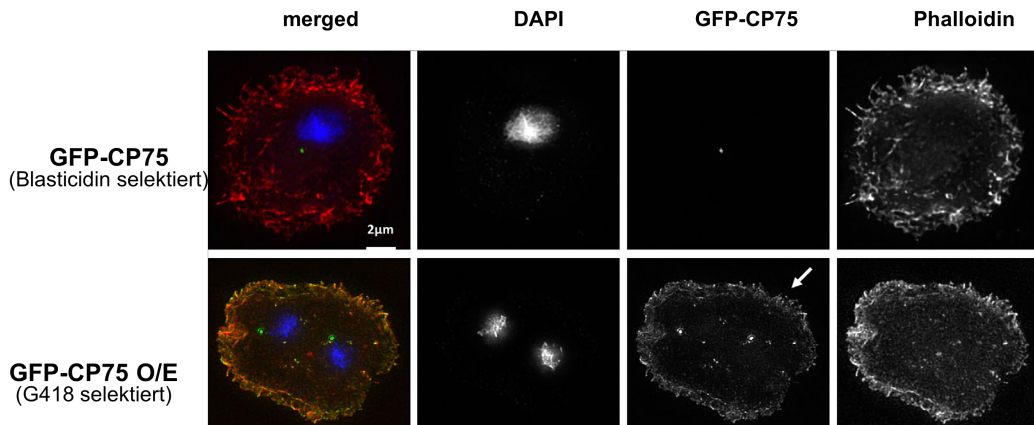


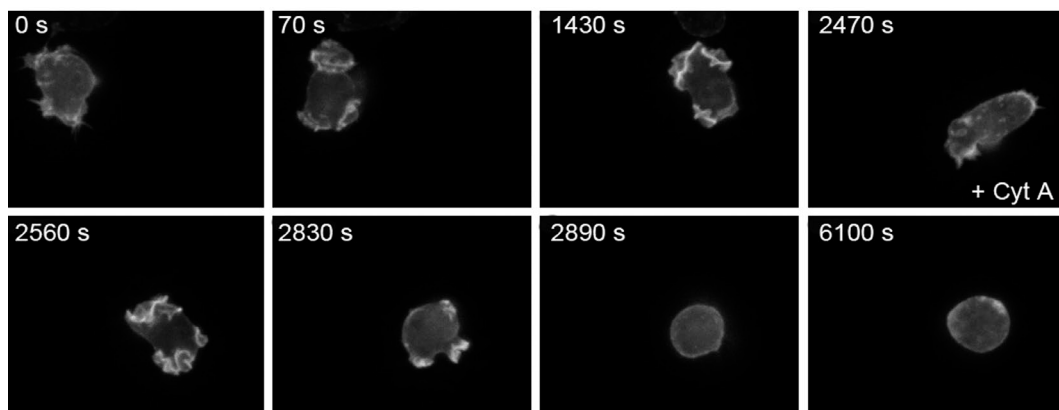
Abbildung 9: GFP-CP75 (grün) zeigt Kolokalisation mit F-Aktin am Zellcortex. Die mit Blasticidin und G418 selektierten GFP-CP75-Zellen wurden mit Formaldehyd fixiert und mit Phalloidin-Alexa568-Konjugat (rot) markiert. DNA wurde mit DAPI (blau) gefärbt. GFP-CP75 überexprimierenden Zellen (GFP-CP75O/E) zeigen Kolokalisation mit F-Aktin, welches mit Phalloidin markiert wurde. Die Kontrollzellen (Blasticidin selektierte GFP-CP75-Zellen) zeigen nur ein punktförmiges GFP-Signal am Centrosom und keine Lokalisation am Zellcortex.

Um den Aspekt der Kolokalisation von GFP-CP75 mit Aktin am Zellkortex der GFP-CP75 überexprimierenden Zellen weiter zu untersuchen, wurde eine Lebendaufnahme am konfokalen Spinning-Disk-Mikroskop durchgeführt. Dabei wurde den GFP-CP75 exprimierenden Zellen während der Aufnahme Cytochalasin A appliziert. Dieses ist ein Stoffwechselprodukt aus den Pilzen, das in der Lage ist an das Plus-Ende der Aktinfilamente zu binden und damit die Aktinpolymerisation zu hemmen (Cooper, 1987). Dadurch wird das Aktinnetzwerk zerstört, was sich auf die Integrität der Zelle auswirkt (Schliwa, 1982). Der Zweck des Experimentes besteht darin, die Wirkung des Cytochalasins A auf die Lokalisation des GFP-CP75 am Zellcortex zu beobachten und mit der, eines F-Aktin-bindenden Proteins zu vergleichen. In dem Falle ist es das Protein DdLim, das als wichtiger Regulator des Aktin-Cytoskeletts fungiert und eine ähnliche Lokalisation am Zellcortex aufweist wie GFP-CP75 (Prassler *et al.*, 1998). Für das Experiment wurde der GFP-Ddlim Δ coil Stamm verwendet, freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Annette Müller-Taubenberger (LMU München). Bei GFP-Ddlim Δ coil handelt es sich um ein Fusionsprotein mit der Aktin-bindenden Domäne, das sich in Bezug auf die Lokalisation genauso wie das Volllängenprotein verhält (Schneider *et al.*, 2003). Abbildung 10 A und

Ergebnisse

Film 1 (Zusatzmaterial auf der CD) zeigen eine GFP-Ddlim Δ coil-Zelle, die sich zunächst ganz normal bewegt und die für Aktindynamik typische Wellen in Form des GFP-Signals zeigt. Etwa 400 s nach der Zugabe von Cytochalasin A rundeten sich die Zellen ab und die Wellen verschwanden. Das gleiche Verhalten zeigten auch die GFP-CP75-Zellen (s. Abb. 10 B; Film 2). Dieses Ergebnis zeigt deutlich, dass die Umverteilung von GFP-CP75 unter Cytochalasin-Behandlung mit der Depolymerisierung von F-Aktin zusammenhängt. Das deutet darauf hin, dass eine Interaktion von CP75 mit dem Aktin-Cytoskelett besteht.

A GFP-dDlim Δ coil



B GFP-CP75-O/E

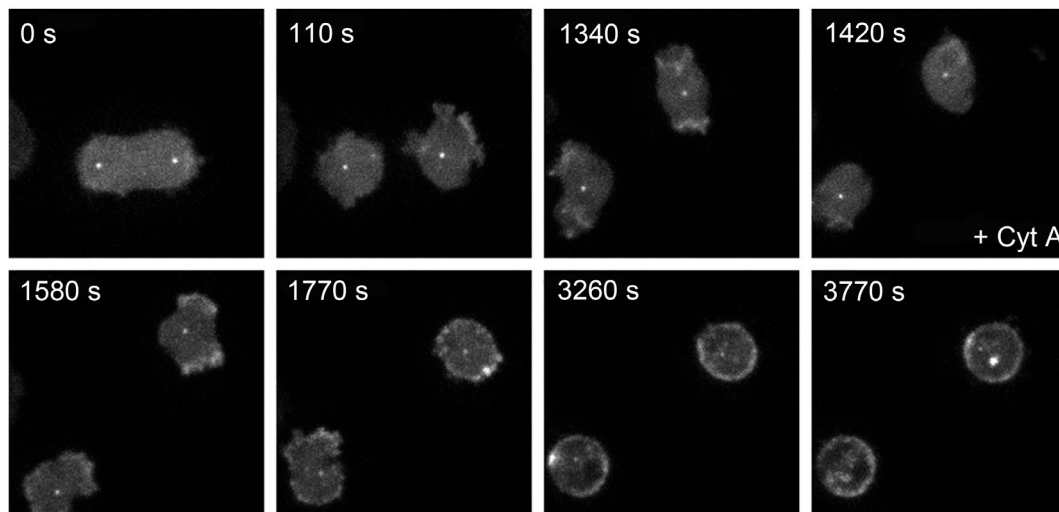


Abbildung 10: Umverteilung des GFP-Ddlim Δ coil (A)- und GFP-CP75O/E (B)-Signals (A) nach der Zugabe der Aktin depolymerisierenden Substanz Cytochalasin A (20 μ M). Die Aufnahme erfolgte mit konfokalem Spinning-Disk-Mikroskop mit einer Bildrate von 10 fr/s und einem Zeitraffer von 10 s. Gezeigt ist maximale Intensitätsprojektion von 7 Ebenen pro Bildstapel.

2.3.3 GFP-CP75 zeigt keine signifikante Mobilität am Centrosom

Die Untersuchung der Mobilität eines Proteins kann darauf hindeuten, ob es strukturelle Funktionen an seinem Lokalisationsort erfüllt. Strukturell wichtige Proteine zeigen eine geringe bzw. keine Mobilität. Um die Mobilität von CP75 am Centrosom zu untersuchen, wurde eine FRAP-Analyse (*fluorescence recovery after photobleaching*) durchgeführt. Abbildung 11 zeigt keine signifikante Regeneration des Fluoreszenz-Signals nach dem Ausbleichen des GFP-CP75 Signals am Centrosom. Dieses Verhalten deutet auf die strukturellen Aufgaben von CP75 am Centrosom.

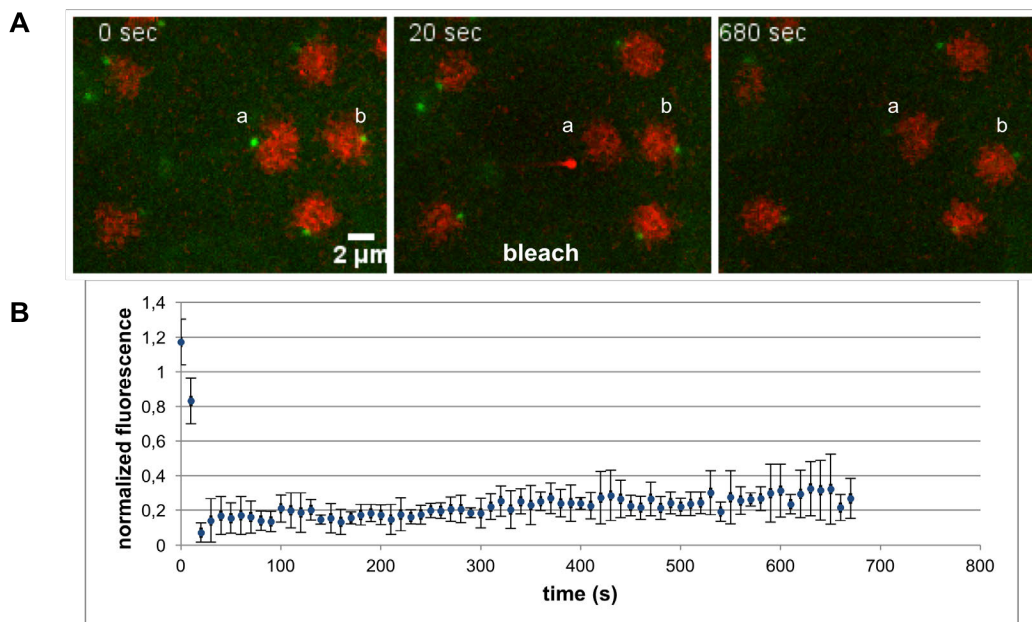


Abbildung 11: GFP-CP75 zeigt nahezu keine Regeneration des GFP-Signals in FRAP. (A) Ausgewählte Zeitpunkte eines repräsentativen FRAP-Experiments mit GFP75/mCherry-H2B-Zellen. Das grüne GFP-CP75-Signal der Zelle **a** wurde zum Zeitpunkt 20 s mit 473 nm Laser ausgebleicht. Die Kontrollzelle **b** ist vom Laserpuls unbeeinflusst. Die Aufnahme erfolgte mit konfokalem Spinning-Disk-Mikroskop mit einer Bildrate von 10 fr/s und einem Zeitraffer von 10 s. Gezeigt ist die maximale Intensitätsprojektion von 7 Ebenen pro Bildstapel. (B) Durchschnittliche Fluoreszenz-Intensität (\pm SD, n=5) des GFP-CP75-Signals aus sechs FRAP-Experimenten

2.4 Untersuchung von GFP-CP75 Deletionsmutanten

Für die weiteren Untersuchungen der Lokalisation und Aufklärung der Funktion von CP75 wurden zwei Deletionsmutanten erzeugt. Die erste umfasst das N-terminale Fragment von 370 Aminosäuren und enthält eine durch ELM (Dinkel *et*

al., 2015) vorhergesagte Plk-Konsensussequenz (s. Abb. 12 A). Die zweite Mutante besteht aus dem C-terminalen Fragment, das die restlichen Aminosäuren (371-655) und eine vorhergesagte *coiled-coil*-Domäne umfasst (s. Abb.12 B). Beide Fragmente wurden als N-terminale GFP-Fusionsproteine in *D. discoideum* exprimiert. GFP-CP75-C wurde in pIS76 exprimiert und auf Blasticidin selektiert. GFP-CP75-N wurde in pIS77 exprimiert und auf G418 selektiert. Die Expression der beiden Fragmente in jeweils gleichen Vektoren erwies sich als schwierig und für die Analysen unbrauchbar.

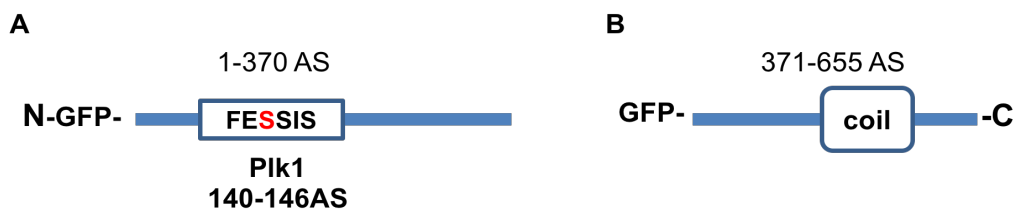


Abbildung 12: Schematische Darstellung der GFP-CP75 Deletionsmutanten. (A) Das N-terminale Fragment, bestehend aus 370 AS, enthält die vorhergesagte Plk1-Phosphorylierungsstelle und ist N-terminal an GFP fusioniert. (B) Das C-terminale Fragment umfasst die Region von AS 371 bis AS 655 und die vorhergesagte *coiled-coil*-Domäne. Das Fragment wurde ebenfalls als N-terminales Fusionsprotein exprimiert.

2.4.1 GFP-CP75-C lokalisiert während des ganzen Zellzyklus am Centrosom und am Zellcortex

Die Deletionsmutante GFP-CP75-C lokalisiert wie das überexprimierende GFP-CP75 während der gesamten Mitose und in der Interphase am Centrosom (s. Abb. 13). Außerdem ist auch hier ein deutliches Signal am Zellcortex zu sehen (s. Abb.13 Pfeil). Das Ergebnis deutet darauf hin, dass für die Lokalisation von CP75 am Zellcortex und somit für die Interaktion mit Aktin die C-terminale Domäne des Proteins notwendig ist.

Ergebnisse

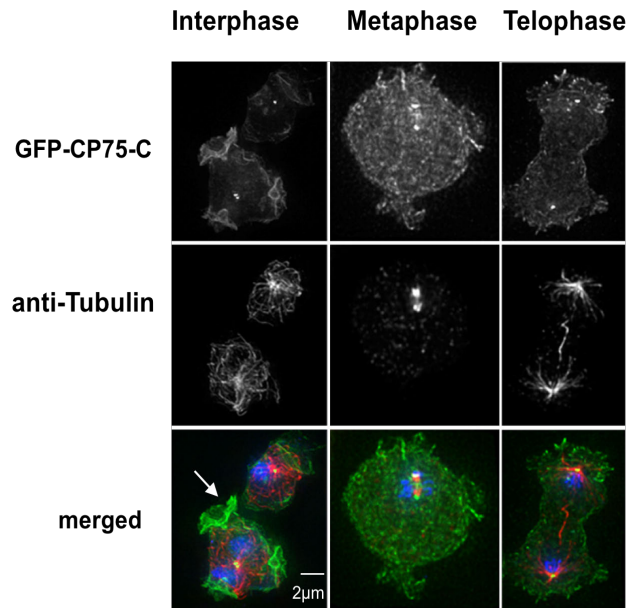


Abbildung 13: GFP-CP75-C (grün) lokalisiert am Centrosom während der gesamten Mitose und am Zellcortex. GFP-CP75-C-Zellen wurden mit Glutaraldehyd fixiert und mit anti-Tubulin (rot) markiert. DNA wurde mit DAPI (blau) gefärbt.

2.4.2 Die centrosomale Lokalisation von GFP-CP75-N ist abhängig von den Mitosephasen

GFP-CP75-N lokalisiert in der Interphase am Centrosom und zeigt kein Signal am Zellcortex (s. Abb. 14). Mit fortschreitender Mitose verschwindet das GFP-Signal an den Spindelpolen. Auch während der Telophase kehrt das GFP-CP75-N-Signal, anders als beim endogenen CP75, nicht zurück. Erst mit der fortschreitenden Cytokinese lokalisierte GFP-CP75-N wieder am Centrosom und zeigte dann jedoch interessanterweise eine ungleiche Verteilung in den beiden Tochterzellen.

Ergebnisse

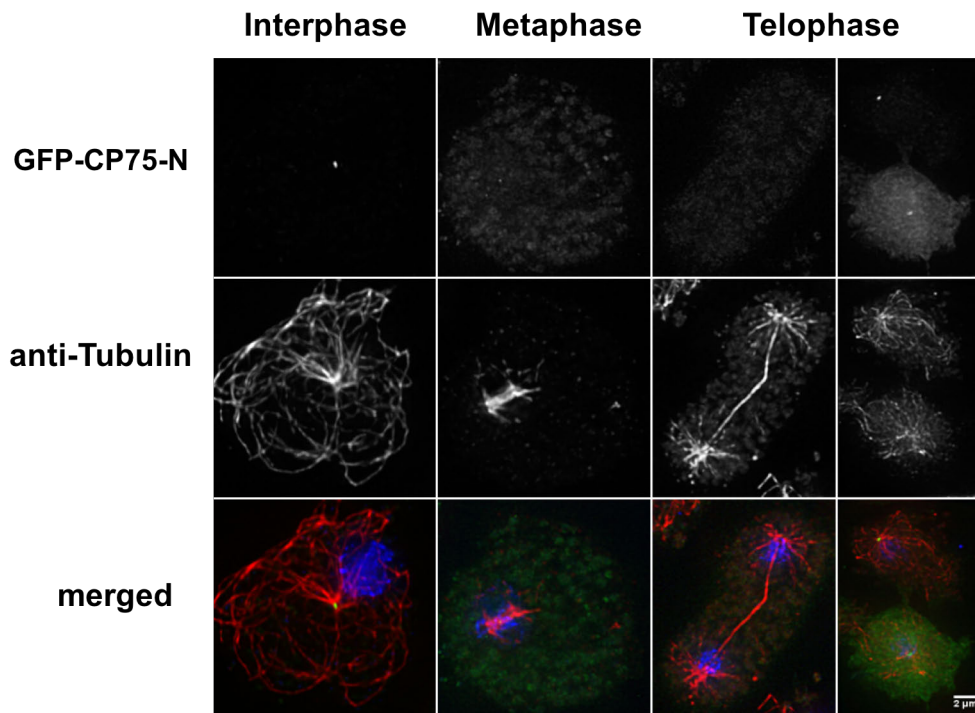


Abbildung 14: GFP-CP75-N (grün) lokalisiert am Centrosom abhängig von den Mitosephasen. GFP-CP75-N-Zellen wurden mit Glutaraldehyd fixiert und mit anti-Tubulin (rot) markiert. DNA wurde mit DAPI (blau) gefärbt.

2.4.3 Expression von GFP-CP75-N führt zur Bildung verlängerter Centrosomen

Durch Western Blot Analyse von GFP-CP75-N exprimierenden Zellen war ersichtlich, dass die Expression vom endogenen CP75 in diesem Stamm gehemmt wurde. Abbildung 15 zeigt an isolierten Centrosomen ein um 4 fach verringertes Proteinlevel vom endogenen CP75 im GFP-CP75-N-Stamm im Vergleich zu AX2.

Ergebnisse

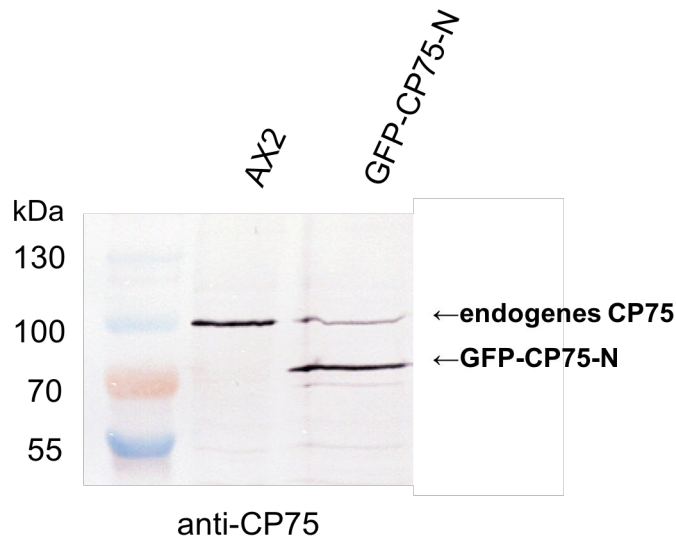


Abbildung 15: Überexpression von GFP-CP75-N hemmt die Expression des endogenen CP75. Aus AX2- und GFP-CP75-N-Zellen wurden Centrosomen isoliert. Nach der Proteinbestimmung mittels des Amidoschwarz-Tests wurde die gleiche Proteinmenge, je 3 μ g pro Probe, auf SDS-Gel aufgetragen. Die Western Blot Markierungen erfolgten mit anti-CP75(1:500) und sekundären CIP-konjugierten Antikörper. Das Proteinlevel vom endogenen CP75 im GFP-CP75-N-Stamm ist im Vergleich zu AX2 4-fach geringer (densitometrische Bestimmung mit Image J)

63% (n=86) der GFP-CP75-N-Zellen wiesen verlängerte, oft sichelförmige Centrosomen auf (s. Abb. 16). Im Wildtypstamm sowie bei GFP-CP75 exprimierenden Stämmen konnte dieses Phänomen nicht beobachtet werden. Dieser dominant-negativer Effekt von GFP-CP75-N kommt wahrscheinlich durch die verminderte Expression des endogenen CP75 in diesem Stamm (s. Abb. 15).

Um herauszufinden, ob auch die anderen bekannten centrosomalen Proteine von diesem Phänotyp betroffen waren, wurden diese im GFP-CP75-N-Stamm mittels Immunfluoreszenzmikroskopie analysiert. Abbildung 17 zeigt, dass die Überexpression von GFP-CP75-N die Elongation der Core-Struktur, die mit anti-CP39, anti-CP55 und anti-CP91 markiert wurde, sowie der Corona, die mit anti-CP148 markiert wurde, bewirkt. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass nicht CP75 allein die elongierte Struktur ausbildet, sondern das Centrosom als ganzes elongiert ist. Außerdem könnte es ein Indiz dafür sein, dass CP75 bei der Regulation der Centrosomen-Größe eine Rolle spielen könnte.

Ergebnisse

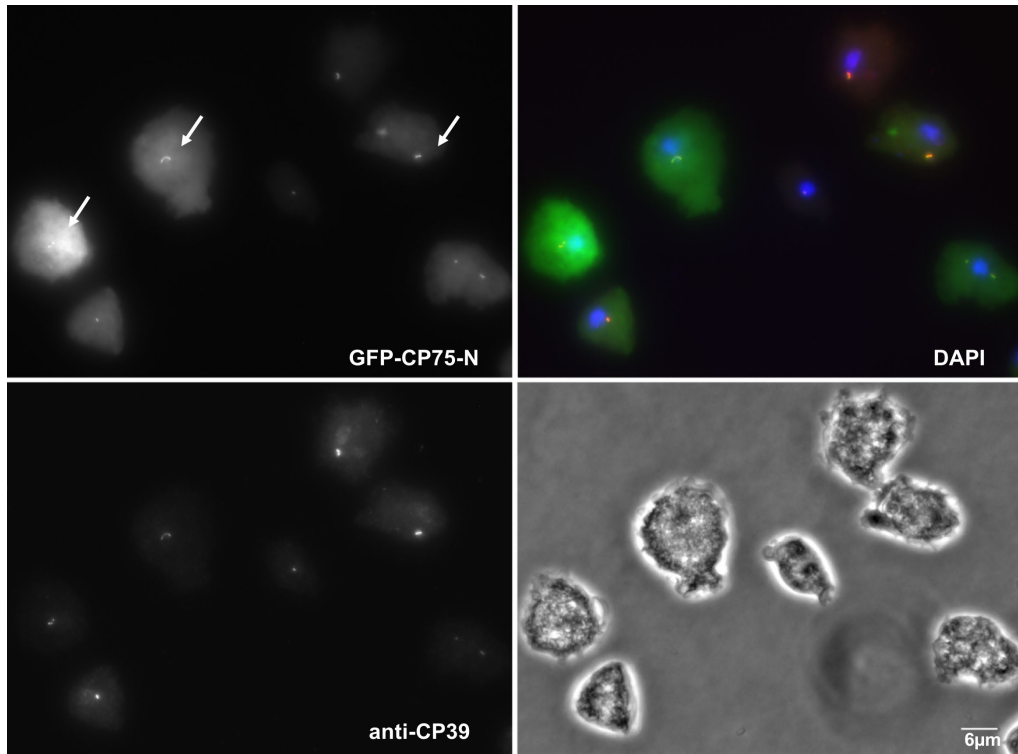


Abbildung 16: GFP-CP75-N-Zellen zeigen verlängerte, sichelförmige Centrosomen. GFP-CP75-N-Zellen wurden mit Glutaraldehyd fixiert und mit anti-CP39 in rot markiert. DNA wurde mit DAPI in blau gefärbt. GFP-CP75-N ist in grün dargestellt

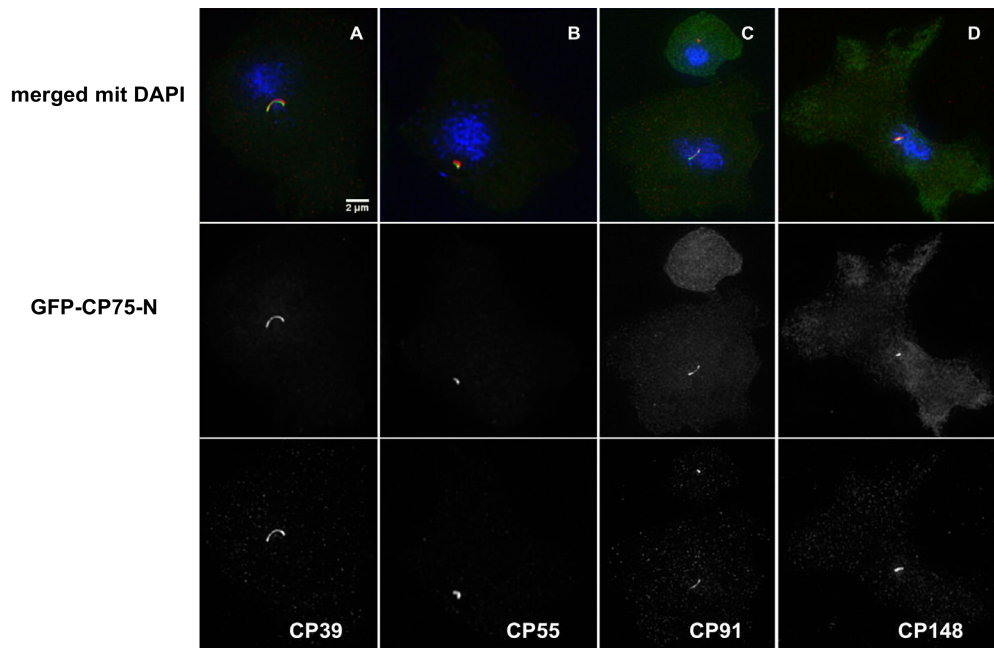


Abbildung 17: Verteilung der centrosomalen Markerproteine in GFP-CP75-N überexprimierenden Zellen. GFP-CP75-N-Zellen wurden mit Methanol fixiert und mit anti-CP39 (A), anti-CP55 (B), anti-CP91 (C) und anti-CP148 (D) in rot

markiert. DNA wurde mit DAPI (blau) gefärbt. GFP-CP75-N ist in grün dargestellt.

2.4.4 Expression von GFP-CP75-N führt zur Bildung überzähliger Centrosomen

Ein weiterer Phänotyp, der bei der Überexpression von GFP-CP75-N beobachtet wurde ist die Bildung von überzähligen Centrosomen. 15% der GFP-CP75-N-Zellen wiesen mehr als ein Centrosom pro Zellkern auf (s. Abb. 18). Der AX2-Stamm weist diesen Phänotyp nicht auf (Gräf *et al.*, 2003).

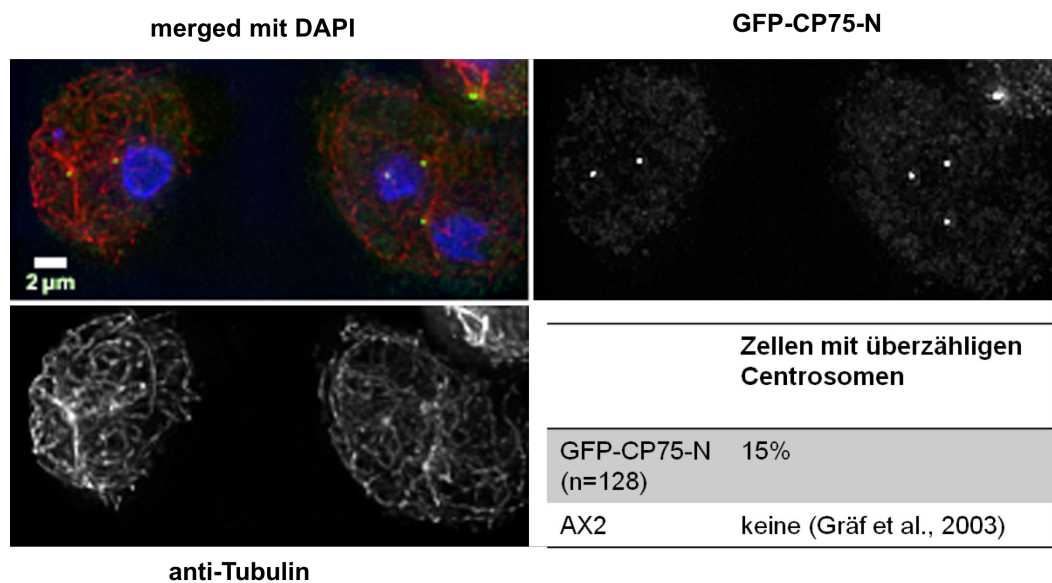


Abbildung 18: Überexpression von GFP-CP75-N (grün) führt zur Bildung überzähliger Centrosomen. GFP-CP75-N Zellen wurden mit Glutaraldehyd fixiert und mit anti-Tubulin (rot) markiert. DNA wurde mit DAPI (blau) gefärbt.

2.5 Funktionelle Untersuchung von CP75

Um einen weiteren Einblick in die Funktionen von CP75 zu bekommen wurden Knockdown-Experimente durchgeführt. Dafür wurde eine für *D. discoideum* adaptierte Methode verwendet (Martens *et al.*, 2002). Bei dieser werden *Dictyostelium*-Zellen mit einem Plasmid transformiert, das ein *Inverted-repeat*-Konstrukt der Zielsequenz enthält. Dieses integriert sich ins Genom, wodurch eine stabile Expression des *Inverted-repeat*-Konstrukts gewährleistet wird. Durch die Bildung der doppelsträngigen RNA, die über Dicer in siRNA gespalten wird, wird Knockdown des Zielproteins hervorgerufen. Die densitometrische Auswertung

Ergebnisse

des Western Blots mit isolierten Centrosomen in Abbildung 19 zeigt eine 6,3 fache Verminderung des Proteinexpressionslevels vom endogenen CP75 im Vergleich zum AX2-Stamm. Abbildung 20 zeigt den mikroskopischen Nachweis des CP75-Knockdowns. Dafür wurden AX2- und CP75-RNAi-Zellen mit anti-CP75 markiert und mittels Immunfluoreszenzmikroskopie untersucht. Die phänotypisch stark auffälligen CP75-RNAi-Zellen zeigten keine centrosomale Markierung wenn sie mit anti-CP75 gefärbt wurden.

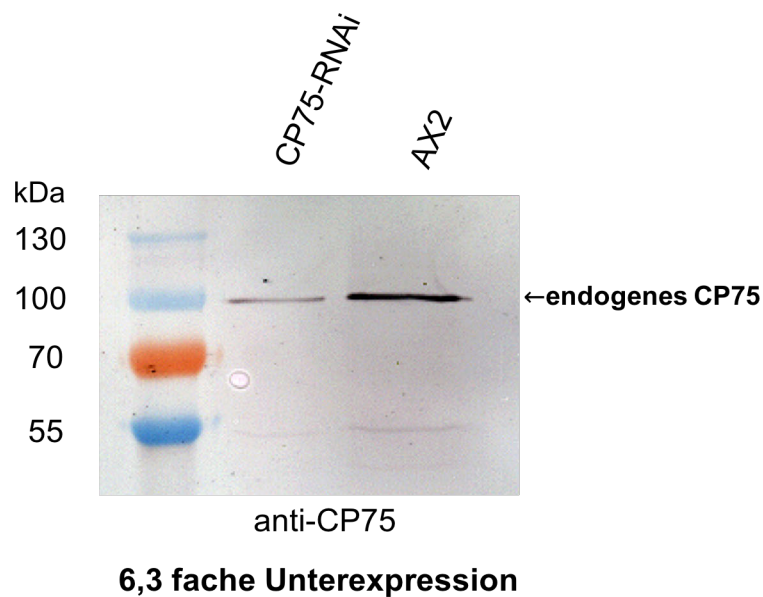


Abbildung 19: Biochemischer Nachweis des CP75 Knockdowns. Aus AX2- und CP75-RNAi-Zellen wurden Centrosomen isoliert. Nach der Proteinbestimmung mittels Amidoschwarz-Tests wurde die gleiche Proteinmenge, je 7 μ g pro Probe, auf SDS-Gel aufgetragen. Die Western Blot Markierungen erfolgten mit anti-CP75 (1:500) und sekundärem CIP-konjugierten Antikörper. Das Expressionslevel wurde densitometrisch bestimmt.

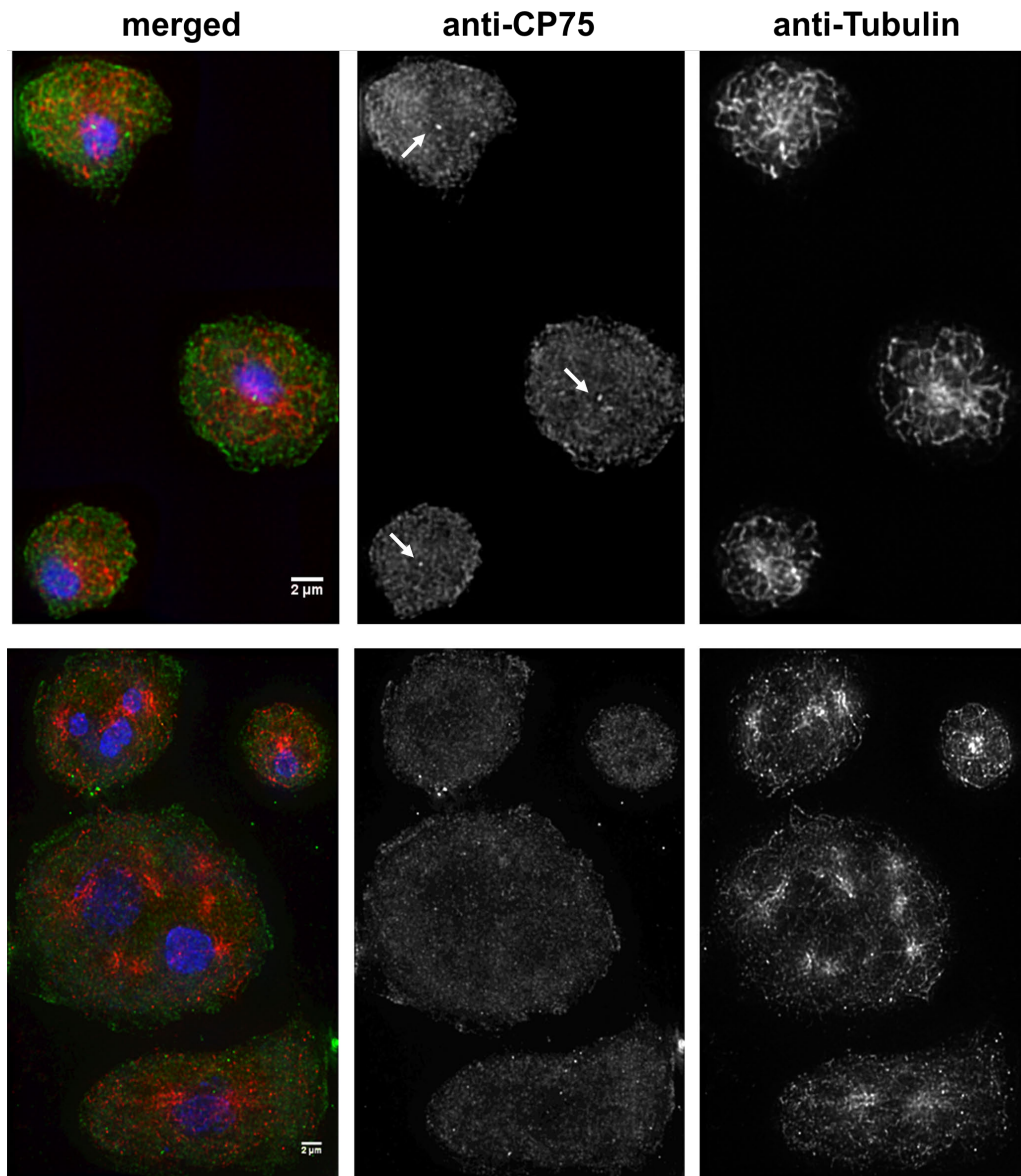


Abbildung 20: Mikroskopischer Nachweis des CP75 Knockdowns im Vergleich von AX2- und CP75-RNAi-Zellen. Zellen beider Stämme wurden mit Methanol fixiert und mit anti-CP75 in grün und anti-Tubulin in rot markiert. DNA wurde mit DAPI (blau) gefärbt.

2.5.1 CP75-RNAi führt zur Bildung überzähliger Centrosomen

CP75-RNAi-Zellen zeichneten sich durch phänotypische Heterogenität aus. Die Zellkerne waren im Vergleich zum Wildtyp vergrößert. Die Zellkerne der AX2-Zellen waren stets 2 μm im Durchmesser groß. Bei CP75-RNAi-Zellen betrug der Durchmesser der 38 von 94 Zellkernen 3 μm und 11 Zellkerne hatten einen Durchmesser von mehr als 3 μm (s. Abb. 21). Sie wiesen zudem stark vergrößerte und verlängerte MTOCs auf, die die Corona-Komponente CP148 enthielten (s.

Ergebnisse

Abb. 22). Außerdem führte die verminderte CP75-Expression zur Bildung überzähliger MTOCs. Etwa 19% der CP75-RNAi-Zellen hatten mehr als ein MTOC pro Zellkern (s. Abb. 23 A). Beim AX2-Stamm kommt der Phänotyp nicht vor (Gräf et al., 2003). Die Immunfluoreszenz-Färbungen mit den Corona- und Core-Markerproteinen CP224 und CP55 belegen, dass es sich bei überzähligen MTOCs wahrscheinlich um echte Centrosomen handelt, da die Komponenten der Core-Region und der Corona an den Centrosomen nachgewiesen werden konnten (s. Abb. 23 B).

	Zellkerne $\Phi=2\mu\text{m}$	Zellkerne $\Phi=3\mu\text{m}$	Zellkerne $\Phi>3\mu\text{m}$
CP75-RNAi (n=94)	45	38	11
AX2 (n=15)	14	0	0

Abbildung 21: Auswertung der vergrößerten Zellkerne bei CP75-RNAi im Vergleich zu AX2. Für die Messung wurden CP75-RNAi- und AX2-Zellen mit Methanol fixiert und mit DAPI gefärbt. Die maximale Intensitätsprojektion der immunfluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen wurde mittels ImageJ ausgewertet. Es wurde Durchmesser (Φ) der Zellkerne gemessen.

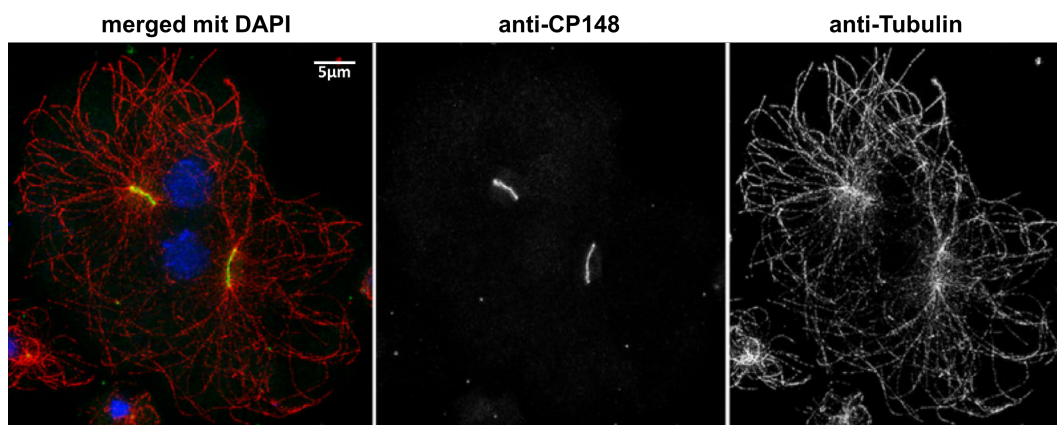


Abbildung 22: CP75-RNAi Phänotyp mit stark vergrößerten Centrosomen. CP75-RNAi-Zellen wurden mit Glutaraldehyd fixiert und mit anti-CP148 (grün) und mit anti-Tubulin (rot) und markiert. DNA wurde mit DAPI (blau) gefärbt.

A

Zellen mit überzähligen Centrosomen	
CP75-RNAi (n=640)	19%
AX2	keine (Gräf et al., 2003)

B

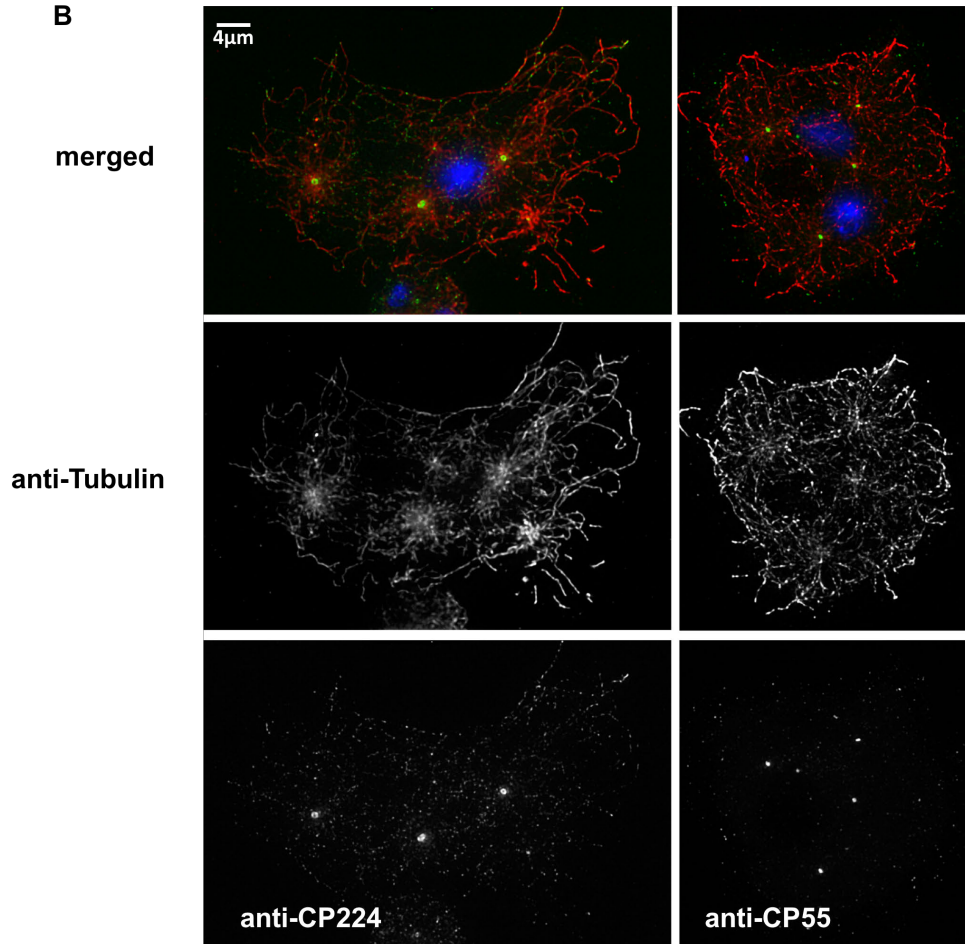


Abbildung 23: CP75-RNAi führt zur Bildung überzähliger Centrosomen. (A) Auswertung der überzähligen Centrosomen bei CP75-RNAi. (B) CP75-RNAi-Zellen wurden mit Glutaraldehyd fixiert und mit anti-Tubulin in rot und mit anti-CP224 und anti-CP55 in grün markiert. DNA wurde mit DAPI (blau) gefärbt.

2.5.2 CP75-Knockdown führt zur Akkumulation detyrosinierter Mikrotubuli

Bei der Analyse der Immunfluoreszenz-Präparate war ein weiterer Phänotyp auffällig. Bei der Färbung der CP75-RNAi Zellen mit dem gegen α -Tubulin gerichteten monoklonalen Antikörper YL1/2 (Wehland and Willingham, 1983), war es sehr auffällig, dass etwa 25% der Zellen keine bzw. eine sehr schwache Mikrotubulifärbung aufwiesen (s. Abb. 24 C). Da aber eine intakte Corona, die

Ergebnisse

normalerweise Mikrotubuli nukleiert, vorhanden war, war nicht davon auszugehen, dass Mikrotubuli tatsächlich fehlen (s. Abb. 24 A). Daher lag die Vermutung nahe, dass in diesen Zellen die YL1/2-Markierung im Vergleich zum AX2-Stamm nicht funktioniert hat. Wehland und Willingham beschrieben, dass der YL1/2-Antikörper spezifisch mit der tyrosinierten Form von α -Tubulin reagiert (Wehland and Willingham, 1983). Deswegen ist davon auszugehen, dass das α -Tubulin der Mikrotubuli in den CP75-RNAi-Zellen, die keine YL1/2-Färbung aufwiesen, weitgehend detyrosiniert war. Um diesen Aspekt näher zu untersuchen, wurde ein CP75-RNAi/GFP-Tubulin-Stamm generiert. Dabei handelte es sich um Zellen, die sowohl CP75-RNAi als auch GFP-markiertes Tubulin aufwiesen. Damit sollte gezeigt werden, dass in diesen Zellen Mikrotubuli zwar vorhanden war (GFP-Tubulin), die aber mit YL1/2 kaum gefärbt wurden. Abbildung 24 A zeigt CP75-RNAi/GFP-Tubulin-Zellen gemischt mit AX2, die mit YL1/2 markiert wurden. Die AX2-Zellen wiesen eine normale Mikrotubuli-Markierung durch YL1/2 auf, was die Funktionalität des YL1/2-Antikörpers belegt. Im Gegensatz dazu, ist bei der CP75-RNAi/GFP-Tubulin-Zelle die YL1/2-Markierung im Vergleich zur GFP-Tubulin-Markierung sehr schwach. Das Mikrotubuli-Netzwerk ist nicht zu erkennen. Um auszuschließen, dass die Expression von GFP-Tubulin in *Dictyostelium*-Zellen zur Akkumulation von detyrosiniertem α -Tubulin führt, wurden GFP-Tubulin-Zellen mit YL1/2 markiert. Abbildung 24 B zeigt, dass die GFP-Tubulin-Markierung mit der YL1/2-Färbung korreliert.

Ergebnisse

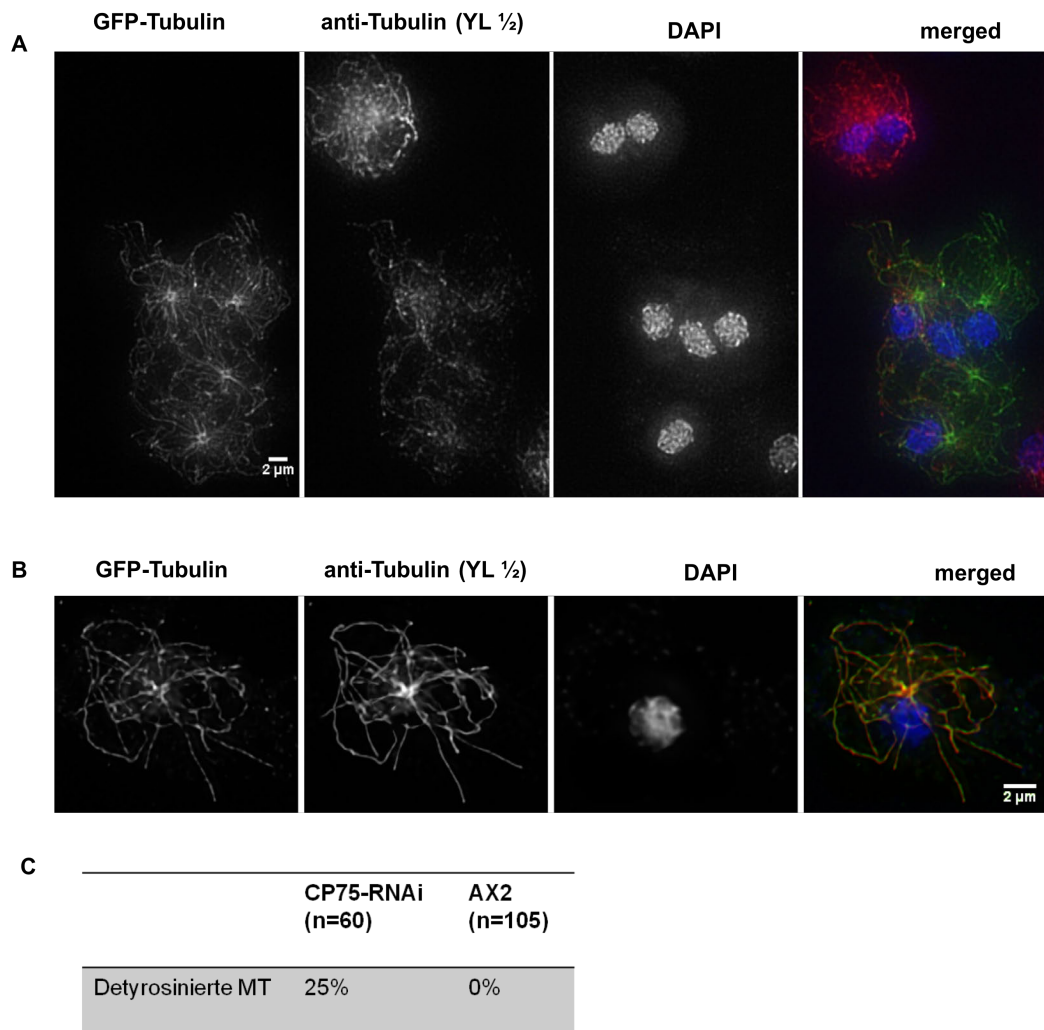


Abbildung 24: CP75-Knockdown führt zur Akkumulation der detyrosinierten Mikrotubuli. (A) CP75-RNAi/GFP-Tubulin-Zellen wurden mit AX2-Zellen im Verhältnis 1:1 gemischt, mit Glutaraldehyd fixiert und mit anti-Tubulin (YL 1/2, rot) markiert. GFP-Tubulin-Signal ist in grün dargestellt. DNA wurde mit DAPI (blau) gefärbt. (B) GFP-Tubulin-Zellen wurden mit Glutaraldehyd fixiert und mit anti-Tubulin (YL 1/2, rot) markiert. GFP-Tubulin-Signal ist in grün dargestellt. DNA wurde mit DAPI (blau) gefärbt. (C) Prozentuale Häufigkeit der CP75-RNAi/GFP-Tubulin-Zellen mit detyrosinierten Mikrotubuli.

2.5.3 Detyrosinierte Mikrotubuli sind resistent gegen Thiabendazol (TBZ)

Um festzustellen, ob die fehlende YL1/2-Markierung von Mikrotubuli tatsächlich auf die detyrosinierte und damit stabile Mikrotubuli zurückzuführen ist, wurden die CP75-RNAi/GFP-Tubulin-Zellen für 3 h mit 200 μ M Thiabendazol (TBZ) behandelt und anschließend mittels Immunfluoreszenz analysiert. TBZ ist eine Substanz, die sich an Tubulin-Dimere bindet und damit die Tubulin-Polymerisation hemmt. Demzufolge sollte eine TBZ-Behandlung keinen Einfluss

Ergebnisse

auf stabile Mikrotubuli haben, während dynamische Mikrotubuli verkürzt werden sollten. Abbildung 25 zeigt CP75-RNAi/GFP-Tubulin- und GFP-Tubulin-Zellen, die mit YL1/2 markiert wurden. GFP-Tubulin-Zellen, die mit TBZ behandelt waren (s. Abb. 25 b), zeigten im Vergleich zur Kontrolle (s. Abb.25 a) deutlich verkürzte Mikrotubuli. Die behandelten RNAi/GFP-Tubulin-Zellen (s. Abb.25 d) wiesen etwas verkürzte Mikrotubuli auf als die unbehandelten RNAi/GFP-Tubulin-Zellen (s. Abb.25 c). Der Effekt war aber deutlich schwächer als bei GFP-Tubulin-Zellen. Das Ergebnis gibt den weiteren Hinweis darauf, dass die verminderte Expression von CP75 zur Akkumulation von detyrosinierten Mikrotubuli führt.

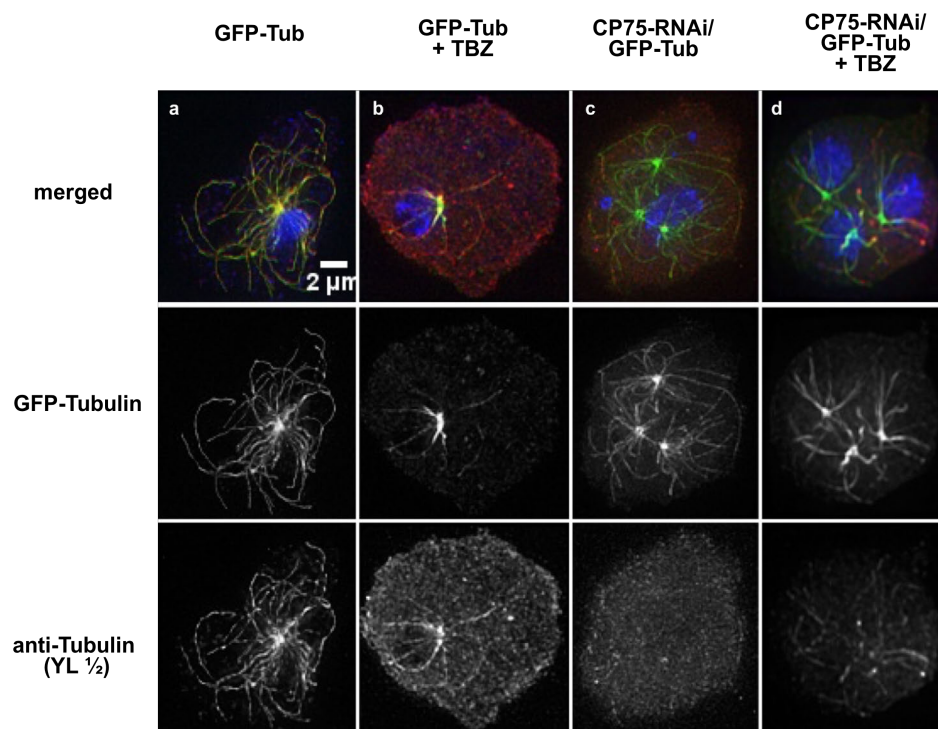


Abbildung 25: Detyrosinierte Mikrotubuli sind resistent gegen Thiabendazol (TBZ). GFP-Tubulin- und CP75-RNAi/GFP-Tubulin-Zellen wurden 3 h mit 200 µM TBZ inkubiert und anschließend mit Glutaraldehyd fixiert. Das GFP-Tubulin Signal ist in grün und anti-Tubulin (YL 1/2) in rot dargestellt. (a) und (c) GFP-Tubulin- bzw. CP75-RNAi/GFP-Tubulin-Zellen ohne TBZ. (b) und (d) GFP-Tubulin- bzw. CP75-RNAi/GFP-Tubulin-Zellen mit TBZ.

2.5.4 CP75-RNAi-Zellen haben Probleme bei der Spindelbildung

Für die weitere Aufklärung der Funktionen von CP75 wurde das Verhalten von CP75-RNAi-Zellen während der Mitose untersucht. Dafür wurden lebende CP75-

Ergebnisse

RNAi/GFP-Tubulin-Zellen mit Hilfe der konfokalen Spinning-Disk-Mikroskopie eine Zeitlang beobachtet. Abbildung 26 und der Film 3 zeigen eine CP75-RNAi/GFP-Tubulin-Zelle, die sich zum Zeitpunkt 0 in der Prophase befindet. Nach etwa 8 Minuten (Zeitpunkt 550 s) waren zwei Punkte zu sehen (Pfeil), was den Beginn der Prometaphase anzeigt. Der Abstand zwischen den beiden Polen vergrößerte sich, jedoch fehlte die zentrale Spindel zwischen den beiden Spindelpolen. Nach etwa 13 Minuten (Zeitpunkt 800 s) wurde das GFP-Signal schwächer, die beiden Punkte schienen weiter auseinander zu wandern. Gleichzeitig bildeten sich Mikrotubuli. Nach etwa 20 Minuten (Zeitpunkt 1150 s) begann der Prozess der Cytokinese. Der Pfeil deutet auf die Teilungsfurche hin. Es entstanden eine kleinere Zelle, die zwei dicht nebeneinander liegende MTOCs aufwies, und eine größere Zelle mit vier MTOCs, die paarweise dicht nebeneinander lagen. CP75-RNAi/GFP-Tubulin-Zellen hatten offensichtlich Probleme bei der Ausbildung der zentralen Spindel, was sich aber nicht auf die Separation der beiden Spindelpole auswirkte. Dieses Phänomen wurde schon von Tikhonenko *et al.* beschrieben. Ihre Forschungsergebnisse haben gezeigt, dass die Spindelpolseparation in *Dictyostelium* nicht von der zentralen Spindel abhängt, sondern wahrscheinlich durch Zugkräfte der astralen Mikrotubuli zustande kommt (Tikhonenko *et al.*, 2016).

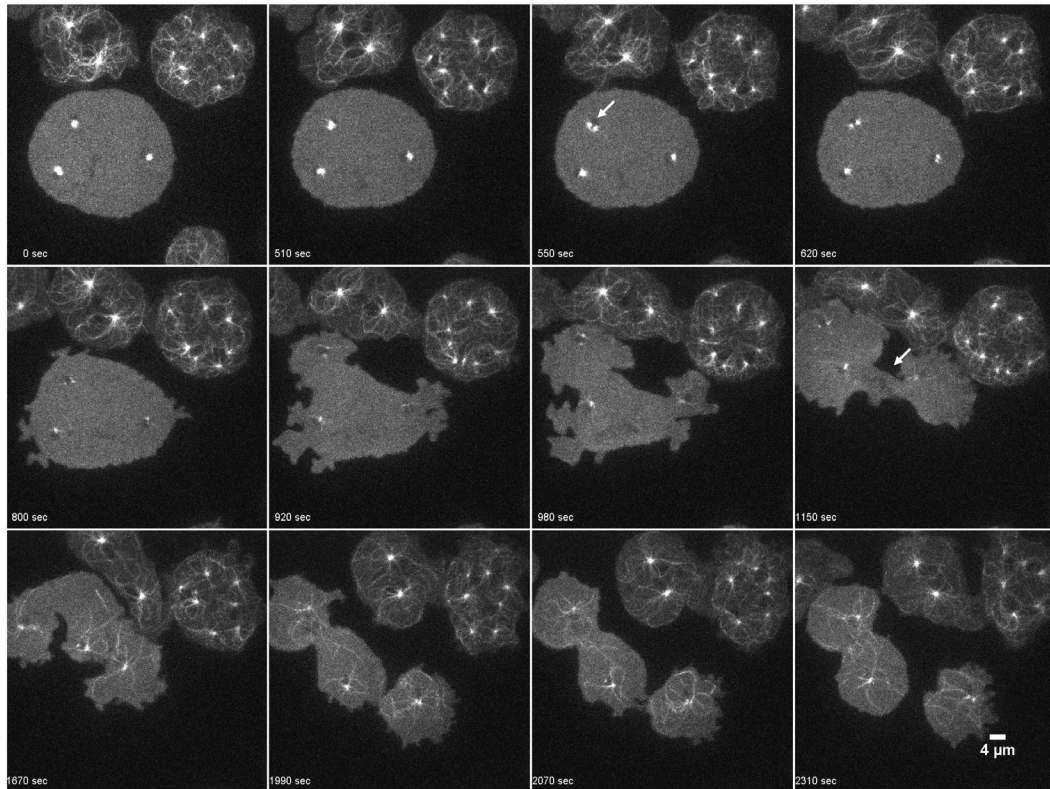


Abbildung 26: CP75-RNAi-Zellen haben Probleme bei der Ausbildung der Mitosespindel. Lebendaufnahme der RNAi/GFP-Tubulin-Zellen. Die Aufnahme erfolgte mit konfokalem Spinning-Disk-Mikroskop mit einer Bildrate von 10 fr/s und einem Zeitraffer von 10 s. Gezeigt ist maximale die Intensitätsprojektion von 7 Ebenen pro Bildstapel.

2.6 Untersuchung einer potentiellen Plk-Phosphorylierungsstelle in CP75

Die Tatsache, dass CP75 eine von den Mitosephasen abhängige Lokalisation zeigt, deutet darauf hin, dass das Protein einer Regulation durch eine mitotische Kinase unterliegen könnte. Es ist noch sehr wenig über die Regulation der Centrosom-Biogenese in *D. discoideum* bekannt. Drei Kinasen bekannt, die in Säugetier-Zellen an der Centrosomen-Duplikation beteiligt sind lokalisieren auch bei *Dictyostelium* am Centrosom. Diese sind DdAurora (Li *et al.*, 2008), DdNek2 (Gräf, 2002) und *Polo-like*-Kinase Plk1 (Schulz *et al.*, 2009b). Durch das ELM-Programm wurde eine potentielle Konsensussequenz am N-terminalen Ende von CP75 im AS-Bereich 140-146 (FESSISF) für die Plk1 vorhergesagt (s. Kapitel 2.1). *Dictyostelium* besitzt nur einen Vertreter der *Polo-like*-Kinasen. Deswegen liegt es nahe, dass diese Kinase an der Regulation von CP75 während der Mitose beteiligt sein könnte. Um dies zu überprüfen, wurde eine Punktmutation in der

Ergebnisse

Konsensussequenz erzeugt, in dem das potentiell phosphorylierbare Serin143 gegen Alanin ausgetauscht wurde. Durch die Punktmutation sollte nichtphosphorylierbares GFP-CP75 erzeugt werden (GFP-CP75-Plk-S143A). GFP-CP75-Plk-S143A wurde in pIS77 exprimiert und auf G418 selektiert. Die Expression in pIS76, die auf Blasticidin-Selektion basiert, war nicht erfolgreich.

Die Western Blot Analyse von GFP-CP75-Plk-S143A exprimierenden Zellen zeigt, dass das Fusionsprotein das endogenen CP75 am Centrosom verdrängt. An isolierten Centrosomen war das Proteinlevel vom endogenen CP75 im GFP-CP75-Plk-S143A-Stamm im Vergleich zu AX2 um das 20-fache verringert (s. Abb.27).

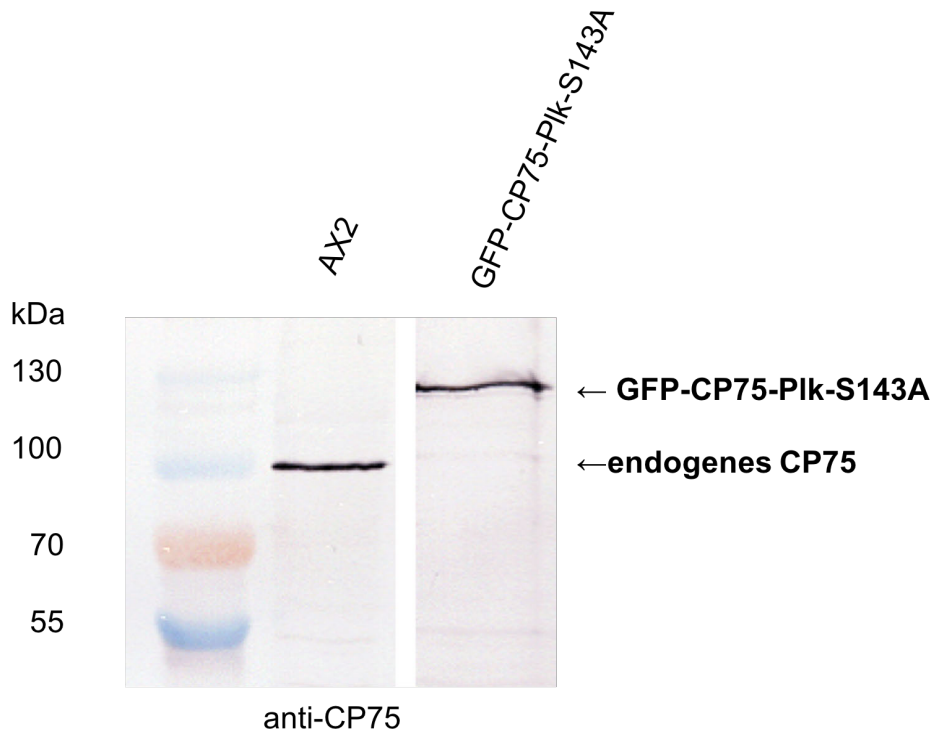


Abbildung 27: Das Proteinlevel vom endogenen CP75 ist im GFP-CP75-Plk-S143A Stamm stark verringert. Aus AX2- und GFP-CP75-Plk-S143A-Zellen wurden Centrosomen isoliert. Nach der Proteinbestimmung mittels Amidoschwarz-Tests wurde die gleiche Proteinmenge, je 3µg pro Probe, auf SDS-Gel aufgetragen. Die Western Blot Markierungen erfolgten mit anti-CP75 (1:500) und sekundärem CIP-konjugierten Antikörper. Das Proteinlevel vom endogenen CP75 im GFP-CP75-Plk-S143A-Stamm ist im Vergleich zu AX2 20-fach geringer (densitometrische Bestimmung mit Image J)

2.6.1 GFP-CP75-Plk-S143A lokalisiert am Centrosom während der Mitose

Das GFP-CP75-Plk-S143A-Signal war in der Interphase am Centrosom und in allen Mitosestadien an den Spindelpolen zu sehen (s. Abb. 28). Allerdings traten häufig noch zusätzliche GFP-Punkte auf, die bei der Untersuchung vom GFP-CP75 nicht beobachtet wurden. In der Prophase war häufig das punktförmige GFP-Signal am Centrosom von kleineren Punkten umgeben. In der Metaphase lokalisierte GFP-CP75-Plk-S143A nicht nur an den gegenüberliegenden Spindelpolen, sondern auch entlang der Spindel, häufig in Form vieler kleiner Punkte (s. Abb. 29 A, Pfeile). Um zu überprüfen, ob diese veränderte Lokalisation von GFP-CP75-Plk-S143A während der Metaphase Auswirkungen auf den Mitosenverlauf hat, wurde die Häufigkeit einzelner Mitosestadien untersucht. Abbildung 29 B zeigt einen Vergleich der Verteilung der Mitosestadien von AX2- und GFP-CP75-Plk-S143A-Zellen. Es konnte kein auffälliger Unterschied hinsichtlich der Dauer der jeweiligen Mitosestadien festgestellt werden. Das lässt vermuten, dass die Punktmutante in der Lage ist eine normale Mitose zu durchlaufen. Allerdings zeigten etwa 9% der mitotischen Zellen die auffällige Metaphase-Lokalisation im Bereich der zentralen Spindel. Dieser Unterschied zum nicht punktmutierten GFP-CP75 Stamm deutet darauf hin, dass CP75 tatsächlich durch Plk1 während der Mitose reguliert werden könnte.

Ergebnisse

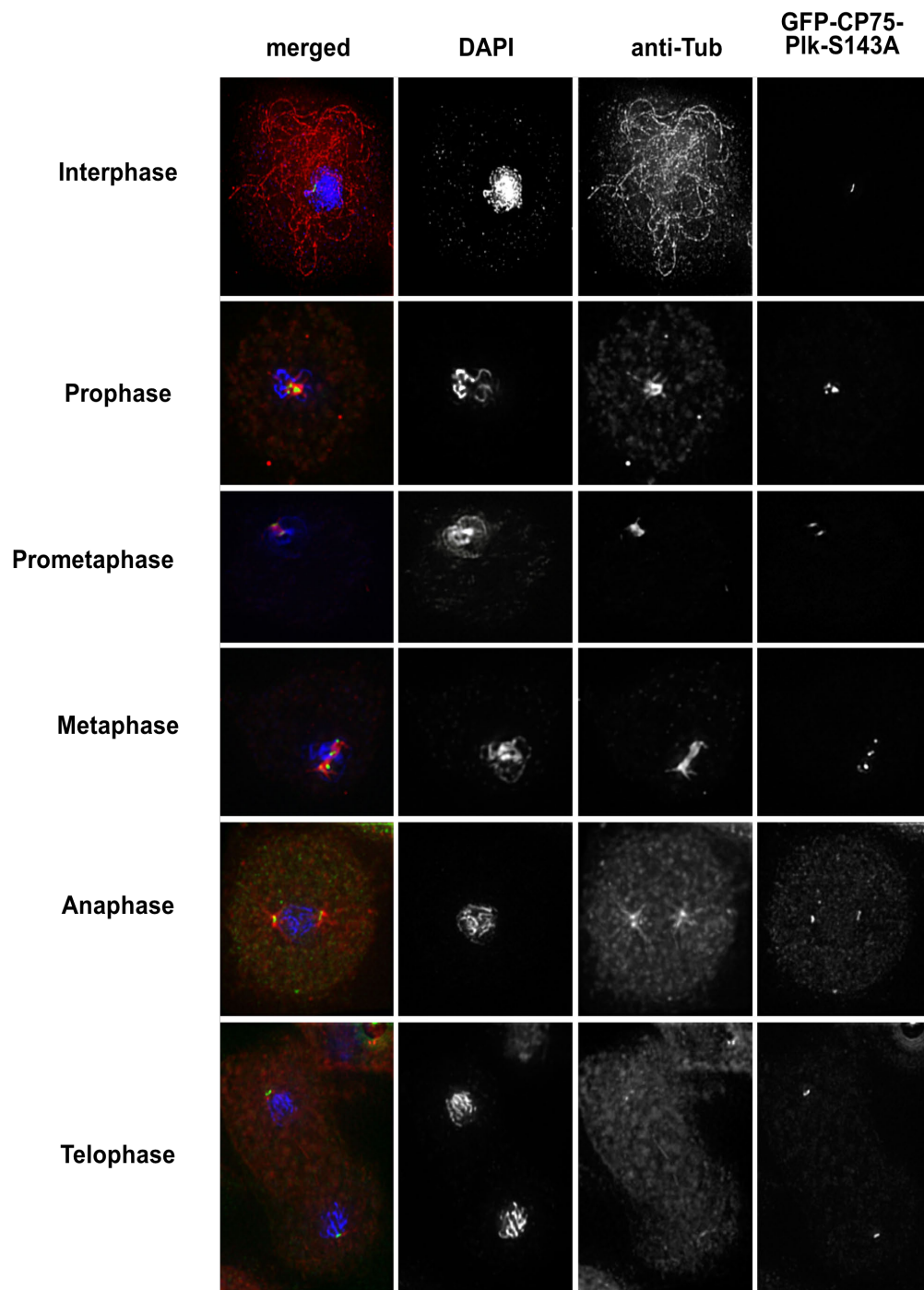
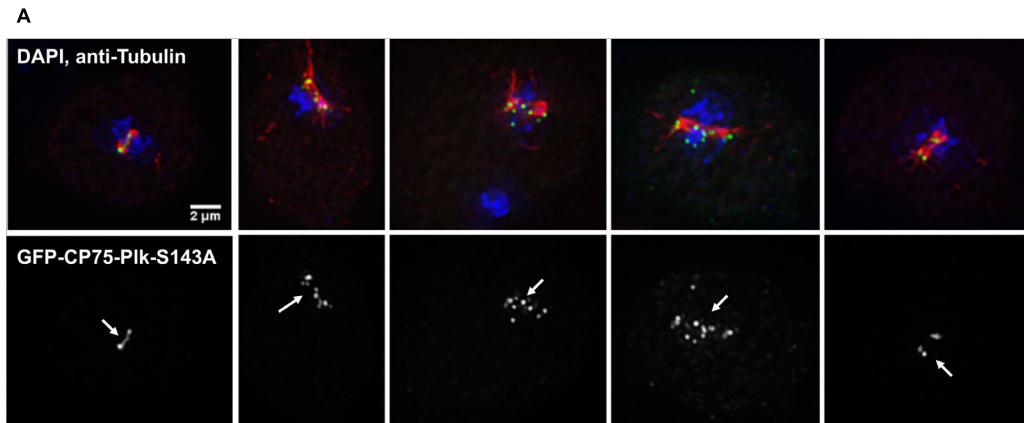


Abbildung 28: GFP-CP75-Plk-S143A (grün) verbleibt am Centrosom während der gesamten Mitose. GFP-CP75-Plk-S143A-Zellen wurden mit Glutaraldehyd fixiert und mit anti-Tubulin (rot) markiert. DNA wurde mit DAPI (blau) gefärbt.



B

	Prophase	Prometaphase	Metaphase	Anaphase	Telophase	Metaphase mit auffälligem Phänotyp
GFP-CP75-Plk-S143A (n=107)	5	13	59	19	11	10
Wildtyp (n=103)	8	16	48	10	21	0

Abbildung 29: (A) Lokalisation von GFP-CP75-Plk-S143A (grün) während der Metaphase. GFP-CP75-Plk-S143A Zellen wurden mit Glutaraldehyd fixiert und mit anti-Tubulin (rot) markiert. DNA wurde mit DAPI (blau) gefärbt. (B) Verteilung der Mitosestadien von GFP-CP75-Plk-S143A- und AX2-Zellen

2.6.2 Nichtphosphorylierbare Punktmutation führt zur Akkumulation von detyrosinierten Mikrotubuli

Wie bereits bei CP75-Knockdown-Zellen, zeigten auch GFP-CP75-Plk-S143A-Zellen Auffälligkeiten bei Mikrotubuli-Markierung mit YL1/2-Antikörper. Bei etwa 21% (n=129) der GFP-CP75-Plk-S143A-Zellen war kein Mikrotubuli-Netzwerk zu erkennen, wenn sie mit YL1/2 markiert wurden. Abbildung 30 veranschaulicht dieses Phänomen. Die mit einem Pfeil markierten GFP-CP75-Plk-S143A-Zellen wiesen keine Tubulin-Markierung auf, was darauf hindeutete, dass die nichtphosphorylierbare Punktmutation zur Anreicherung von detyrosinierten Mikrotubuli führte, die durch YL1/2 nicht markiert werden konnten.

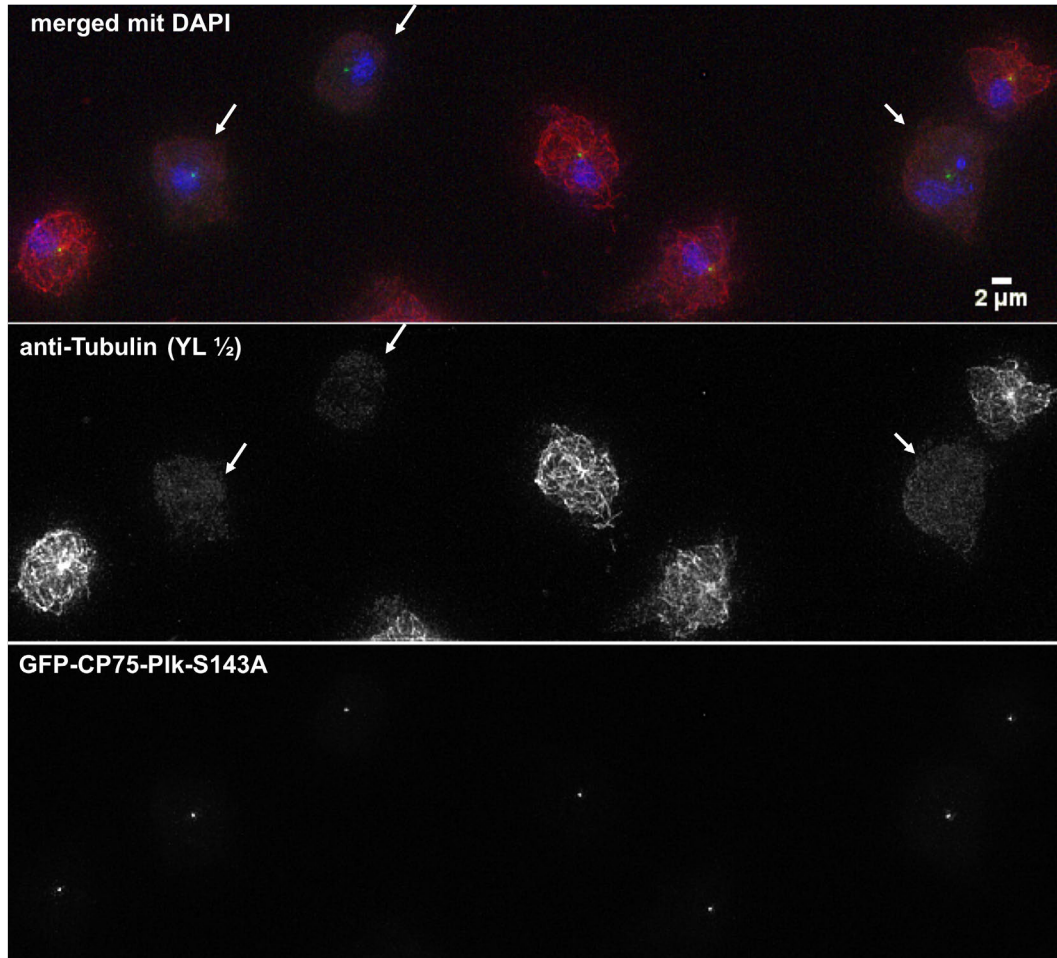


Abbildung 30: GFP-CP75-Plk-S143A-Zellen zeigen den Phänotyp der deetyrosinierten Mikrotubuli. Die Zellen wurden mit Glutaraldehyd fixiert und mit YL1/2 (anti-Tubulin) in rot markiert. DNA wurde mit DAPI (blau) gefärbt. GFP-CP75-Plk-S143A ist in grün dargestellt.

2.6.3 GFP-CP75-Plk-S143A zeigt überzählige Centrosomen und starke Defekte in der Cyto- und Karyokinese

Ein weiterer Phänotyp der GFP-CP75-Plk-S143A exprimierenden Zellen ist das Auftreten überzähliger Centrosomen. Etwa 15% der Zellen (n=134) wiesen mehr als ein Centrosom pro Zellkern auf. Außerdem waren die Zellen stark vergrößert und zeigten zudem stark vergrößerte deformierte Zellkerne auf (s. Abb. 31). Das könnte den ersten Hinweis darauf geben, dass die Phosphorylierung von CP75 durch Plk1 eine Rolle bei Cyto- und Karyokinese spielen könnte.

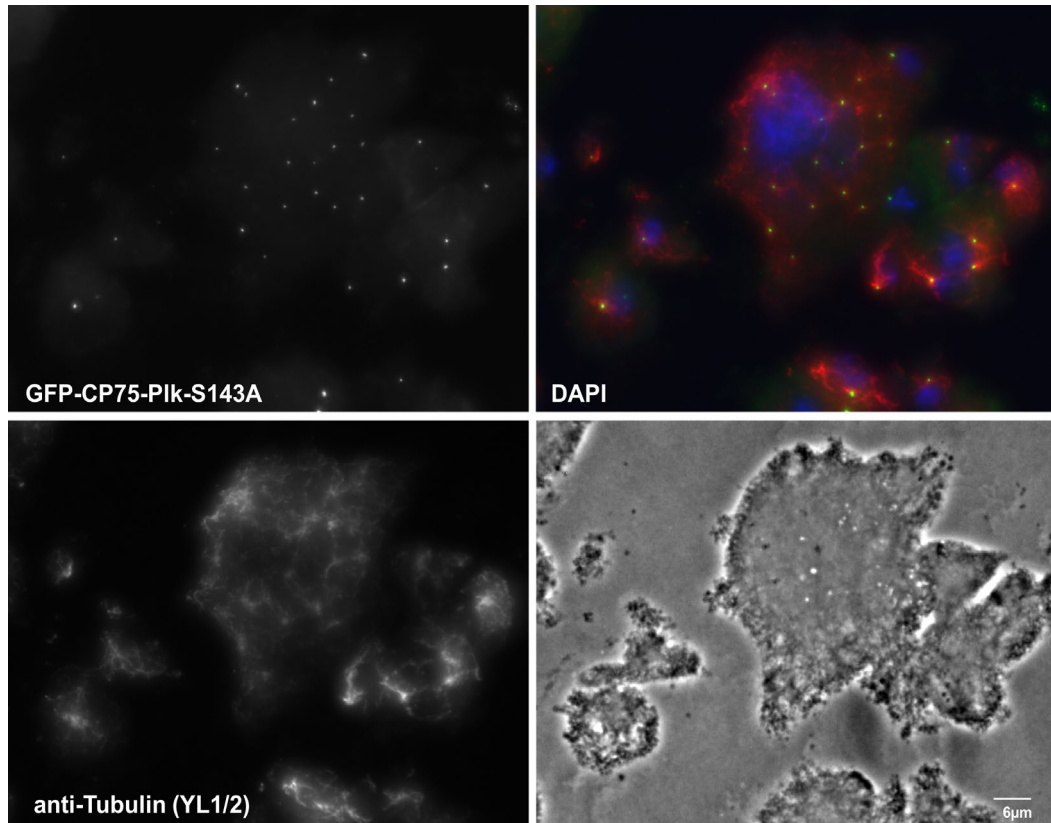


Abbildung 31: GFP-CP75-Plk-S143A-Zellen zeigen den Phänotyp der überzähligen Centrosomen. Die Zellen wurden mit Glutaraldehyd fixiert und mit anti-Tubulin in rot markiert. DNA wurde mit DAPI (blau) gefärbt. GFP-CP75-Plk-S143A ist in grün dargestellt.

2.7 Identifizierung der potentiellen Interaktionspartner von CP75

2.7.1 BioID-Methode

Die Ergebnisse, die in vorangegangenen Kapiteln beschrieben wurde, verleiten zu der Annahme, dass CP75 ein Bestandteil der Core-Struktur ist und dort eine wichtige strukturelle Funktion übernimmt. Identifizierung der potentiellen Interaktionspartner könnten wichtige Hinweise auf die weiteren Protein-Funktionen geben. Es konnte schon gezeigt werden, dass CP75 mit CP39, einem weiteren Protein der Core-Struktur (Schulz *et al.*, 2009b), im *yeast-two-hybrid*-Assay interagiert (Anne Krüger, unveröffentlicht). Mit einer weiteren Methode sollte nun die Interaktion bestätigt und eventuell weitere potentielle Interaktionspartner identifiziert werden.

Ergebnisse

Als eine geeignete Methode erwies sich die BioID-Methode (*proximity dependent biotin identification*), die von Roux und Mitarbeiter entwickelt wurde (Roux *et al.*, 2012). Die Grundlage für diese Methode stellt die Fusion des zu untersuchenden Proteins an die R118G-mutierte Version der Biotin-Ligase (BirA-R118G) aus *Escherichia coli* dar. Durch diese Punktmutation wird die normalerweise für eine bestimmte Erkennungssequenz hochspezifische BirA promiskuitiv und biotinyliert unspezifisch Lysinreste von Proteinen, die sich in unmittelbarer Nähe des Fusionsproteins befinden und damit potentielle Interaktionspartner darstellen (s. Abb. 32). BioID weist eine Reichweite von ca. 10nm auf, was in etwa der Reichweite der weit verbreiteten FRET-Methode (*fluorescence resonance energy transfer*) entspricht (Kim *et al.*, 2014). Der Überschuss an Biotin ermöglicht einen Nachweis einer schwachen oder vorübergehenden Interaktion zwischen Proteinen in ihrer natürlichen subzellulären Umgebung. Die starke und spezifische Bindung von Biotin an Streptavidin erlaubt relativ einfache Reinigung der markierten Proteine unter harschen Waschbedingungen, um die unspezifisch gebundenen Proteine zu entfernen. Die biotinylierten Proteine werden dann mittels Western Blot analysiert. Diese Methode wurde für *Dictyostelium* adaptiert in dem die BirA-R118G-Sequenz an das AT-reiche *Dictyostelium*-Codon-Usage (GC-Gehalt in Exonen beträgt 27%) angepasst wurde (Batsios *et al.*, 2016).



Abbildung 32: Schematische Darstellung der Funktionsweise der BioID-Methode (Batsios *et al.*, 2016).

Als erstes wurde die kodierende Sequenz von CP75 in den Vektor BirA-R118G eingebaut. Das erhaltene Konstrukt wurde in den AX2-Stamm transformiert und unter Zugabe von 50 μ M Biotin kultiviert. Im nächsten Schritt wurde überprüft, ob das Fusionsprotein, das sich unter Zugabe von Biotin auch selbst biotinyliert, die erwartete Lokalisation am Centrosom aufwies. Dafür wurden *Dictyostelium*-Zellen fixiert und mit einem Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Streptavidin-

Ergebnisse

Konjugat markiert. Die Gegenmarkierung erfolgte mit anti-CP75. Als Kontrolle dienten Zellen, die den leeren Vektor BirA-R118G exprimierten. Abbildung 33 zeigt eine repräsentative Kontroll-Zelle, die eine CP75-Markierung am Centrosom aufweist, jedoch kein spezifisches Signal mit Streptavidin-Konjugat zeigt. Die punktförmige Hintergrund-Markierung repräsentiert Mitochondrien, die die endogen biotinylierte Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase enthalten (Batsios *et al.*, 2016). Beim BirA-R118G-CP75-Stamm ist das biotinylierte Centrosom deutlich zu erkennen. Das Signal korreliert mit der CP75-Markierung. Dabei kann es jedoch nicht unterschieden werden, ob es sich um Biotinylierung des Fusionsproteins, des endogenen CP75 oder der anderen Proteine in der unmittelbaren Umgebung handelt.

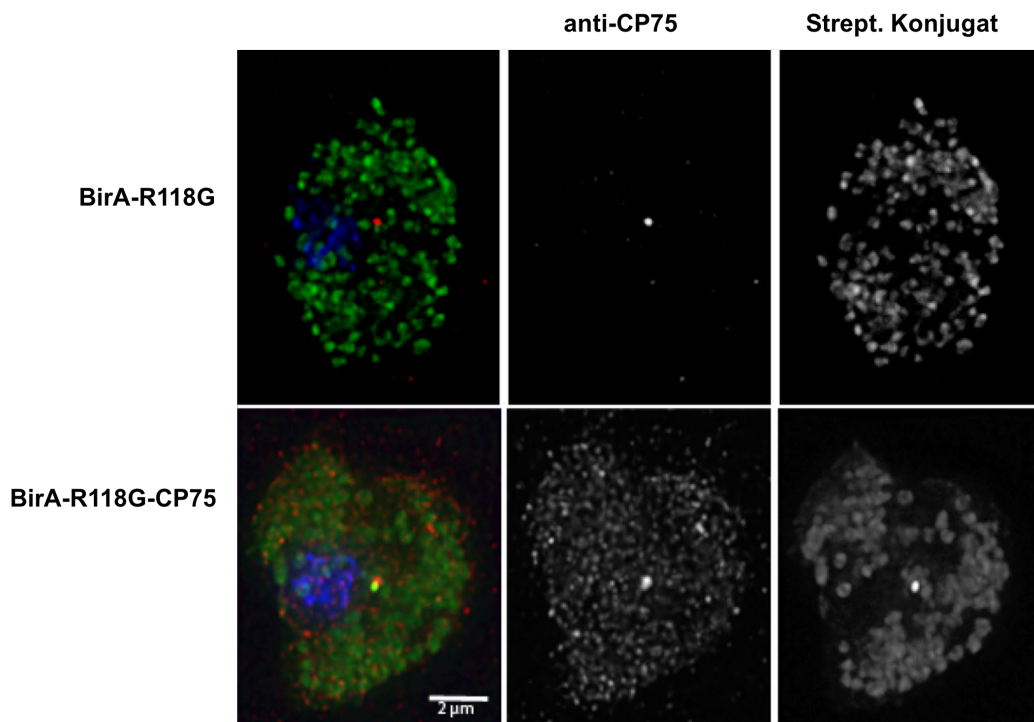


Abbildung 33: Mikroskopische Untersuchung der BirA-R118G-CP75 exprimierenden Zellen. BirA-R118G – und BirA-R118G-CP75-Zellen wurden unter Zugabe von 50 µM Biotin gezüchtet, anschließend mit Glutaraldehyd fixiert und mit anti-CP75 in rot und mit Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Streptavidin-Konjugat in grün markiert. DNA wurde mit DAPI (blau) gefärbt.

Um diese Frage zu klären wurden Centrosomen aus etwa 10^9 BirA-R118G-CP75- und BirA-R118G-Zellen, die als Kontrolle dienten, isoliert (Kapitel 4.3.9) und mit 2M Kaliumjodid behandelt. Die Kaliumjodid-Behandlung solubilisiert die meisten

Centrosom-Proteine aus der dichten Core-Struktur, während die Coronaproteine in großen leicht pelletierbaren Proteinkomplexen verbleiben (Irene Meyer, unveröffentlicht, (Schnackenberg *et al.*, 1998)). Durch Protein-Fällung wurde die Probe (KI-Überstand) aufkonzentriert. Die Probe wurde auf eine breite SDS-PAGE-Tasche geladen und geblottet (Kapitel 4.3.6). Die geblottete Membran wurde in drei Streifen geschnitten und jeder Streifen wurde individuell markiert. Diese Vorgehensweise ermöglichte einen direkten Vergleich der unterschiedlichen Markierungen.

2.7.2 CP75 interagiert mit drei weiteren Core-Proteinen des Centrosoms

Zuerst sollte die Interaktion von CP75 mit dem Core-Protein CP39 bestätigt werden. Für den BirA-R118G-CP75-Stamm und für den Kontrollstamm wurden jeweils drei Antikörper-Markierungen durchgeführt. Durch die Färbung mit dem CP75-Antikörper konnte beim BirA-R118G-CP75-Stamm das Fusionsprotein nachgewiesen werden, das bei etwa 130 kDa läuft (s. Abb. 34 a, Pfeil). Das endogene CP75, das beim Kontrollstamm bei etwa 100 kDa deutlich nachweisbar war (s. Abb. 34 d, Pfeil), war hier dagegen nicht vorhanden. Wie auch schon bei der Überexpression von GFP-CP75 wurde auch im BirA-R118G-CP75-Stamm das endogene Protein offenbar durch den Überschuss an Fusionsprotein am Centrosom ersetzt (s. Kapitel 2.1). Das Fusionsprotein hat sich biotinyliert, was durch die Markierung mit Streptavidin-Konjugat gezeigt werden konnte (s. Abb. 34 a und b). Durch die Markierung mit dem CP39-Antikörper konnte die Interaktion von CP75 mit CP39 bestätigt werden. CP39 lag beim BirA-R118G-CP75-Stamm in biotinylierter Form vor (s. Abb. 34 b und c, Pfeil). Beim Kontrollstamm konnte kein biotinyliertes CP39 nachgewiesen werden (s. Abb. 34 e und f, Pfeil).

isolierte Centrosomen

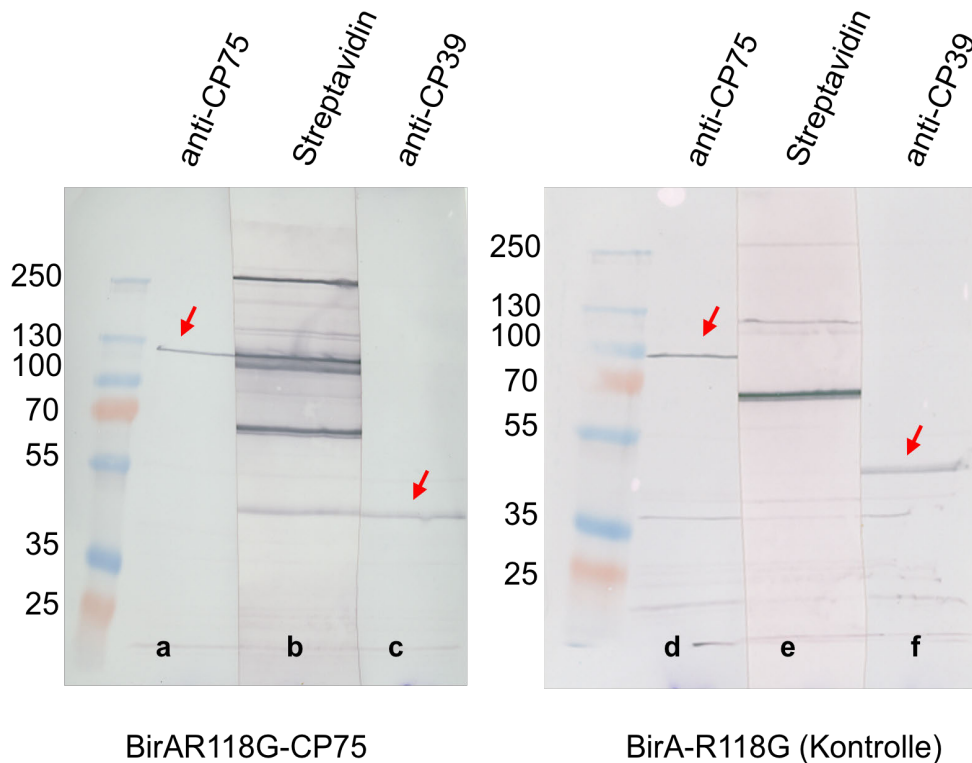


Abbildung 34: Western Blot Analyse der biotinylierten Proteine aus isolierten Centrosomen. Western Blot Membran wurde in Streifen geschnitten und individuell mit anti-CP75, anti-CP39 und Streptavidin-CIP-Konjugat markiert.

Im nächsten Schritt wurden die isolierten Centrosomen des BirA-R118G-CP75-Stamms auf zwei weitere bekannte Proteine der Core-Region CP91 und Cep192 getestet (Putzler et al., 2016; Schulz et al., 2009b). Tatsächlich lagen die beiden Proteine im BirA-R118G-CP75-Stamm in biotinylierter Form vor (s. Abb 35 a und c), im Kontrollstamm dagegen nicht (s. Abb. 35 d und f).

Mit der BioID-Methode konnten somit drei potentielle Interaktoren von CP75, nämlich CP39, CP91 und Cep192, identifiziert werden. Alle drei Proteine sowie CP75 selber gehören zu der Core-Struktur des Centrosoms.

isolierte Centrosomen

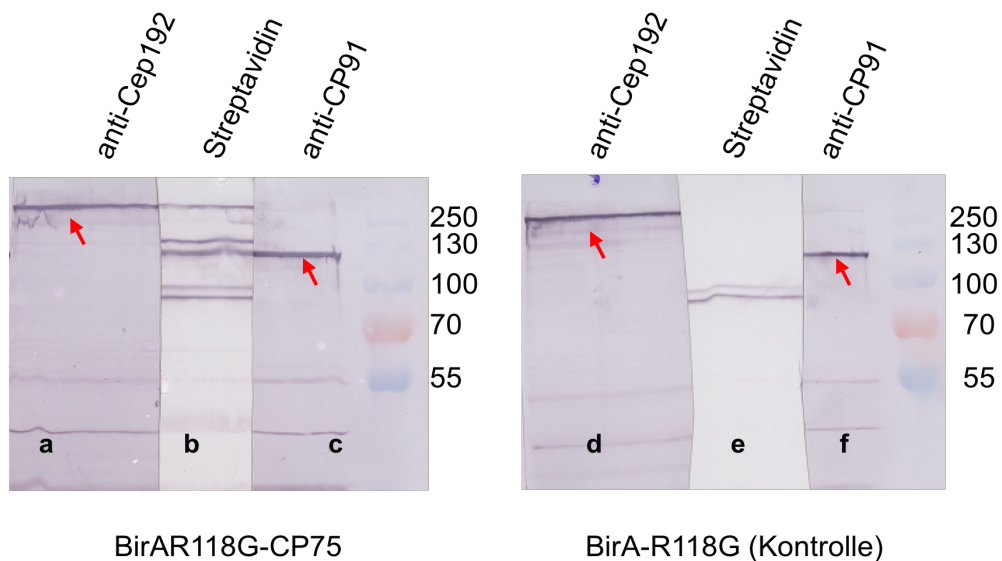


Abbildung 35: Western Blot Analyse der biotinylierten Proteine aus isolierten Centrosomen. Western Blot Membran wurde in Streifen geschnitten und individuell mit anti-CP91, anti-Cep192 und Streptavidin-CIP-Konjugat markiert.

2.7.3 CP75-Knockdown hat keinen Einfluss auf die centrosomale Lokalisation seiner Interaktionspartner

Um zu überprüfen, ob die verminderte CP75-Expression einen Einfluss auf die centrosomale Lokalisation der potentiellen Interaktionspartner CP39, CP91 und Cep192 hat, wurden immunfluoreszenzmikroskopische Untersuchungen durchgeführt. Dafür wurden CP75-RNAi/GFP-Tubulin-Zellen mit Methanol fixiert und mit den Antikörpern gegen den jeweiligen potentiellen Interaktionspartner gefärbt (s. Abb. 36). Alle drei Proteine konnten am Centrosom nachgewiesen werden. Somit ist die centrosomale Lokalisation der drei potentiellen Interaktoren CP39, CP91 und Cep192 unabhängig von CP75.

Ergebnisse

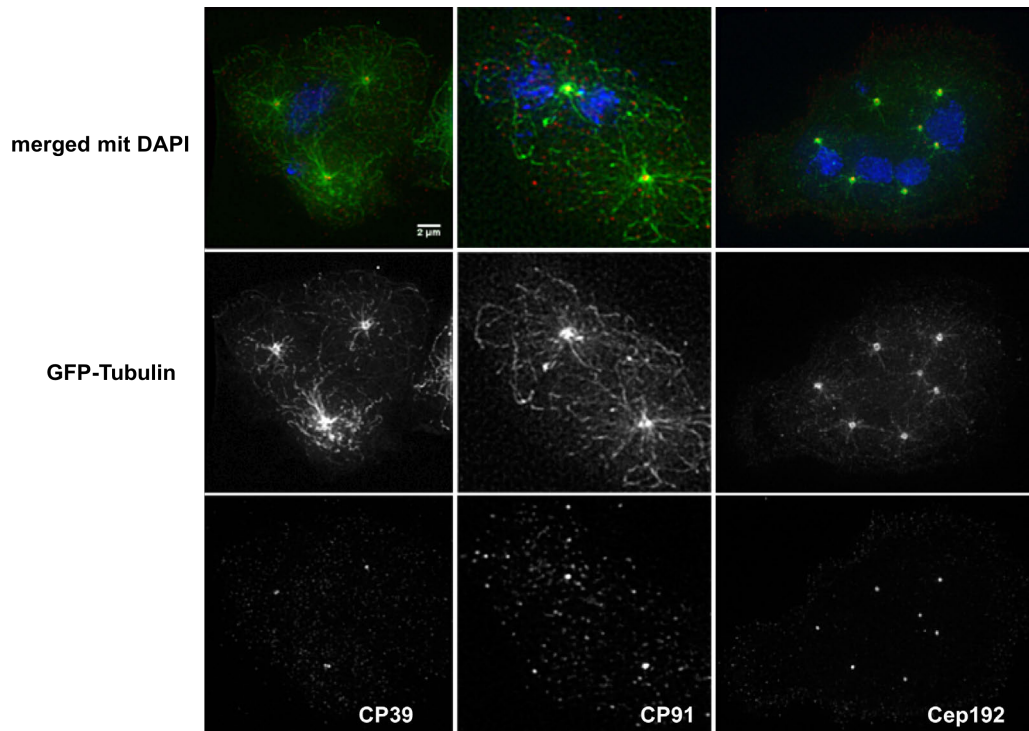


Abbildung 36: CP75-Interaktionspartner lokalisieren am Centrosom trotz verminderter CP75-Expression. CP75-RNAi/GFP-Tubulin-Zellen wurden mit Methanol fixiert und mit anti-CP39, anti-CP91 und anti-Cep192 in rot markiert. GFP-Tubulin-Signal ist in grün dargestellt. DNA wurde mit DAPI (blau) gefärbt.

2.7.4 CP75 zeigt keine direkte Interaktion mit Aktin

Im Kapitel 2.3.2 und 2.4.1 wurde beschrieben, dass GFP-CP75O/E und GFP-CP75-C am Zellkortex lokalisieren. Die Lokalisation korreliert mit der Lokalisation von F-Aktin, was auf eine Interaktion von CP75 mit Aktin hindeutet. Die Interaktion wurde mittels BioID-Methode untersucht. Dafür wurde ein cytosolisches Extrakt aus BirA-R118G-CP75-C-Zellen hergestellt und das Fusionsprotein mit den gebundenen Interaktionspartnern mit magnetischen Streptavidin-Beads aufgereinigt. Die Western Blot Analyse des Eluats ergab, dass drei unbekannte Proteine als potentielle Interaktoren von GFP-CP75 im Cytoplasma in Frage kommen. Die Größe dieser Proteine wurde auf etwa 40 kDa, 22 kDa und 18 kDa geschätzt (s. Abb. 37 A, rote Pfeile). Das Fusionsprotein BirA-R118G-CP75-C hat ein Molekulargewicht von etwa 70 kDa (s. Abb. 37, blaue Pfeile). Im nächsten Schritt wurde überprüft, ob eines dieser Proteine Aktin ist. Der direkte Vergleich der Aktin- und Streptavidin-Markierung zeigte, dass dies nicht der Fall ist. Die Aktin spezifische Bande ist etwas kleiner als die Bande

Ergebnisse

des biotinylierten Proteins, die mit Streptavidin-Konjugat gefärbt wurde. Somit ist anzunehmen, dass es sich bei der Interaktion von CP75 mit Aktin um eine indirekte Interaktion handelt.

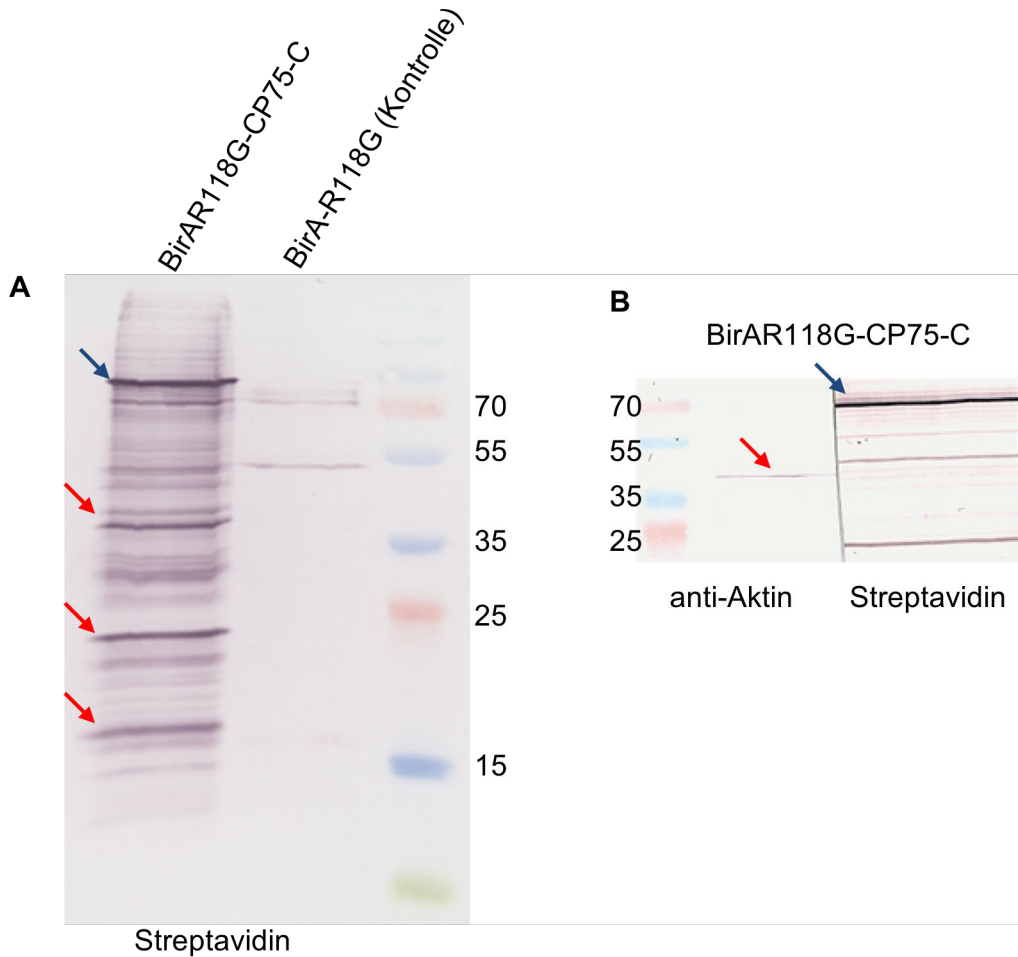


Abbildung 37: Western Blot Analyse der biotinylierten Proteine aus Cytoplasma-Fraktion. Cytoplasma-Fraktionen aus *BirA-R118G-CP75-C*- und *BirA-R118G*-Zellen wurden mit magnetischen Streptavidin-Beads aufgereinigt und auf 15% SDS-Gel (A) bzw. 17% SDS-Gel (B) geladen. (A) Western Blot Membran wurde mit Streptavidin-CIP-Konjugat markiert. (B) Western Blot Membran wurde in Streifen geschnitten und individuell mit Streptavidin-CIP-Konjugat und anti-Aktin markiert.

3 Diskussion

3.1 CP75 ist ein Bestandteil der inneren Lage der Core-Struktur

Die ersten Lokalisationsstudien von GFP-CP75 von Schulz *et al.* haben Hinweise darauf gebracht, dass CP75 ein Bestandteil der Core-Struktur ist (Schulz *et al.*, 2009b). Dies konnte hier bestätigt werden, da auch das endogene CP75 wie GFP-CP75 in der Fluoreszenzmikroskopie im zentralen Bereich des Centrosoms lokalisiert und komplett von der Fluoreszenzmarkierung des Coronamarkers CP224 umgeben ist. Während der Mitose erfolgt die Centrosomverdoppelung durch dynamische Prozesse in der Core-Struktur. Dabei löst sich die mittlere Lage mit dem Beginn des Verdoppelungsprozesses auf und erscheint erst in der Telophase wieder. Das Verschwinden des CP75-Signals in der Metaphase und sein Wiedererscheinen in der Telophase korreliert mit dem Verhalten der mittleren Lage der Core-Struktur während der Centrosomverdoppelung und stärkt damit die Annahme, dass CP75 eine Komponente der mittleren Lage der Core-Struktur ist. Zur weiteren Bestätigung wären in Zukunft eingehendere Analysen mit hochauflösender Lichtmikroskopie oder Elektronenmikroskopie nötig.

3.2 Regulation von CP75

Die Verdoppelung des Centrosoms bedarf strikter Kontrollen, damit es gewährleistet wird, dass sie nur ein Mal pro Zellzyklus stattfindet (Nigg and Stearns, 2011). Dies kann zum einen durch reversible Proteinphosphorylierung und zum anderen durch irreversible Proteindegradation geschehen. Die irreversible Proteindegradation erfolgt im Proteasom und wird durch das Anhängen eines oder mehrerer Ubiquitin-Moleküle an das abzubauen Protein induziert. Die Ubiquitinierung der Proteine erfolgt unter anderem durch APC/C (*anaphase-promoting complex/cyclosome*) und F-Box-Proteine (Pagan and Pagano, 2011). Diese zwei Ubiquitin-Ligasen sind an der Regulation einiger Proteine, darunter dem Cartwheel-Protein SAS-6, beteiligt, die für die Centrosomverdoppelung kritisch sind (Strnad *et al.*, 2007).

Die am besten untersuchte Kinase, die centrosomale Proteine durch Phosphorylierung reguliert, ist die *Polo-like*-Kinase Plk4 in *Drosophila* und Mensch und ihr Homolog ZYG-1 in *C. elegans* (Andersen *et al.*, 2003; Kleylein-

Sohn *et al.*, 2007). Bei einer verminderten Plk4-Expression scheitert die Centriolenverdoppelung, während die Überexpression der Kinase überzählige Centriolen verursacht (Bettencourt-Dias *et al.*, 2005; Cunha-Ferreira *et al.*, 2009; Rodrigues-Martins *et al.*, 2007). Die Assemblierung der Centriolen bedarf noch zusätzlicher Faktoren. Das sind vor allem die centrosomalen Proteine Cep152 und Cep192. Diese binden an Plk4 und rekrutieren die Kinase an die Centriolen (Fu *et al.*, 2015). In *Dictyostelium* wurden mögliche Orthologe von Cep192 und *Polo-like*-Kinase Plk1 identifiziert. Diese lokalisieren am Interphase-Centrosom und an den Spindelpolen in der Metaphase und könnten bei der Centrosomverdoppelung in *Dictyostelium* eine große Rolle spielen (Schulz *et al.*, 2009b).

Mittels der BioID-Methode wurde eine Interaktion von Plk1 mit CP75 gezeigt (s. Abb. 38; Dr. Irene Meyer, unveröffentlicht), was ein wichtiges Indiz für die regulatorische Funktion von Plk1 bei CP75 darstellt. Die Lokalisationsanalyse von CP75 in Zellen, die eine Punktmutation in der Konsensussequenz der Plk1 tragen, bestärkt diese Hypothese. Dabei wurde das Serin 143 gegen Alanin ausgetauscht, was das Phosphorylieren von CP75 durch Plk1 unmöglich machte. Diese Zellen zeigten permanente Lokalisation von GFP-CP75-Plk-S143A am Centrosom während der Mitose. Ein möglicher Grund für dieses Verhalten, der weitere Untersuchungen bedarf, könnte die Überexpression des GFP-Fusionsproteins sein. Auch GFP-CP75O/E lokalisiert in allen Mitosestadien am Centrosom bzw. an den Spindelpolen. Eine permanente centrosomale Lokalisation könnte theoretisch allein durch den Überschuss an GFP-Fusionsprotein im Cytosol zu Stande kommen. Während der Mitose durchläuft das Centrosom massive Veränderungen. Seine kompakte Proteinstruktur lockert sich und nun frei gewordene CP75-Bindestellen könnten von GFP-CP75, das in größeren Mengen vorliegt, auch im Falle einer geringeren Affinität während der Mitose besetzt werden. Dieser Aspekt müsste näher untersucht werden, in dem ein *Dictyostelium*-Stamm mit einmaliger Insertion des GFP-CP75-Plk-S143A-Gens und damit mit keiner bzw. geringerer Überexpression erzeugt und analysiert wird. Dies war in dieser Arbeit nicht erfolgreich. Ein anderer möglicher Grund für die permanente Lokalisation der Punktmutante während der Mitose könnte die Notwendigkeit der Phosphorylierung der Core-Proteine durch Plk1 sein, um das Auflösen der mittleren Lage der Core-Struktur in der Mitose zu ermöglichen.

Diskussion

Wenn CP75 durch die Punktmutation nicht mehr phosphoryliert werden kann, dann kann die Dissoziation des Proteins von der Core-Struktur nicht mehr stattfinden. In dem Fall verbleibt GFP-CP75-Plk-S143A am Centrosom während der gesamten Mitose. Den gleichen Phänotyp zeigt auch das C-terminale Fragment von CP75 (GFP-CP75-C), dem die Erkennungssequenz für Plk1 fehlt. GFP-CP75-C lokalisiert in allen Mitosestadien am Centrosom. Die Fehllokalisierung von GFP-CP75-Plk-S143A in der Metaphase bestärkt die Annahme, dass Plk1 CP75 reguliert. Es wäre denkbar, dass CP75 am Übergang von der Prometaphase zu Metaphase phosphoryliert wird. Diese Modifikation könnte nicht nur die Dissoziation von CP75 von der Core-Struktur sondern auch das Auflösen der kompakten Proteinstruktur begünstigen. Wenn aber das Protein nicht mehr phosphoryliert werden kann, verbleibt es in größeren Komplexen und kann möglicherweise nicht mehr abgebaut bzw. abtransportiert werden.

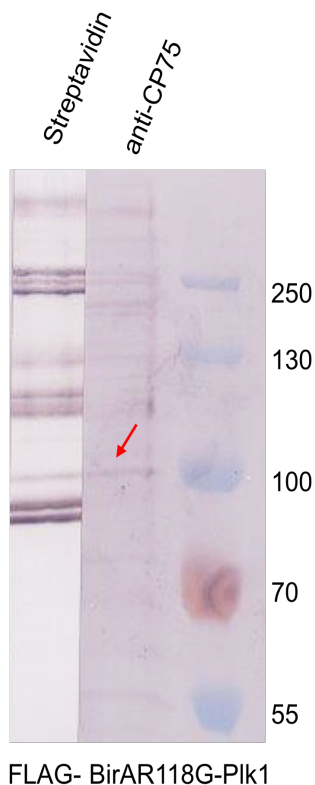


Abbildung 38: Western Blot Analyse der biotinylierten Proteine. Aus FLAG-BirA-R118G-Plk1 wurden Centrosomen isoliert und auf SDS-Gel geladen. Western Blot Membran wurde in Streifen geschnitten und mit anti-CP75 und Streptavidin-CIP-Konjugat markiert. Die Bande mit der Größe 100 kDa (Pfeil) stellt das endogene CP75 dar, das auch biotinyliert vorliegt (Streptavidin-Markierung). Die Daten wurden von Dr. Irene Meyer zur Verfügung gestellt (unveröffentlicht).

Neben Plk1 könnten unter den Kinasen noch zwei weitere mögliche mitotische Regulatoren für CP75 in Frage kommen. Zum einen die Cyclin-abhängige Kinase 1 (CDK1) und zum anderen die *NIMA-related* Kinase (Nek2). Beide sind dafür bekannt in höheren Organismen regulatorische Funktionen am Centrosom zu

übernehmen und weisen eine hohe katalytische Aktivität in der frühen Mitose auf (Wang *et al.*, 2014).

Neben seiner Rolle bei der Initiation der M-Phase ist CDK1 beim *disengagement* von Mutter- und Tochtercentriolen vor der Centrosomverdoppelung beteiligt (Wang *et al.*, 2014). In *Dictyostelium* sind die Funktionen von CDK1 noch wenig untersucht. Sie reguliert den Eintritt in die Mitose und scheint Funktionen während des vegetativen Wachstums und in den frühen Stadien der Entwicklung zu haben (Harry MacWilliams, unveröffentlicht (Huber, 2014)). Für CP75 wurden mittels ELM zwei CDK1-Erkennungssequenzen sowohl am N- als auch am C-Terminus von CP75 vorhergesagt (Dinkel *et al.*, 2015). Ob CDK1 an der Regulation von CP75 beteiligt ist, müsste in einer zukünftigen Forschungsarbeit untersucht werden.

Das humane Nek2 ist bei der Bildung der bipolaren Spindel sowie der Rekrutierung der Centrosomenproteinen beteiligt (Fry *et al.*, 1998). In *Drosophila* soll die Kinase eine regulatorische Rolle in der späten Mitose spielen (Prigent *et al.*, 2005). In *Dictyostelium* wurde ein Homolog der Nek2-Kinase identifiziert. DdNek2 lokalisiert am Centrosom und scheint in die MTOC-Assemblierung involviert zu sein (Gräf, 2002). Für CP75 wurde durch das ELM (*Eukaryotic Linear Motif resource*) zehn mögliche Erkennungssequenzen für DdNek2 vorhergesagt (Dinkel *et al.*, 2015). Zur Überprüfung einer möglichen Regulation durch DdNek2 müssten die Erkennungssequenzen bei CP75 mutiert und die resultierenden Auswirkungen auf seine Lokalisation untersucht werden. Dazu könnte man zuerst überprüfen welche der zehn Nek2-Erkennungssequenzen tatsächlich in der Mitose phosphoryliert vorliegen. Dafür müsste man *Dictyostelium*-Zellen so synchronisieren, dass hauptsächlich mitotische Zellen in der Zellkultur vorliegen. Die Synchronisation der tierischen Zellen ist eine weit verbreitete Methode und bietet eine Vielfalt von verschiedenen Protokollen an, bei denen man vor allem mit MT-depolymerisierenden Chemikalien Nocodazol oder Colchicin arbeitet (Banfalvi, 2011). Diese eignen sich aber nur bedingt für *Dictyostelium*, weil die Amöbe keinen Spindel-Checkpoint aufweist, weshalb die Zellen nach der Mitose wieder, nun mit erhöhter Ploidie, in die nächste Interphase gehen und so keine ausreichende Synchronisation erreicht werden kann (Kitanishi

et al., 1984; Ma *et al.*, 1999). Von Sutherland *et al.* wurde aber eine erfolgreiche Synchronisationsmethode durch Kälteschock für *Dictyostelium* beschrieben (Sutherland *et al.*, 2001). Diese angewendet, könnte aus einer ausreichenden Anzahl synchronisierter Zellen, die sich in der Mitose befinden, CP75 isoliert und mittels Massenspektrometrie auf mögliche phosphorylierte Sequenzen untersucht werden. Im nächsten Schritt könnten dann die DdNek2-Erkennungssequenzen, die eine Phosphorylierung aufweisen, mutiert werden. Die Auswirkungen der Punktmutation auf die CP75-Lokalisation würden Hinweise darauf geben, ob DdNek2 eine Rolle bei der mitotischen Regulation von CP75 spielen könnte. Derzeit ist eine Aussage über potentielle regulatorische Funktionen von DdNek2 bei CP75 nicht möglich.

3.3 Lokalisation von CP75 am Zellcortex

Der Phänotyp der GFP-CP75 überexprimierenden Zellen sowie GFP-CP75-C Zellen ist recht ungewöhnlich für ein centrosomales Protein der inneren Core-Struktur. Die Lokalisation am Zellcortex sowie die Kolokalisation mit F-Aktin weist auf die Interaktion von CP75 mit dem Aktin-Netzwerk hin. Mittels BioID konnte nachgewiesen werden, dass es sich dabei nicht um eine direkte Interaktion mit Aktin handelt. Eines der biotinylierten Proteine, welches als cytosolischer Interaktionspartner von CP75 in Frage kommt, hat ein geringfügig größeres Molekulargewicht als Aktin und könnte eine Rolle als Verbindungsglied zwischen dem centrosomalen Protein CP75 und Aktin spielen. Dabei könnte es sich möglicherweise um ein *Acti-related protein 1* (Arp1) handeln. Das hoch konservierte Protein ist etwa 43 kDa groß und ist ein Bestandteil des Dynactin-Komplexes (Schroer, 2004). Es lokalisiert am Centrosom in Säugerzellen und am Spindelpolkkörper in Hefen (Clark and Meyer, 1992; Gill *et al.*, 1991; Kahana *et al.*, 1998). Außerdem lokalisiert der Protein-Komplex an den Plus-Enden von Mikrotubuli und am Zellcortex (Fujita *et al.*, 2015; Valetti *et al.*, 1999; Vaughan *et al.*, 1999). Zusammen mit Dynein ist Dynactin neben vielen anderen Funktionen an dem gerichteten Transport von Proteinen entlang der Mikrotubuli und unter anderem an der Rekrutierung von wichtigen regulatorischen Proteinen an das Centrosom beteiligt (Schroer, 2004). In *Dictyostelium* lokalisiert Dynein am Centrosom und am Zellcortex und scheint zusammen mit Dynactin eine wichtige Rolle bei der Centrosomverdoppelung zu spielen (Hestermann *et al.*,

2002; Ma *et al.*, 1999). Das endogene CP75 dissoziiert vom Centrosom in der Prometaphase ab. In der späten Anaphase muss das Protein aber wieder an das Centrosom zurück rekrutiert werden. Da CP75 aber im Cytosol nur in kaum nachweisbaren Mengen vorhanden ist, ist der Transport von CP75 bei der Rekrutierung durch einfache Diffusion nur schwer vorstellbar. Wahrscheinlicher erscheint hier, dass ein schneller gerichteter Transport stattfindet. Möglicherweise bindet CP75 an den Dynein/Dynactin-Komplex und wird in der späten Anaphase entlang der Mikrotubuli zum Centrosom transportiert. Bei einem Überschuss an Protein, der durch Überexpression zu Stande kommt, bindet CP75 an seinen möglichen Interaktionspartner Arp1 und verbleibt am Zellcortex. Die Lokalisation von GFP-CP75-C könnte auf die Arp1-Bindestelle am C-Terminus von CP75 hinweisen.

3.4 Funktion von CP75 in der Zelle

Die Lokalisation von CP75 in der Core-Struktur des Centrosoms lässt vermuten, dass CP75 eine Rolle bei der Centrosom-Biogenese spielt. Die Ergebnisse der FRAP-Experimente deuten darauf hin, dass CP75 eine strukturelle Funktion am Centrosom übernimmt, da das Protein dort keine Mobilität aufweist. Eine mögliche Funktion im strukturellen Erhalt des Centrosom könnte die Regulation der Centrosomengröße nach der Verdoppelung sein. Sowohl GFP-CP75-N als auch CP75-RNAi weisen vergrößerte bzw. verlängerte MTOCs auf. Dabei ist es anzumerken, dass die GFP-CP75-N Zellen genauso wie CP75-RNAi Zellen eine deutlich verminderte Menge an endogenem CP75 am Centrosom aufweisen. Demzufolge sind die phänotypischen Veränderungen am Centrosom wahrscheinlich auf den Mangel an endogenem CP75 zurückzuführen. Möglicherweise ist CP75 der limitierende Faktor beim Wachstum der neu gebildeten Core-Struktur des duplizierten Centrosoms. Wenn das Protein nicht da bzw. nicht funktionell ist, dehnt sich die kompakte Proteinstruktur in der Core-Region aus. Diese verlängerte Core-Struktur weist andere bekannte Core-Proteine auf wie CP39, CP91 und CP55 und ist über die gesamte Länge von Corona umgeben. Das spricht dafür, dass diese verlängerten MTOCs echte Centrosomen sind.

Diskussion

Die Analyse der lebenden CP75-RNAi/GFP-Tubulin-Zellen weist auf eine wichtige Funktion von CP75 bei der Centrosomverdoppelung in den frühen Mitosestadien hin. Wie im Kapitel 2.5.4 beschrieben, haben die Zellen Probleme bei der Bildung der mitotischen Spindel. Es findet zwar eine Verdoppelung der MTOCs in der Prometaphase statt, es wird aber keine zentrale Spindel gebildet und es kommt nur zu einer geringen Trennung der beiden Spindelpole. Da *Dictyostelium* keinen Spindel-Checkpoint aufweist (Ma *et al.*, 1999), durchlaufen die Zellen die nächsten Zellzyklen ohne Karyo- und Cytokinese. Dies hat stark vergrößerte oft mehrkernige Zellen zur Folge. Die Zellkerne sind häufig sehr groß, unregelmäßig geformt und mit mehr als einem Centrosom assoziiert. Die duplizierten Centrosomen zeigen einen Defekt in der Ausbildung der Spindel, sind aber in der Lage kurze astrale Mikrotubuli zu bilden, die von den Centrosomen strahlenförmig ausgehen. Normalerweise sind die, an den astralen Mikrotubuli ansetzenden cortikalen Motokräfte bei der Separation der beiden Spindelpole beteiligt (Tikhonenko *et al.*, 2016). Da aber bei der oben beschriebenen Mutante die Separation nur geringfügig stattfindet, wäre es denkbar, dass dieser Prozess durch das fehlende CP75 gestört wird.

Den Phänotyp der großen Zellen mit überzähligen Centrosomen sowie mit vergrößerten ungleichmäßig geformten Zellkernen weisen auch GFP-CP75-Plk-S143A-Zellen auf. Auch in diesen Zellen ist die Menge an endogenem CP75 am Centrosom stark vermindert. Ausgehend von den Zelldefekten wäre es denkbar, dass die Punktmutation zum Verlust der Funktionalität des Proteins und somit zum dominant negativen Effekt führt. Sowohl der GFP-CP75-Plk-S143A- als auch der CP75-RNAi-Phänotyp war in den Zellen am stärksten ausgeprägt, die gleich nach der Transformation und Selektion untersucht wurden. Mit zunehmender Kultivierungsdauer der Mutanten wurde der Phänotyp, wahrscheinlich aufgrund eines starken Selektionsdruckes gegen den Defekt, teilweise kompensiert. Aufgrund der geringen Zellzahl, die nach einer solchen kurzen Kultivierungsdauer zu Stande kommt, war es nicht möglich alle vorgesehenen Experimente mit diesen Zellen durchzuführen. Für die meisten Untersuchungen war es notwendig die Zellen länger zu kultivieren.

Die Analyse der Lokalisation von CP75 während der Mitose schließt eine direkte Regulation des CP75 an der Spindelbildung aus, da der Prozess der Spindelbildung erst in der frühen Metaphase erfolgt wo das endogene CP75 nicht mehr nachweisbar ist. Allerdings könnte das Protein in den frühen Mitosestadien weitere Proteine regulieren bzw. aktivieren, die bei der Ausbildung der Spindel eine wichtige Rolle spielen könnten. Der Mechanismus der Spindelbildung in verschiedenen Organismen ist immer noch nicht vollständig aufgeklärt. Allerdings wurde schon durch einige Forschungsarbeiten gezeigt, dass zwei mitotische Serin-Threonin-Kinasen Plk1 und AurA und ihre Orthologe in verschiedenen Organismengruppen eine Schlüsselrolle bei der Rekrutierung von γ -Tubulin und der Ausbildung der bipolaren Spindel spielen (Joukov *et al.*, 2014; Lane and Nigg, 1996; Meng *et al.*, 2015). Außerdem wurde in den neuesten Studien gezeigt, dass Plk1 mit dem konservierten centrosomalen Protein Cep192 interagiert und dadurch an das Centrosom rekrutiert wird (Meng *et al.*, 2015). Es wäre denkbar, dass die Regulation der Spindelbildung in *Dictyostelium* ähnlich verläuft. Sowohl Cep192 als auch Plk1 lokalisieren in *Dictyostelium* am Centrosom bzw. an den Spindelpolen während der gesamten Mitose (Schulz *et al.*, 2009b). Mittels BioID wurde gezeigt, dass CP75 mit den beiden Proteinen interagiert. Durch diese Interaktion könnte in der frühen Mitose die Regulationsmechanismen der Spindelbildung ausgelöst werden. Wenn aber die Expression von CP75 durch RNAi gehemmt wird, fehlt dem Cep192 sein Interaktionspartner, der für die Aktivierung von Plk1 und somit für die Ausbildung der mitotischen Spindel notwendig sein könnte. Um die Hypothese zu bestätigen, sollte zukünftig gezeigt werden, dass CP75 für die Rekrutierung von Plk1 notwendig ist. Dafür müsste eine CP75-RNAi/GFP-Plk1-Doppelmutante generiert und hinsichtlich der GFP-Plk1-Lokalisation untersucht werden.

3.5 Die Rolle von CP75 bei der posttranslationalen Modifikation von Tubulin

Die verminderte Expression von CP75 in CP75-RNAi-Zellen sowie die nichtphosphorylierbare Punktmutation in GFP-CP75 verursachen den Phänotyp der stabilen detyrosinierten Mikrotubuli. Es ist seit langem bekannt, dass in Säugerzellen die meisten α -Tubulin-Isoformen mit dem genetisch codierten C-terminalen Tyrosin synthetisiert werden (Hallak *et al.*, 1977). Das Tyrosin wird

Diskussion

im Rahmen einer posttranslationalen Modifikation durch eine Carboxypeptidase abgespalten, kann aber an in Mikrotubuli eingebundenes α -Tubulin nicht wieder angehängt werden. Die tyrosinierten Mikrotubuli sind dynamisch und haben eine kurze Lebensdauer von 3-5 Minuten. Sind Mikrotubuli jedoch z.B. durch Bindung bestimmter Mikrotubuli-assoziiierter Proteine stabilisiert, so hat die recht langsam arbeitende Carboxypeptidase Zeit zur Detyrosinierung (Webster *et al.*, 1987). Detyrosinierung ist also eher ein Symptom von stabilen Mikrotubuli als dass sie selbst stabilisierend wirkt. Detyrosinierte langlebige Mikrotubuli sind stabil gegen Mikrotubuli-depolymerisierende Substanzen, wie Nocodazol oder Thiabendazol, die über die Bindung an Tubulindimere wirken (Yu *et al.*, 2015). Die Mikrotubuli in CP75-RNAi/GFP-Tubulin-Zellen, die nicht mit YL1/2 färbbar sind, werden kaum durch TBZ-Behandlung abgebaut. Dies zeigt, dass die Mikrotubulidynamik in diesen Zellen tatsächlich verändert ist. Die Forschungsergebnisse von Samereier *et al.* haben gezeigt, dass die Mikrotubuli in *Dictyostelium* eine hohe Dynamik in der Peripherie aufweisen, nicht aber im pericentrosomalen Bereich, wo sie weitgehend stabil sind (Samereier *et al.*, 2010a). Diese Erkenntnisse wurden mittels FRAP-Analysen gewonnen. Die stabilen nicht dynamischen Mikrotubuli zeigten demnach keine Regeneration des GFP-Tubulin-Signals nach dem Bleichen. Im Gegensatz dazu erholte sich das GFP-Tubulin-Signal an der Peripherie der Zelle sehr schnell. In zukünftigen Experimenten soll überprüft werden, ob die CP75-RNAi/GFP-Tubulin-Zellen keine solche Mikrotubulidynamik an der Zellperipherie aufweisen, was somit bestätigen würde, dass es sich tatsächlich um stabile Mikrotubuli handelt.

Während die Carboxypeptidase, die die Detyrosinierung katalysiert immer noch unbekannt ist, stellt ihr Antagonist, die Tubulin-Tyrosin-Ligase (TTL), das am besten untersuchte Tubulin modifizierende Enzym dar (Janke and Bulinski, 2011). TTL kann α -Tubulin nur in den gelösten Tubulindimeren, nicht aber an Mikrotubuli tyrosinieren, weshalb der einmal detyrosinierte Zustand an stabilisierten Mikrotubuli so lange erhalten bleibt, bis diese schließlich doch depolymerisieren und unter Einbau von tyrosinierten Tubulindimeren wieder aufgebaut werden. Es gibt bis heute keine Untersuchungen darüber, ob in *Dictyostelium* posttranslationale Modifikationen von α -Tubulin stattfinden. Das vollständig sequenzierte Genom von *Dictyostelium* weist jedoch einen möglichen

Diskussion

Kandidaten für TTL auf (DDB_G0281541, *dictybase*), weshalb auch bei *Dictyostelium* ein Detyrosinierungs-/Tyrosinierungszyklus postuliert wurde. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sind die ersten experimentellen Beweise dafür, dass diese posttranslationale Modifikation an Tubulinen bei *Dictyostelium* tatsächlich stattfindet. Dabei wirkt CP75 dem Detyrosinierungsprozess entgegen, da das Fehlen des Proteins die Anreicherung der detyrosinierten Mikrotubuli begünstigt. Es wäre denkbar, dass CP75 an der Rekrutierung solcher Mikrotubuli-assoziierten Proteine beteiligt ist, die diese dynamisch halten und somit der Stabilisierung der Mikrotubuli entgegenwirken. In zukünftigen Forschungsarbeiten soll die subzelluläre Lokalisation von TTL in *Dictyostelium* untersucht werden. Dies sollte bei der Aufklärung der Frage helfen, welche Rolle das centrosomale Protein CP75 beim Detyrosinierungs-/Tyrosinierungszyklus spielen könnte.

4 Material und Methoden

4.1 Material

4.1.1 Chemikalien und Antibiotika

Alle Chemikalien und Reagenzien wurden bei Carl Roth, Sigma-Aldrich, AppliChem und Biomol mit dem Reinheitsgrad „p.a.“ käuflich erworben.

Antibiotika

Blasticidin S

Genecitin (G418)

Penicillin/Streptomycin

Ampicillin

Kanamycin

4.1.2 Antikörper

Primäre Antikörper

Anti-CP75, Kaninchen Antiserum	diese Arbeit
Anti-CP39, Kaninchen Antiserum	Dr. Irene Meyer, unveröffentlicht
Anti-CP55, Kaninchen Antiserum	(Kuhnert <i>et al.</i> , 2012a)
Anti-CP91, Kaninchen Antiserum	(Putzler <i>et al.</i> , 2016)
Anti-CP148, Kaninchen Antiserum	(Kuhnert <i>et al.</i> , 2012b)
Anti-NE81, Kaninchen Antiserum	(Kruger <i>et al.</i> , 2012)
Anti-CP224, mAB, 2/165	(Gräf <i>et al.</i> , 1999)
Anti-SUN, Kaninchen Antiserum	(Schulz <i>et al.</i> , 2009a)
Anti-Tubulin, mAB, YL1/2	Chemicon

Sekundäre Antikörper

Ziege-anti-Kaninchen Alexa Fluor 488 oder 568	Invitrogen
Ziege-anti-Maus Alexa Fluor 488 oder 568	Invitrogen
Ziege-anti-Ratte Alexa Fluor 488 oder 568	Invitrogen
Streptavidin-Konjugat Alexa Fluor 488	Invitrogen
Phalloidin-Konjugat Alexa Fluor 568	Invitrogen
Ziege-anti-Maus alkalische Phosphatase Konjugat	Sigma
Ziege-anti-Kaninchen alkalische Phosphatase Konjugat	Sigma
Ziege-anti-Maus Meerrettich Peroxidase Konjugat	Dianova
Ziege-anti-Kaninchen Meerrettich Peroxidase Konjugat	Dianova

4.1.3 Puffer und Lösungen

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% Essigsäure; 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)

Materialien und Methoden

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

Mowiol

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

Phosphatpuffer / Soerensen-Puffer

14,6 mM KH₂PO₄; 2 mM Na₂PO₄; pH 6,0

PHEM (Schliwa, 1982)

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

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

TBST

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

TE-Puffer

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

4.1.4 Plasmide

pIS76 (Schulz *et al.*, 2009b)

pIS77 (Schulz *et al.*, 2009b)

GFP-CP750/E Anne Krüger, unveröffentlicht

cherry-Histon 2B Dr. Annette Müller-Taubenberger

GFP-dDlimΔcoil Dr. Annette Müller-Taubenberger

BirA-R118G (Batsios *et al.*, 2016)

4.1.5 Bakterien und *Dictyostelium discoideum* Stämme

E. coli TOP10 (Invitrogen) wurden für Klonierungen verwendet. *E. coli* KS1000 und Rosetta (New England Biolabs) wurden für die bakterielle Proteinexpression verwendet. *Klebsiella aerogenes* (Williams and Newell, 1976) wurden zur Kultivierung von *Dictyostelium discoideum* verwendet.

Dictyostelium-Stamm AX2-214, ein axenisch wachsendes Derivat des Isolats NC-1 (Raper, 1935), wurde in dieser Arbeit als Wildtypstamm verwendet und als AX2 bezeichnet. Alle in dieser Arbeit verwendeten Mutanten wurden durch die Transformation von AX2 generiert.

Dictyostelium-Stämme, die nicht in dieser Arbeit erzeugt wurden:

GFP- α -Tubulin (Rehberg and Gräf, 2002)

GFP-CP75 (Schulz *et al.*, 2009b)

MBP-CP75-N (Anne Krüger, unveröffentlicht)

4.1.6 Software und Online-Datenbanken

Microsoft Office 2007, Adobe Photoshop CS5, ApE *plasmid editor* 1.13, Biorad Quantity One 4.0.3, AxioVision 4.8.2, EndNote X3, Mac Biophotonics ImageJ

Dictyostelium Datenbank <http://www.dictybase.org/>

NCBI Pubmed <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>

ELM motif search <http://elm.eu.org/search/>

Coiled coil- Vorhersage <http://www.ch.embnet.org/>

4.2 Molekularbiologische Methoden

4.2.1 Verwendete Oligonukleotide

CP75-RNAi-AfIII-f

TAAATTCTTAAGCAATGATTTCAAATATACAGAAACAAAATC

CP75-RNAi-Bam-r

GCAATGGATCCTTAATGTAATGGTGTAATGATATACTAC

CP75-RNAi-Kpn-r

GCAATGGTACCTTAATGTAATGGTGTAATGATATACTAC

CP75-RNAi-Sal-f

TAAATTGTCGACCAATGATTTCAAATATACAGAAACAAAATC

CP75-C-Sal-for

AAAAAGTCGACTAATTGGAAATAATAATAAAAAGGTTAC

CP75-N-Bam-rev

AAAGGATCCTTAATTTCCAATATTTCCAATATTTCC

CP75-Plk-TA-f

GGATTTTGAAAGTGCTATATCATTACACC

CP75-Plk-TA-r

GGTGTAATGATATAGCACTTTCAAATCC

VP1-1Sal

TAAATTGTCGACTAATGATTTCAAATATACAGAAACAAAATC

VP1-2Bam

TTTGGATCCTTAAAATATATCATTCTTGTTTTAAAAGGAG

4.2.2 Agarosegelelektrophorese

Die Auftrennung der DNA-Fragmente nach ihrer Größe erfolgte in 1%-Agarosegelen im TAE-Puffer. Vor dem Beladen der Gele wurden die DNA-Proben mit 6xTAE Ladepuffer versetzt. Für die Abschätzung der Größe und der Konzentration einzelner DNA-Banden wurde ein 1 kb Standard (GeneRuler™, Fermentas) verwendet. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte mit 5 V/cm. Anschließend wurden die Gele zur Detektion der DNA-Banden in 1 µg/ml Ethidiumbromid in TAE Laufpuffer für 20 min Inkubiert. Die DNA-Banden wurden mit Hilfe des Gel Doc 2000-Systems (BioRad) analysiert.

4.2.3 DNA Extraktion aus Agarosegelen

Die DNA-Banden wurden auf dem ECX-20-M UV-Strahler (Peqlab) ausgeschnitten, in ein steriles 1,5ml Gefäß überführt und gewogen. Die Extraktion der DNA erfolgte mit *NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up* von Macherey-Nagel nach dem, vom Hersteller empfohlenen Protokoll.

4.2.4 Mini-Präparation von Plasmid DNA aus *E. coli*

Eine durch Transformation erhaltene Bakterienkolonie wurde in 3ml LB-Medium (Formedium) mit dem entsprechenden Antibiotikum überführt und über Nacht bei 37°C und 230 rpm vermehrt. Nach der Ernte (1 min, max. Geschwindigkeit, Tischzentrifuge) wurde der Überstand verworfen und das Pellet in 200 µl Lösung I resuspendiert. Nach der Zugabe von 200 µl Lösung II wurden die Proben vorsichtig invertiert und für 2 min bei RT inkubiert. Es folgte die Zugabe von 200 µl Lösung III und eine zehnmünütige Zentrifugation bei maximaler Geschwindigkeit. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 350 µl Isopropanol (0,7 Vol%) versetzt. Nach dem Vortexen wurden die Proben für 5 min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 70% Ethanol gewaschen, bei 50°C getrocknet und anschließend in 50 µl *A.dest* gelöst.

Lösung I

50 mM Tris-HCl; 10 mM EDTA; 100 µg/ mL RNase A; pH 8,0

Lösung II

200 mM NaOH; 1% SDS

Lösung III

2.8 M KAc; pH 5,1

4.2.5 Midi-Präparation von Plasmid DNA aus *E. coli*

Midi-Plasmid Präparationen erfolgten mit dem Kit *Nucleobond PC 100* (Macherey und Nagel) nach Herstellerangaben.

4.2.6 Präparation genomischer DNA aus *Dictyostelium*

Die Präparation genomischer DNA aus *Dictyostelium*-Zellen erfolgte mit dem Kit *NucleoSpin® Tissue* von Macherey-Nagel nach dem vom Hersteller empfohlenen Protokoll.

4.2.7 Bestimmung der DNA Konzentration

Die gelöste DNA wurde 1:200 in *A. dest* verdünnt und bei 260 nm im Cary 50-Spektrometer (Varian) gemessen. Eine $OD_{260}=0,1$ entsprach dem DNA-Gehalt von 1 µg/µl.

4.2.8 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Amplifizierung von DNA-Fragmenten für Klonierungen wurde mit *Phusion High-Fidelity* DNA Polymerase von Thermo Scientific durchgeführt. Die Zusammensetzung der Reagenzien in ein entsprechendes PCR-Reaktionsgefäß erfolgte auf Eis

	Für 50 µl	Endkonzentration
Wasser	Y µl	
5xPhusion HF Buffer	10 µl	1x
10 mM dNTPs	1 µl	Je 200 µM
Forward primer	1 µl	0,5 µM
Reverse primer	1 µl	0,5 µM
Template DNA	X µl	10-50 ng
Phusion DNA Polymerase	0,5 µl	0,02 U/µl

Die Reaktionen wurden unter den unten angeführten Bedingungen durchgeführt.

Denaturierung	98°C 30 s	
Denaturierung	98°C 10 s	} 30 Zyklen
Hybridisierung	X°C 30 s	
Elongation	72°C 30 s/kb	
finale Elongation	72°C 5 min	

Die Berechnung der Hybridisierungstemperatur für das jeweilige Primerpaar erfolgte mit dem *Tm Calculator* (www.thermofisher.com). 5 µl des PCR-Produkts wurden mittels Agarosegelelektrophorese untersucht.

4.2.9 *Overlap-Extension-PCR*

Um eine Punktmutation in einem DNA-Abschnitt zu erzeugen, wurde die *Overlap-Extension-PCR* angewendet (Horton *et al.*, 1993). Bei dieser Methode wurden drei aufeinander folgende PCR-Reaktionen durchgeführt. Zuerst wurden zwei DNA-Fragmente jeweils mit einem mutagenen und einem flankierenden Primer amplifiziert, wobei die mutagenen Primer komplementär zueinander sind. So entstand bei den beiden DNA-Fragmenten eine Sequenz im Bereich der mutagenen Primer, die sich überlappte. In der zweiten PCR-Reaktion hybridisierten die beiden DNA-Fragmente im überlappenden Bereich. So entstand ein DNA-*Template*, das in der dritten PCR-Reaktion durch die DNA-Polymerase vervielfältigt wurde. Die erste PCR-Reaktion erfolgte nach dem im Abschnitt 4.2.8 beschriebenen Protokoll. Die erhaltenen DNA-Fragmente wurden als *Template* für die zweite PCR angesetzt. Die Mengenzugabe erfolgte abhängig von der Fragmentgröße und der Konzentration des PCR-Produkts. Die Hybridisierungstemperatur wurde abhängig von der Größe der DNA-Fragmente gewählt.

2. PCR

	Für 25 µl	Programm
Wasser	Y µl	98°C 60 s
5xPhusion HF Buffer	5 µl	98°C 3 s
10mM dNTPs	0,5 µl	X°C 30 s
DNA-Fragment 1	X µl	72°C 30 s/kb
DNA-Fragment 2	X µl	72°C 5 min
Phusion DNA Polymerase	0,3 µl	

} 10 Zyklen

Der Reaktionsansatz für die dritte PCR wurde mit dem zweiten PCR-Reaktionsansatz gemischt.

3. PCR

	Für 25 µl	Programm
Wasser	Y µl	98°C 60 s
5xPhusion HF Buffer	5 µl	98°C 30 s
10mM dNTPs	0,5 µl	X°C 30 s
Forward primer	1 µl	72°C 30 s/kb
Reverse primer	1 µl	72°C 5 min
Phusion DNA Polymerase	0,3 µl	

} 30 Zyklen

5 µl des PCR-Produkts wurden mittels Agarosegelelektrophorese analysiert.

4.2.10 Verdau von DNA mit Restriktionsenzymen

Für den Restriktionsverdau wurden *FastDigest*® Enzyme von Thermo Scientific verwendet. Der Reaktionsansatz erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers.

4.2.11 Ligation und Transformation von DNA

DNA-Fragmente wurden mit T4 DNA Ligase (Thermo Scientific) in ein Plasmid-Vektor ligiert. Der Ligationsansatz erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers. Es wurde 3-mal so viel Insert wie Vektor verwendet. Die DNA-Konzentration wurde vorher mittels Agarosegelelektrophorese ermittelt. Die Ligation erfolgte über Nacht bei 16°C. Anschließend erfolgte die Transformation in *E.coli*. Dafür wurden 10 µl des Ligationsansatzes mit 100 µl der chemisch kompetenten Zellen vermischt und 20 min auf Eis inkubiert. Es folgte ein Hitzeschock für 90 s bei 42°C. Anschließend wurden 700 µl LB-Medium hinzugegeben und es folgte eine Inkubation unter Schütteln für 45 min bei 37°C. 200 µl des Ansatzes wurden auf LB_{amp}-Platten ausplattiert und bei 37°C über Nacht inkubiert.

4.2.12 Konstruktion der verwendeten Plasmide

Die Amplifikation der kodierenden Sequenzen erfolgte mittels PCR (s. Kapitel 4.2.8, 4.2.9). Als *Template* diente Plasmid-DNA (GFP-CP750/E). Die erhaltenen PCR-Produkte wurden mit *NucleoSpin*® *Gel and PCR Clean-up* von Macherey-Nagel nach dem, vom Hersteller empfohlenen Protokoll aufgereinigt. Nach dem Verdau mit jeweiligen Restriktionsenzymen folgte Ligation in den dazu gehörigen

Vektor (s. Kapitel 4.2.10, 4.2.11). Die fertigen Plasmide wurden mittels Sequenzierung (GATC Biotech) auf ihre Richtigkeit überprüft. Die Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide sind im Kapitel 4.2.1 aufgelistet.

GFP-CP75-N

Das N-terminale Fragment umfasst die Basen 1-1110. Das Fragment wurde mit den Oligonukleotiden VP1-1Sal und CP75-N-Bam-rev amplifiziert und in den mit Sall/BamHI geschnittenen Vektor pIS77 eingebaut.

GFP-CP75-C

Das C-terminale Fragment umfasst die Basen 1102-1959. Das Fragment wurde mit den Oligonukleotiden CP75-C-Sal-for und VP1-2Bam amplifiziert und in den mit Sall/BamHI geschnittenen Vektor pIS76 eingebaut.

CP75-RNAi

Das CP75-RNAi wurde nach der Methode von Samereier *et al.* hergestellt (Samereier *et al.*, 2011). Dafür wurde eine Sense-Sequenz, die die Basen 1-450 der kodierenden Sequenz umfasst mit den Oligonukleotiden CP75-RNAi-Sal-f und CP75-RNAi-Bam-r amplifiziert. Die Amplifizierung der Antisense-Sequenz erfolgte mit den Oligonukleotiden CP75-RNAi-AflIII-f und CP75-RNAi-Kpn-r. Die Fragmente wurden nacheinander in den mit Sall/BamHI bzw. AflIII/KpnI geschnittenen Vektor pIS193 eingebaut.

GFP-CP75-Plk-S143A

Das Plasmid wurde mittels *Overlap-Extension-PCR* (s. Kapitel 4.2.9) hergestellt. Die erste PCR-Reaktion erfolgte mit den Oligonukleotiden CP75-Plk-TA-r /VP1-1Sal für das Fragment 1 und mit CP75-Plk-TA-f/VP1-2Bam für das Fragment 2. Die beiden erhaltenen Fragmente wurden für die zweite PCR-Reaktion eingesetzt. Die dritte PCR-Reaktion erfolgte mit den Oligonukleotiden VP1-1Sal und VP1-2Bam.

BirA-R118G-CP75

Das Insert wurde mit Sall/BamHI aus dem Plasmid GFP-CP75O/E ausgeschnitten und in den mit Sall/BamHI behandelten Vektor BirA-R118G eingebaut.

BirA-R118G-CP75-C

Das Insert wurde mit Sall/BamHI aus dem Plasmid GFP-CP75-C ausgeschnitten und in den mit Sall/BamHI behandelten Vektor BirA-R118G eingebaut.

4.2.13 Herstellung chemisch kompetenter Zellen

Zur Herstellung chemisch kompetenter Zellen wurde zuerst eine Vorkultur angesetzt. Dafür wurde eine einzelne Kolonie der TOP10-Zellen in 5 ml Ψ b-Medium überführt und bis zu einer $OD_{600}=0,3$ bei 37°C inkubiert. Die Vorkultur wurde anschließend in einen mit 100 ml vorgewärmten Ψ b-Medium gefüllten Kolben überführt und bei 37°C geschüttelt, bis eine $OD_{600}=0,5$ erreicht wurde. Nach einer 5 minütigen Inkubation auf Eis wurden die Zellen für 5 min bei 3000 g zentrifugiert und in 40 ml eiskaltem TfbI-Puffer resuspendiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wurden die Zellen in 4 ml TfbII-Puffer aufgenommen, 15 min auf Eis inkubiert und in 200 μl -Aliquots im flüssigen Stickstoff eingefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80°C .

Ψ b-Medium

20 g/l Trypton; 5 g/l Hefeextrakt; 5 g/l MgSO_4 (wasserfrei); pH auf 7,6 mit KOH einstellen

TfbI

30 mM Kaliumacetat; 100 mM Rubidiumchlorid (RbCl); 10 mM CaCl_2 ; 15% Glycerin; pH auf 6,0 mit 0,2 M Essigsäure einstellen, 50 mM von MnCl_2 hinzugeben und pH auf 5,8 einstellen

TfbII

10 mM MOPS; 75 mM CaCl_2 ; 10 mM Rubidiumchlorid (RbCl); 15% Glycerin; pH auf 6,5 mit KOH einstellen

4.2.14 Transformation von *Dictyostelium* Zellen

Pro Transformationsansatz wurden $5 \cdot 10^6$ Zellen in exponentieller Wachstumsphase genommen. Die Zellkultur wurde 20 min auf Eis gekühlt und anschließend 5 min bei 1300 rpm und 4°C zentrifugiert. Das Zellpellet wurde einmal mit 20 ml Phosphatpuffer und anschließend mit 10 ml

Materialien und Methoden

Elektroporationspuffer gewaschen. Das Zellpellet wurde in 700 µl Elektroporationspuffer resuspendiert, mit 15-30 µg DNA vermischt und in eine sterile vorgekühlte Elektroporationsküvette (4 mm Abstand zwischen den Elektroden; Peqlab) überführt. Die Elektroporation erfolgte mit zwei Impulsen bei 1,1 kV, 3 µF in einer *Gene Pulser* Elektroporationsapparatur (Biorad). Danach wurde das Zellgemisch in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde CaCl₂/Mg₂Cl mit der Endkonzentration von 1mM dazugegeben und das Zellgemisch für weitere 15 min bei RT auf der niedrigsten Stufe auf einem Rotator rotiert.

Für die Transformation Blasticidin-resistenter Zellen wurde das Zellgemisch mit 25 ml HL5c (Formedia) Medium, Penicillin/ Streptomycin haltig, versetzt und auf 24-Well-Platte verteilt. Nach 24 h erfolgte Selektionsdruck mit 4 µg/ml Blasticidin S in HL5c Medium. Die Platten wurden bei 20-22°C 1-2 Wochen stehen gelassen bis Kolonien resistenter Zellen gewachsen waren und im Anschluss untersucht werden konnten.

Für die Transformation G418-resistenter Zellen wurde das Zellgemisch nach dem letzten Inkubationsschritt in eine 50 ml Zellkulturflasche überführt und mit 25 ml HL5c Medium, versetzt mit Penicillin/Streptomycin, vermischt. Nach 24 h wurden die Zellen durch Zentrifugation bei 1300 rpm geerntet und zwei Mal mit Phosphatpuffer gewaschen. Anschließend wurden sie in einer Bakteriensuspension, bestehend aus *Klebsiella aerogenes* versetzt mit 10 µg/ml G418, resuspendiert. Für die Gewinnung der *Klebsiella aerogenes* wurden diese bei 37 °C über Nacht auf einer SM-Platte kultiviert. 500 µl Suspension, bestehend aus *Klebsiella aerogenes* und transformierten *Dictyostelium* Zellen wurden auf Phosphatagar-Platten, versetzt mit 100 µg/ml G418, ausplattiert. Die Phosphatagar-Platten wurden bei RT 10-14 Tage bis zum Erscheinen von Plaques resistenter Zellen gelagert. Diese wurden dann mit einer sterilen Pipette in HL5c Medium mit 10 µg/ml G418 und Penicillin/Streptomycin überführt.

Elektroporationspuffer

50 mM Saccharose; 10 mM KH₂PO₄; pH 6.1

SM-Platten

10 g/l Pepton (Oxoid); 1 g/l Hefeextrakt (Oxoid); 10 g/l Glukose; 20 g/l Agar; 1,6 g/l K₂HPO₄; 2,2 g/l KH₂PO₄; 1 g/l MgSO₄; pH 6,5

4.3 Biochemische Methoden

4.3.1 Gewinnung von Gesamtzellextrakten aus *Dictyostelium* Zellen

Zur Gewinnung von Gesamtzellextrakten wurden 1,5 ml Zellkultur mit einer Zelldichte von $2-4 \cdot 10^6$ Zellen/ml bei 3000g für 5 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 2x Harnstoff Probenpuffer (LöA) aufgenommen.

4.3.2 Methanol-Chloroform Proteinpräzipitation

Für die Proteinfällung betrug das maximale Volumen einer verdünnten Proteinlösung 150 µl. Die Proteinlösung wurde zuerst mit 4x Vol. Methanol versetzt und gevortext. Es folgte die Zugabe von 1x Vol. Chloroform und 3x Vol. *A. dest.* Zwischen den Schritten wurde die Probe gevortext. Danach wurde diese 1 min bei 13000 g zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde entfernt. Zu der Probe wurde 3x Vol. Methanol dazugegeben. Nach dem Mischen der Probe (Vortex) folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt bei 13000 g für 2 min. Der Überstand wurde entfernt und das Pellet bei RT getrocknet. Für die weitere Analyse wurde das Pellet in Harnstoff Probenpuffer (LöA) gelöst.

4.3.3 Amidoschwarz-Test zur Bestimmung der Proteinkonzentration

Für jede Probe erfolgte eine dreifache Bestimmung. Zuerst wurde eine BSA-Eichgerade erstellt. Je 4, 8 und 12 µl der BSA-Stammlösung (1mg/ml) wurden in 300 µl Färbelösung gegeben, gevortext und für 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Proben für 5 min bei 13000 g zentrifugiert, zwei Mal mit 750 µl Waschlösung gewaschen und das erhaltene Pellet in 700 µl 0,1 M NaOH gelöst. Die Messung erfolgte bei 615 nm in UV-1600 PC Spectrophotometer (VWR). 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. Die Bestimmung der Proteinkonzentration in der zu untersuchenden Proben erfolgte nach dem gleichen Protokoll wie bei der Erstellung der BSA-Eichgerade. Es wurden 2 µl und 5 µl Proteinlösung je Probe entnommen und für die Bestimmung verwendet. Die Proteinkonzentration wurde mit Hilfe von Microsoft Excel ermittelt.

Färbelösung

5,2 mg Amidoschwarz in 20 ml Wasser

Waschlösung

Essigsäure/Methanol 1:10

4.3.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Proteine wurden im diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetrennt (Laemmli, 1970). Die Proteinproben wurde mit der gleichen Menge Harnstoff-Probenpuffer (LöA) versetzt und bei 70°C für 3 min inkubiert. Nach dem Beladen des SDS-Gels mit Proteinproben wurde diese mit dem Biorad-Mini-System (Biorad) der Größe nach aufgetrennt. Dazu wurde eine konstante Stromstärke von 15 mA angelegt, so dass die Proben sich in einer Laufebene im Sammelgel anreichern konnten. Anschließend wurde die Stromstärke auf konstante 30 mA erhöht, bis die gewünschte Probenauftrennung erreicht war. Die Größenbestimmung der aufgetrennten Proteine erfolgte mit dem parallel laufenden Proteinstandard (PageRuler™ Prestained Protein Ladder, Thermo Scientific)

<u>Für 2 Gele</u>	Sammelgel (3,9% Acrylamid)	Trenngel (10% Acrylamid)
Acrylamid/Bisacrylamid (37,5/1)	0,5 ml	2,5 ml
Lösung B	-	2,5 ml
Lösung C	1,25 ml	-
10% APS	25 µl	33 µl
TEMED	5 µl	7 µl
Wasser	3,25 ml	5 ml

Lösung B

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

Lösung C

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

4.3.5 Coomassie Färbung von SDS-Gelelen

Die Gele wurden für 1 h in Coomassie-Lösung gefärbt. Anschließend in Wasser kurz gewaschen und entfärbt. Beim Entfärben wurde die Entfärbelösung mehrmals gewechselt.

Coomassie

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

Entfärbelösung

25% Isopropanol, 10% Essigsäure

4.3.6 Western Blot und Immunfärbung

Die Polyacrylamid-Gele wurden mit einigen Abweichungen in der Pufferzusammensetzung nach Kyhse-Andersen in der halbtrockenen Blotting-Apparatur (Peqlab) geblottet (Kyhse-Andersen, 1984). Die Übertragung der aufgetrennten Proteine auf eine Nitrozellulose-Membran (Roti-NC®, Roth) erfolgte mit einer Stromstärke von 1 mA/cm². Anschließend wurde die Membran in 3% Fischgelatine/TBST für 1 h geblockt. Der primäre Antikörper wurde in 1%Fischgelatine/TBST individuell verdünnt. Die Inkubation der Membran mit dem Antikörper erfolgte bei RTunter Schwenken für 1 h. Nach dem Waschen in TBST (3x 5 min) folgte eine einstündige Inkubation bei RT mit dem sekundären Antikörper, gekoppelt an alkalische Phosphatase (AP), verdünnt 1:10000 in TBST/1% Fischgelatine. Die Membran wurde erneut 3x 5 min in TBST gewaschen. Es folgte eine Färbereaktion mit NBT/BCIP gelöst in 10 ml AP-Reaktionspuffer. Die Farbreaktion wurde durch Waschen mit Wasser gestoppt.

Blot Puffer I

300 mM Tris; 20% Methanol

Blot-Puffer II

30 mM Tris; 20% Methanol

Blot Puffer III

30 mM Tris; 20% Methanol; 40 mM ϵ -Aminocapronsäure

AP-Reaktionspuffer

100 mM Tris/Cl; 100 mM NaCl; 50 mM MgCl₂; pH 9,5

NBT (4,5 μ l/ml)

Stammlösung: 75 mg/ml in 70% DMF

BCIP (3,5 μ l/ml)

Stammlösung: 50 mg/ml in 100% DMF

4.3.7 Expression und Aufreinigung von MBP-Fusionsproteinen

Das in dieser Arbeit verwendete MBP-Fusionsprotein wurde zur Herstellung und Aufreinigung vom Antikörper verwendet. Am Vortag wurde eine 50 ml *E. coli*-Vorkultur mit LB_{amp}-Medium angesetzt und über Nacht bei 37°C und 230 rpm inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Vorkultur in 400 ml LB_{amp}-Medium so verdünnt, dass die OD₆₀₀ etwa 0,1 betrug. Die Bakterienkultur wurde bei 37°C und 230 rpm bis zu einer OD₆₀₀ 0,6-1,0 inkubiert. Es folgte die Induktion der Proteinexpression mit IPTG (Endkonzentration 3M) für 4 h bei 22°C. Die Zellen wurden bei 4000 rpm und 4 °C (Hettich Rotana 460R, Rotor 5645) geerntet. Das Pellet wurde schließlich in 10 ml TE-Puffer resuspendiert und bis zur Aufreinigung bei -20°C gelagert.

Für die Aufreinigung wurde das Pellet auf Eis aufgetaut und mit 200 μ l 5M NaCl (Endkonzentration 100 mM) versetzt. Die Zellsuspension wurde anschließend mit einem Sonifizierstab (Ultraschalprozessor, Dr. Hielscher GmbH) für 3 min beschallt (Amplitude 100%, Cycle 0,6). Nach einer einminütigen Pause auf Eis wurde der Schritt wiederholt. Es folgte eine Zentrifugation bei 10000 g, 4°C für 30 min (Beckmann Avanti JE Zentrifuge, JA-25.50 Rotor). Der Überstand wurde auf eine Säule mit Amylose-Harz (NEB) geladen und die Durchflussgeschwindigkeit auf 1 Tropfen pro 10 s eingestellt. Die Säule wurde anschließend bei maximaler Durchflussgeschwindigkeit dreimal mit MBP-Säulenpuffer gewaschen. Für die Elution wurde 10 mM Maltose in MBP-Säulenpuffer gelöst und das Fusionsprotein mit einer Durchflussgeschwindigkeit

von 1 Tropfen pro 10 s in 700 μ -Fraktionen eluiert. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mit UV-1600 PC Spectrophotometer (VWR) bei 280 nm ($OD_{280}= 1,0$ entspricht der Proteinkonzentration von 0,7 mg/ml).

MBP Säulenpuffer

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

4.3.8 Aufreinigung von Antikörpern

Für die Aufreinigung des CP75-Antikörpers wurde eine Sepharose-Säule verwendet. Dafür wurde zuerst die Säule vorbereitet indem 1 ml von NHS-activated Sepharose (GE Healthcare) in ein 15 ml Schraubgefäß pipettiert und mit 1 mM kaltem HCL gemischt und gevortext wurde. Die Sepharose wurde pelletiert und der Überstand verworfen. Etwa 0,5 mg des MBP-CP75 Fusionsproteins wurden zu der Sepharose gegeben und auf einem Rotator über Nacht bei 4°C inkubiert. Das Gemisch wurde auf eine leere Säule aufgetragen. Nachdem Absetzen des Säulenmaterials wurde die Durchflussgeschwindigkeit auf ein Tropfen pro 10 s eingestellt. Nach dem die Proteinlösung durchgelaufen war (die Säule darf nicht trocken laufen), folgte ein Waschschrift mit 1 Säulenvolumen Puffer A bei maximaler Durchflussgeschwindigkeit. Nach dem ein weiterer Waschschrift mit Puffer B durchgeführt wurde, wurde 1 Säulenvolumen Puffer A auf die Säule gegeben und 1 h inkubiert. Nach erneutem Waschen mit Puffer B wurde der Inkubationsschritt mit Puffer A mit anschließendem Waschen mit Puffer B wiederholt. Die Säule wurde drei Mal mit TBS gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurde eine Fraktion aufgefangen und eine OD-Messung bei 280 nm durchgeführt. Wenn OD_{280} höher als bei 0,01 lag, wurde die Säule noch ein Mal gewaschen. Das Antikörperserum wurde 1:10 in TBS verdünnt und auf die Säule geladen. Die Durchflussgeschwindigkeit wurde auf ein Tropfen pro 10 s eingestellt. Nach dem dreimaligen Waschen mit TBS wurde der Antikörper mit 100 mM Glycin HCl pH2,7 in 700 μ l-Fraktionen eluiert und sofort mit 1 M Tris HCL pH 9,5 neutralisiert. Die Konzentration des Antikörpers wurde mit UV-1600 PC Spectrophotometer (VWR) bei 280 nm ($OD_{280}= 1,0$ entspricht der Proteinkonzentration von 0,7 mg/ml) bestimmt.

Puffer A

1 mM Tris HCl; pH 8,5

Puffer B

0,1 M Na-Acetat; 0,5 M NaCl; pH4,0

4.3.9 Isolierung von *Dictyostelium* Centrosomen

Alle Schritte wurden auf Eis, mit eiskalten Puffer und vorgekühlten Zentrifugen nach einem modifizierten Protokoll von Gräf durchgeführt (Gräf, 2001). 200 ml einer *Dictyostelium*-Kultur mit einer Zelldichte von $4 \cdot 10^6$ wurden bei 1300 rpm und 4°C geerntet und zwei Mal mit 20 ml Phosphatpuffer gewaschen. Im dritten Waschschrift wurden 2 µM Cytochalasin A dem Phosphatpuffer hinzugefügt. Das Zellpellet in 10 ml Kernlysepuffer resuspendiert und 1 min gevortext. Die Zellsuspension wurde anschließend zwei Mal mit einer Spritze durch ein Nuclepore-Filter (5 µm, Whatman) gedrückt und sofort 10 min bei 4000 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet wurde in 10 ml Pyrophosphatpuffer resuspendiert und 1 min gevortext. Die Zellsuspension wurde erneut für 10 min bei 4000 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Gefäß überführt, mit 2 mg Heparin versetzt und 5-10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde der Überstand 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 Röhrrchen vorbereitet. Der Gradient wurde für 1 h bei 21000 rpm (Beckman Optima L-100K Ultrazentrifuge, SW-40 Rotor) zentrifugiert. Mit einer Schlauchpumpe und Glaskapillaren (Flussrate 200 µl pro min) wurden ca. 500 µl der 80% Saccharose-Fraktion vom Boden des SW-40 Röhrrchen entfernt und verworfen. Anschließend wurde vom Boden des Röhrrchens 1 ml Lösung in einem neuen Gefäß gesammelt. Diese Fraktion, welche die Grenze der 80% und 50% Saccharose-Lösungen darstellte, enthielt die Centrosomen. Für Immunfluoreszenz Experimente wurden 10 bis 30 µl der Centrosomen-Fraktion in 1 ml Phosphatpuffer verdünnt und auf Deckgläser bei 4500 rpm (Hettich Rotanta R250, 5624 Rotor) sedimentiert. Die Fixierung und die indirekte Immunfluoreszenz erfolgten nach dem gleichen Protokoll wie für die ganzen Zellen (Abschnitt 4.4.3).

Materialien und Methoden

Für biochemische Analysen wurden die Centrosomen nicht über einen Gradienten, sondern über ein Saccharose-Kissen, das aus 1,5 ml 50% Saccharose bestand, bei gleichen Zentrifugationsbedingungen aufgereinigt. Die isolierten Centrosomen befanden sich im Pellet und wurden in 1 ml Gradientenpuffer resuspendiert, um Saccharosereste zu entfernen, und für 15 min bei 15000 rpm und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde in einem entsprechenden Puffer resuspendiert.

Kernlysepuffer

100 mM Na-PIPES, pH 6.9; 2 mM MgCl₂; 10% Saccharose; frisch zugeben: 0.25% Triton X-100; 1 x Proteaseinhibitor-Cocktail; 2 µM Cytochalasin A

Pyrophosphatpuffer

100 mM Na-PIPES; 2 mM MgCl₂; 30% Saccharose; frisch zugeben: 40 mM tetra-Natriumdiphosphat/HCl, pH 6.9; 1 mM Dithiothreitol; 1% Triton X-100; 1 x Proteaseinhibitor-Cocktail

Proteaseinhibitor-Cocktail

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

Gradientenpuffer

10 mM Na-PIPES; 2 mM MgCl₂; frisch zugeben: 0.1% Triton X-100; 0.1% 2-Mercaptoethanol

Saccharoselösungen

80% Saccharose in 10 mM Na-PIPES/2 mM MgCl₂; frisch zugeben: 0.1% Triton X-100; 0.1% 2-Mercaptoethanol; 1x Proteaseinhibitor-Cocktail.

4.3.10 BioID

Die BioID-Methode wurde nach modifiziertem Protokoll von Batsios durchgeführt (Batsios *et al.*, 2016). Dafür wurden zuerst Centrosomen wie oben beschrieben isoliert. Das Centrosomen-Pellet wurde in 150 µl Gradientenpuffer

mit 2 M Kaliumjodidlösung resuspendiert und 20 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die Suspension für 20 min bei 9000 g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Gefäß überführt und die Proteine mit Methanol/Chloroform gefällt (Abschnitt 4.3.2). Das Proteinpellet wurde nach der Fällung in 100 µl LöA/Lösung C (2:1) resuspendiert. 50 µl der Probe wurden auf eine breite Geltasche (30 mm) aufgetragen (SDS-PAGE Abschnitt 4.3.4). Nach dem Blotten (Abschnitt 4.3.6) wurde die Membran in drei gleiche Streifen geschnitten und mit jedem Streifen wurde eine Immunfärbung durchgeführt (Abschnitt 4.3.5). In einem direkten Vergleich der Streifen konnte eine Aussage über Interaktionspartner des zu untersuchenden Proteins getroffen werden (Abschnitt 2.6.1).

Für die Analyse des Cytoplasma, die im Kapitel 2.7.4 beschrieben wurde, wurden 100 ml einer *Dictyostelium*-Kultur mit der Zelldichte von $5 \cdot 10^6$ bei 1300 rpm und 4°C geerntet und zwei Mal mit 20 ml Phosphatpuffer gewaschen. Im dritten Waschschrift wurden 2 µM Cytochalasin A dem Phosphatpuffer hinzugefügt. Das Zellpellet wurde in 10 ml Kernlysepuffer resuspendiert und 1 min gevortext. Die Zellsuspension wurde anschließend zwei Mal mit einer Spritze kräftig durch ein Nuclepore-Filter (5 µm, Whatman) gedrückt und sofort 10 min bei 13000g und 4°C zentrifugiert. Dabei wurde das Cytoplasma, das sich im Überstand befand von den Zellkernen und Vesikeln getrennt. Die Aufreinigung der biotinylierten Proteine erfolgte mit dem *µMACS Streptavidin Kit* (Miltenei Biotec GmbH) nach dem Protokoll des Herstellers. Folgende Modifikationen wurden durchgeführt: 1) Zu der Cytoplasma-Fraktion (10 ml) wurden 200 µl Streptavidin-Beads hinzugefügt und 30 min auf Eis inkubiert. 2) Die Elution erfolgte mit 100 µl LöA, das auf 95°C erhitzt wurde.

4.4 Zellbiologische Methoden

4.4.1 Kultivierung und Konservierung von *Escherichia coli*

E. coli Zellen wurden bei 37°C entweder auf LB-Platten oder im flüssigen LB-Medium (unter Schütteln bei 230 rpm) unter Zusatz von Ampicillin kultiviert. Für die dauerhafte Lagerung des Bakterienstammes wurde die bakterielle Zellkultur 1:1 mit Einfriermedium gemischt und bei -80°C gelagert.

Einfriermedium

LB-Medium, 70% Glycerin

4.4.2 Kultivierung und Konservierung von *Dictyostelium discoideum*

Dictyostelium-Zellen wurden axenisch entweder in Schüttelkultur bei 150 rpm (Certomat R, Sartorius) oder adhärenent in Zellkulturflaschen bei 19-22°C kultiviert. Das dafür verwendete HL5c-Medium (Formedium) wurde mit entsprechenden Antibiotika versetzt (Blasticidin S 4 µg/ml, G418 10 µg/ml). Das Medium wurde zwei Mal wöchentlich gewechselt. Für die langfristige Lagerung wurden die Sporen, die von *Dictyostelium* als Reaktion auf Nahrungsmangel gebildet werden, eingefroren. Dafür wurden 50 ml einer axenisch wachsenden Zellkultur mit der Zelldichte $2\text{-}5 \cdot 10^6$ geerntet (1300 rpm) und ein Mal mit sterilem Phosphatpuffer gewaschen. Das Zellpellet wurde in 500 µl sterilem Phosphatpuffer resuspendiert und auf eine Phosphatagar-Platte vorsichtig ausplattiert. Nach 3-4 Tagen bildeten die Zellen sporenhaltige Fruchtkörper, die mit 1,5 ml sterilem Phosphatpuffer von der Platte abgewaschen und bei -80°C gelagert wurden. Um eine neue Kultur anzusetzen, wurden die Sporen aufgetaut und 10 µl davon in 10 ml HL5c-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum gegeben.

4.4.3 Fixierung und indirekte Immunfluoreszenz von *Dictyostelium*

1 ml einer *Dictyostelium*-Kultur wurde zum Absetzen auf runde Deckgläschen transferiert. Nach ca.30 min wurde das Medium entfernt und die Zellen mit der jeweiligen Methode fixiert. In dieser Arbeit wurden folgende Fixierungen verwendet:

Formaldehyd-Aceton-Fixierung: 3,7% Formaldehyd in PBS, 5 min Fixierung, anschließend 1 min in -20°C kaltem Aceton und 1 x 5 min in PBS waschen

Methanol-Fixierung: 100% Methanol (-20°C), 3 min Fixierung, anschließend 1 x 5 min in PBS waschen

Glutaraldehyd-Fixierung: 0,5% Glutaraldehyd, 0,5% Triton X-100 in 50% PHEM-Puffer, 5 min Fixierung, dann 2 x 5 min in Phosphatpuffer waschen, 1 x 10 min in 1 mg/ml Borhydrid waschen und 1 x 5 min in PBS waschen.

Für die Immunfärbung wurden die fixierten Zellen mit einem, oder bei Doppelfärbungen mit einer Mischung aus zwei verschiedenen primären Antikörpern, verdünnt in PBS (mit 1% BSA, 0,1% NaN₃), 1-3 h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die nicht gebundenen Antikörper durch drei fünfminütige Waschstschritte mit PBS entfernt. Dann wurden die Präparate mit den sekundären Antikörpern 1 h im Dunklen inkubiert. Alexa 488- und Alexa 568-Konjugate wurden 1:1000, Cy5-Konjugate 1:500 in PBS verdünnt. Nach dreimaligem Waschen der Präparate in PBS wurden die Zellkerne mit DAPI (1 mg/ml) für 15 min gefärbt. Die Deckgläschen mit den fixierten Zellen wurden auf einem Objektträger mit einem Tropfen Mowiol eingebettet.

4.4.4 Weitfeldmikroskopie

Immunfluoreszenz-Präparate wurden mit einem Zeiss Axiovert 200M Cell Observer HS System (Carl Zeiss MicroImaging GmbH) untersucht. Als Lichtquelle diente eine HXP120C Quecksilberhalidlampe. Für die Aufnahme wurde immer eine Zeiss AxioCam MRm Rev. 3 CCD-Kamera und das 100x/1,4 PlanApo oder 40x/1,3 Plan-Neofluar Objektiv verwendet. Die Zellen wurden im Bildstapel mit einem Abstand von 0,100-0,250 μm (Z-Ebene) aufgenommen. Die Rohdaten wurden mittels iterativer Dekonvolution mit berechneter PSF aufbereitet. Zur Berechnung der PSF wurde ein Präparat mit 200 nm großen fluoreszierenden Beads (TetraSpeck™ beads, Invitrogen) hergestellt. Von diesem wurden 120 Bildstapel mit einem Abstand von 0,050 μm aufgenommen. Die PSF wurde aus den so entstandenen Rohdaten und der PSF-Erzeuger-Funktion von AxioVision berechnet. Eine Maximalintensitätsprojektion zur Darstellung der Bilder wurde mit ImageJ durchgeführt.

4.4.5 Konfokalmikroskopie

Die Aufnahme der lebenden Zellen erfolgte mit dem konfokalem-Spinning-Disk-System (Cell Observer SD, Carl Zeiss Microimaging GmbH), das mit 2 Evolve EM-CCD Kameras (Photometrics) und einem Rapp UGA-40-2L Galvo Scanner (Rapp Optoelectronics) sowie einem 473 nm punktfokussierten Diodenlaser (Rapp Optoelectronics) ausgestattet ist. 1 ml einer *Dictyostelium*-Kultur wurde zum Absetzen in ein Glasbodenschälchen überführt (Fluordish). Nach 30 min

Materialien und Methoden

wurde das Medium abgesaugt und durch LoFlo Medium (Formedium) mit 2 mg/ml Ascorbinsäure ersetzt. Die Prozedur wurde zwei Mal wiederholt.

Für FRAP-Experimente wurde die *Agar Overlay* Technik nach Fukui angewendet (Fukui *et al.*, 1987). Die Zellen wurden dadurch flach gedrückt und in ihrer Bewegung eingeschränkt, ohne die Intrazellulären Bewegungsprozesse zu beeinflussen. Die Aufnahme erfolgte mit dem 100x/1,4 PlanApo-Objektiv, einer Bildrate von 10 fr/s und einem Zeitraffer von 10 s. Es wurden 7 Ebenen pro Bildstapel aufgenommen. Ein FRAP-Experiment erfolgte mit der „click and fire“-Funktion des über die Rapp-Software gesteuerten 473 nm punktfokussierten Lasers. Die aufgenommenen FRAP-Filme wurden mit Hilfe von ImageJ in einer maximalen Intensitätsprojektion auf eine Ebene gebracht. Die Auswertung des Bleichvorgangs erfolgte mit ImageJ. Für jeden Zeitpunkt wurde die Intensität des Signals der zu untersuchenden Zelle, der Kontrolle (zur Bestimmung des „Autobleachings“ während der Aufnahme) und des Hintergrundes in einer definierten „Region-of-interest“ ROI gemessen. Die Daten aus gemessener Fläche und Fluoreszenzstärke wurden in Microsoft Excel ausgewertet. Die Auswertung der Daten erfolgte nach dem Protokoll von Samereier (Samereier *et al.*, 2010b).

5 Literaturverzeichnis

- Andersen, J.S., Wilkinson, C.J., Mayor, T., Mortensen, P., Nigg, E.A., Mann, M.**, (2003). Proteomic characterization of the human centrosome by protein correlation profiling. *Nature* **426**, 570-574.
- Azimzadeh, J.**, (2014). Exploring the evolutionary history of centrosomes. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **369**.
- Banfalvi, G.**, (2011). Overview of cell synchronization. *Methods Mol Biol* **761**, 1-23.
- Barth, C., Fraser, D.J., Fisher, P.R.**, (1998). Co-insertional replication is responsible for tandem multimer formation during plasmid integration into the Dictyostelium genome. *Plasmid* **39**, 141-153.
- Batsios, P., Meyer, I., Graf, R.**, (2016). Proximity-Dependent Biotin Identification (BioID) in Dictyostelium Amoebae. *Methods Enzymol* **569**, 23-42.
- Bettencourt-Dias, M., Rodrigues-Martins, A., Carpenter, L., Riparbelli, M., Lehmann, L., Gatt, M.K., Carmo, N., Balloux, F., Callaini, G., Glover, D.M.**, (2005). SAK/PLK4 is required for centriole duplication and flagella development. *Curr Biol* **15**, 2199-2207.
- Blau-Wasser, R., Euteneuer, U., Xiong, H., Gassen, B., Schleicher, M., Noegel, A.A.**, (2009). CP250, a novel acidic coiled-coil protein of the Dictyostelium centrosome, affects growth, chemotaxis, and the nuclear envelope. *Mol Biol Cell* **20**, 4348-4361.
- Chisholm, R.L., Firtel, R.A.**, (2004). Insights into morphogenesis from a simple developmental system. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**, 531-541.
- Clark, S.W., Meyer, D.I.**, (1992). Centractin is an actin homologue associated with the centrosome. *Nature* **359**, 246-250.
- Cooper, J.A.**, (1987). Effects of cytochalasin and phalloidin on actin. *J Cell Biol* **105**, 1473-1478.
- Cunha-Ferreira, I., Rodrigues-Martins, A., Bento, I., Riparbelli, M., Zhang, W., Laue, E., Callaini, G., Glover, D.M., Bettencourt-Dias, M.**, (2009). The SCF/Slimb ubiquitin ligase limits centrosome amplification through degradation of SAK/PLK4. *Curr Biol* **19**, 43-49.
- Dauderer, C., Gräf, R.O.**, (2002). Molecular analysis of the cytosolic Dictyostelium gamma-tubulin complex. *Eur J Cell Biol* **81**, 175-184.
- Dauderer, C., Schliwa, M., Graf, R.**, (1999). Dictyostelium discoideum: a promising centrosome model system. *Biol Cell* **91**, 313-320.
- Dauderer, C., Schliwa, M., Graf, R.**, (2001). 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* **80**, 621-630.
- Dilbeck, V., Berberof, M., Van Cauwenberge, A., Alexandre, H., Pays, E.**, (1999). Characterization of a coiled coil protein present in the basal body of Trypanosoma brucei. *J Cell Sci* **112 (Pt 24)**, 4687-4694.
- Ding, R., West, R.R., Morphew, D.M., Oakley, B.R., McIntosh, J.R.**, (1997). The spindle pole body of Schizosaccharomyces pombe enters and leaves the nuclear envelope as the cell cycle proceeds. *Mol Biol Cell* **8**, 1461-1479.

- Dinkel, H., Van Roey, K., Michael, S., Kumar, M., Uyar, B., Altenberg, B., Milchevskaya, V., Schneider, M., Kuhn, H., Behrendt, A., Dahl, S.L., Damerell, V., Diebel, S., Kalman, S., Klein, S., Knudsen, A.C., Mader, C., Merrill, S., Staudt, A., Thiel, V., Welti, L., Davey, N.E., Diella, F., Gibson, T.J., (2015). ELM 2016-data update and new functionality of the eukaryotic linear motif resource. *Nucleic Acids Res.*
- Eichinger, L., (2003). Revamp a model-status and prospects of the Dictyostelium genome project. *Curr Genet* **44**, 59-72.
- Eichinger, L., Pachebat, J.A., Glockner, G., Rajandream, M.A., Sugang, R., Berriman, M., Song, J., Olsen, R., Szafranski, K., Xu, Q., Tunggal, B., Kummerfeld, S., Madera, M., Konfortov, B.A., Rivero, F., Bankier, A.T., Lehmann, R., Hamlin, N., Davies, R., Gaudet, P., Fey, P., Pilcher, K., Chen, G., Saunders, D., Sodergren, E., Davis, P., Kerhornou, A., Nie, X., Hall, N., Anjard, C., Hemphill, L., Bason, N., Farbrother, P., Desany, B., Just, E., Morio, T., Rost, R., Churcher, C., Cooper, J., Haydock, S., van Driessche, N., Cronin, A., Goodhead, I., Muzny, D., Mourier, T., Pain, A., Lu, M., Harper, D., Lindsay, R., Hauser, H., James, K., Quiles, M., Madan Babu, M., Saito, T., Buchrieser, C., Wardroper, A., Felder, M., Thangavelu, M., Johnson, D., Knights, A., Louseged, H., Mungall, K., Oliver, K., Price, C., Quail, M.A., Urushihara, H., Hernandez, J., Rabbinowitsch, E., Steffen, D., Sanders, M., Ma, J., Kohara, Y., Sharp, S., Simmonds, M., Spiegler, S., Tivey, A., Sugano, S., White, B., Walker, D., Woodward, J., Winckler, T., Tanaka, Y., Shaulsky, G., Schleicher, M., Weinstock, G., Rosenthal, A., Cox, E.C., Chisholm, R.L., Gibbs, R., Loomis, W.F., Platzer, M., Kay, R.R., Williams, J., Dear, P.H., Noegel, A.A., Barrell, B., Kuspa, A., (2005). The genome of the social amoeba Dictyostelium discoideum. *Nature* **435**, 43-57.
- Eichinger, L., Rivero, F., (2006). *Dictyostelium discoideum* protocols. Methods in molecular biology. *Humana Press, Totowo* **346**.
- Elserafy, M., Saric, M., Neuner, A., Lin, T.C., Zhang, W., Seybold, C., Sivashanmugam, L., Schiebel, E., (2014). Molecular mechanisms that restrict yeast centrosome duplication to one event per cell cycle. *Curr Biol* **24**, 1456-1466.
- Euteneuer, U., Graf, R., Kube-Granderrath, E., Schliwa, M., (1998). Dictyostelium gamma-tubulin: molecular characterization and ultrastructural localization. *J Cell Sci* **111 (Pt 3)**, 405-412.
- Fortunato, A., Strassmann, J.E., Santorelli, L., Queller, D.C., (2003). Co-occurrence in nature of different clones of the social amoeba, Dictyostelium discoideum. *Mol Ecol* **12**, 1031-1038.
- Fry, A.M., Mayor, T., Meraldi, P., Stierhof, Y.D., Tanaka, K., Nigg, E.A., (1998). C-Nap1, a novel centrosomal coiled-coil protein and candidate substrate of the cell cycle-regulated protein kinase Nek2. *J Cell Biol* **141**, 1563-1574.
- Fu, J., Hagan, I.M., Glover, D.M., (2015). The centrosome and its duplication cycle. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **7**, a015800.
- Fujita, I., Yamashita, A., Yamamoto, M., (2015). Dynactin and Num1 cooperate to establish the cortical anchoring of cytoplasmic dynein in *S. pombe*. *J Cell Sci* **128**, 1555-1567.

- Fukui, Y., Yumura, S., Yumura, T.K.**, (1987). Agar-overlay immunofluorescence: high-resolution studies of cytoskeletal components and their changes during chemotaxis. *Methods Cell Biol* **28**, 347-356.
- Garnham, C.P., Roll-Mecak, A.**, (2012). The chemical complexity of cellular microtubules: tubulin post-translational modification enzymes and their roles in tuning microtubule functions. *Cytoskeleton (Hoboken)* **69**, 442-463.
- Gill, S.R., Schroer, T.A., Szilak, I., Steuer, E.R., Sheetz, M.P., Cleveland, D.W.**, (1991). Dynactin, a conserved, ubiquitously expressed component of an activator of vesicle motility mediated by cytoplasmic dynein. *J Cell Biol* **115**, 1639-1650.
- Gräf, R.**, (2001). Isolation of centrosomes from Dictyostelium. *Methods Cell Biol* **67**, 337-357.
- Gräf, R.**, (2002). DdNek2, the first non-vertebrate homologue of human Nek2, is involved in the formation of microtubule-organizing centers. *J Cell Sci* **115**, 1919-1929.
- Gräf, R., 2009. Microtubule Organisation in Dictyostelium. eLS. John Wiley & Sons Ltd, Chichester.
- Gräf, R., Batsios, P., Meyer, I.**, (2015). Evolution of centrosomes and the nuclear lamina: Amoebozoan assets. *Eur J Cell Biol* **94**, 249-256.
- Gräf, R., Brusis, N., Dauderer, C., Euteneuer, U., Hestermann, A., Schliwa, M., Ueda, M.**, (2000). Comparative structural, molecular, and functional aspects of the Dictyostelium discoideum centrosome. *Curr Top Dev Biol* **49**, 161-185.
- Gräf, R., Dauderer, C., Schliwa, M.**, (1999). Cell cycle-dependent localization of monoclonal antibodies raised against isolated Dictyostelium centrosomes. *Biol Cell* **91**, 471-477.
- Gräf, R., Euteneuer, U., Ho, T.H., Rehberg, M.**, (2003). Regulated expression of the centrosomal protein DdCP224 affects microtubule dynamics and reveals mechanisms for the control of supernumerary centrosome number. *Mol Biol Cell* **14**, 4067-4074.
- Gräf, R., Euteneuer, U., Ueda, M., Schliwa, M.**, (1998). Isolation of nucleation-competent centrosomes from Dictyostelium discoideum. *Eur J Cell Biol* **76**, 167-175.
- Hallak, M.E., Rodriguez, J.A., Barra, H.S., Caputto, R.**, (1977). Release of tyrosine from tyrosinated tubulin. Some common factors that affect this process and the assembly of tubulin. *FEBS Lett* **73**, 147-150.
- Hestermann, A., Rehberg, M., Graf, R.**, (2002). Centrosomal microtubule plus end tracking proteins and their role in Dictyostelium cell dynamics. *J Muscle Res Cell Motil* **23**, 621-630.
- Horton, R.M., Ho, S.N., Pullen, J.K., Hunt, H.D., Cai, Z., Pease, L.R.**, (1993). Gene splicing by overlap extension. *Methods Enzymol* **217**, 270-279.
- Huber, R.J.**, (2014). The cyclin-dependent kinase family in the social amoebozoan Dictyostelium discoideum. *Cell Mol Life Sci* **71**, 629-639.
- Janke, C., Bulinski, J.C.**, (2011). Post-translational regulation of the microtubule cytoskeleton: mechanisms and functions. *Nat Rev Mol Cell Biol* **12**, 773-786.
- Joseph, J.M., Fey, P., Ramalingam, N., Liu, X.I., Rohlf, M., Noegel, A.A., Muller-Taubenberger, A., Glockner, G., Schleicher, M.**, (2008).

The actinome of *Dictyostelium discoideum* in comparison to actins and actin-related proteins from other organisms. *PLoS One* **3**, e2654.

Joukov, V., Walter, J.C., De Nicolo, A., (2014). The Cep192-organized aurora A-Plk1 cascade is essential for centrosome cycle and bipolar spindle assembly. *Mol Cell* **55**, 578-591.

Kahana, J.A., Schlenstedt, G., Evanchuk, D.M., Geiser, J.R., Hoyt, M.A., Silver, P.A., (1998). The yeast dynactin complex is involved in partitioning the mitotic spindle between mother and daughter cells during anaphase B. *Mol Biol Cell* **9**, 1741-1756.

Khawaja, S., Gundersen, G.G., Bulinski, J.C., (1988). Enhanced stability of microtubules enriched in deetyrosinated tubulin is not a direct function of deetyrosination level. *J Cell Biol* **106**, 141-149.

Kim, D.I., Birendra, K.C., Zhu, W., Motamedchaboki, K., Doye, V., Roux, K.J., (2014). Probing nuclear pore complex architecture with proximity-dependent biotinylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**, E2453-2461.

King, J.S., Insall, R.H., (2009). Chemotaxis: finding the way forward with *Dictyostelium*. *Trends Cell Biol* **19**, 523-530.

Kitanishi, T., Shibaoka, H., Fukui, Y., (1984). Disruption of microtubules and retardation of development of *Dictyostelium* with ethyl-N-phenylcarbamate and thiabendazole. *Protoplasma* **120**, 185-196.

Kleylein-Sohn, J., Westendorf, J., Le Clech, M., Habedanck, R., Stierhof, Y.D., Nigg, E.A., (2007). Plk4-induced centriole biogenesis in human cells. *Dev Cell* **13**, 190-202.

Kollman, J.M., Merdes, A., Mourey, L., Agard, D.A., (2011). Microtubule nucleation by gamma-tubulin complexes. *Nat Rev Mol Cell Biol* **12**, 709-721.

Kruger, A., Batsios, P., Baumann, O., Luckert, E., Schwarz, H., Stick, R., Meyer, I., Graf, R., (2012). Characterization of NE81, the first lamin-like nucleoskeleton protein in a unicellular organism. *Mol Biol Cell* **23**, 360-370.

Kuhnert, O., Baumann, O., Meyer, I., Graf, R., (2012a). CP55, a novel key component of centrosomal organization in *Dictyostelium*. *Cell Mol Life Sci* **69**, 3651-3664.

Kuhnert, O., Baumann, O., Meyer, I., Graf, R., (2012b). Functional characterization of CP148, a novel key component for centrosome integrity in *Dictyostelium*. *Cell Mol Life Sci* **69**, 1875-1888.

Kyhse-Andersen, (1984). Electrophoretic transfer of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J Biochem Biophys Methods* **10**, 203-209.

Laemmli, U.K., (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.

Lane, H.A., Nigg, E.A., (1996). Antibody microinjection reveals an essential role for human polo-like kinase 1 (Plk1) in the functional maturation of mitotic centrosomes. *J Cell Biol* **135**, 1701-1713.

Li, H., Chen, Q., Kaller, M., Nellen, W., Graf, R., De Lozanne, A., (2008). *Dictyostelium* Aurora kinase has properties of both Aurora A and Aurora B kinases. *Eukaryotic Cell* **7**, 894-905.

- Linck, R.W., Stephens, R.E.**, (2007). Functional protofilament numbering of ciliary, flagellar, and centriolar microtubules. *Cell Motil Cytoskeleton* **64**, 489-495.
- Lupas, A., Van Dyke, M., Stock, J.**, (1991). Predicting coiled coils from protein sequences. *Science* **252**, 1162-1164.
- Ma, S., Trivinos-Lagos, L., Graf, R., Chisholm, R.L.**, (1999). Dynein intermediate chain mediated dynein-dynactin interaction is required for interphase microtubule organization and centrosome replication and separation in *Dictyostelium*. *J Cell Biol* **147**, 1261-1274.
- Mana-Capelli, S., Graf, R., Larochele, D.A.**, (2010). *Dictyostelium* centrin B localization during cell cycle progression. *Commun Integr Biol* **3**, 39-41.
- Martens, H., Novotny, J., Oberstrass, J., Steck, T.L., Postlethwait, P., Nellen, W.**, (2002). RNAi in *Dictyostelium*: the role of RNA-directed RNA polymerases and double-stranded RNase. *Mol Biol Cell* **13**, 445-453.
- McKinney, E.C., Meagher, R.B.**, (1998). Members of the Arabidopsis actin gene family are widely dispersed in the genome. *Genetics* **149**, 663-675.
- Meng, L., Park, J.E., Kim, T.S., Lee, E.H., Park, S.Y., Zhou, M., Bang, J.K., Lee, K.S.**, (2015). Bimodal Interaction of Mammalian Polo-Like Kinase 1 and a Centrosomal Scaffold, Cep192, in the Regulation of Bipolar Spindle Formation. *Mol Cell Biol* **35**, 2626-2640.
- Nigg, E.A., Stearns, T.**, (2011). The centrosome cycle: Centriole biogenesis, duplication and inherent asymmetries. *Nat Cell Biol* **13**, 1154-1160.
- Noegel, A.A., Schleicher, M.**, (2000). The actin cytoskeleton of *Dictyostelium*: a story told by mutants. *J Cell Sci* **113 (Pt 5)**, 759-766.
- O'Day, D.H., Budniak, A.**, (2015). Nucleocytoplasmic protein translocation during mitosis in the social amoebozoan *Dictyostelium discoideum*. *Biol Rev Camb Philos Soc* **90**, 126-141.
- Pagan, J., Pagano, M.**, (2011). FBXW5 controls centrosome number. *Nat Cell Biol* **13**, 888-890.
- Paturle-Lafanechere, L., Edde, B., Denoulet, P., Van Dorsselaer, A., Mazarguil, H., Le Caer, J.P., Wehland, J., Job, D.**, (1991). Characterization of a major brain tubulin variant which cannot be tyrosinated. *Biochemistry* **30**, 10523-10528.
- Peris, L., Thery, M., Faure, J., Saudi, Y., Lafanechere, L., Chilton, J.K., Gordon-Weeks, P., Galjart, N., Bornens, M., Wordeman, L., Wehland, J., Andrieux, A., Job, D.**, (2006). Tubulin tyrosination is a major factor affecting the recruitment of CAP-Gly proteins at microtubule plus ends. *J Cell Biol* **174**, 839-849.
- Peris, L., Wagenbach, M., Lafanechere, L., Brocard, J., Moore, A.T., Kozielski, F., Job, D., Wordeman, L., Andrieux, A.**, (2009). Motor-dependent microtubule disassembly driven by tubulin tyrosination. *J Cell Biol* **185**, 1159-1166.
- Pollard, T.D., Cooper, J.A.**, (2009). Actin, a central player in cell shape and movement. *Science* **326**, 1208-1212.
- Prassler, J., Murr, A., Stocker, S., Faix, J., Murphy, J., Marriott, G.**, (1998). DdLIM is a cytoskeleton-associated protein involved in the protrusion of lamellipodia in *Dictyostelium*. *Mol Biol Cell* **9**, 545-559.

- Prigent, C., Glover, D.M., Giet, R.**, (2005). Drosophila Nek2 protein kinase knockdown leads to centrosome maturation defects while overexpression causes centrosome fragmentation and cytokinesis failure. *Exp Cell Res* **303**, 1-13.
- Putzler, S., Meyer, I., Gräf, R.**, (2016). CP91 is a component of the Dictyostelium centrosome involved in centrosome biogenesis. *European Journal of Cell Biology*.
- Raper, K.B.**, (1935). Dictyostelium discoideum, a new species of slime mold decaying forest leaves. *J. Agr. Res* **50**, 135-147.
- Raybin, D., Flavin, M.**, (1977). Enzyme which specifically adds tyrosine to the alpha chain of tubulin. *Biochemistry* **16**, 2189-2194.
- Rehberg, M., Gräf, R.**, (2002). Dictyostelium EB1 is a genuine centrosomal component required for proper spindle formation. *Mol Biol Cell* **13**, 2301-2310.
- Rehberg, M., Kleylein-Sohn, J., Faix, J., Ho, T.H., Schulz, I., Graf, R.**, (2005). Dictyostelium LIS1 is a centrosomal protein required for microtubule/cell cortex interactions, nucleus/centrosome linkage, and actin dynamics. *Molecular Biology of the Cell* **16**, 2759-2771.
- Reinders, Y., Schulz, I., Graf, R., Sickmann, A.**, (2006). Identification of novel centrosomal proteins in Dictyostelium discoideum by comparative proteomic approaches. *J Proteome Res* **5**, 589-598.
- Robinson, D.N., Spudich, J.A.**, (2004). Mechanics and regulation of cytokinesis. *Curr Opin Cell Biol* **16**, 182-188.
- Rodrigues-Martins, A., Riparbelli, M., Callaini, G., Glover, D.M., Bettencourt-Dias, M.**, (2007). Revisiting the role of the mother centriole in centriole biogenesis. *Science* **316**, 1046-1050.
- Roux, K.J., Kim, D.I., Raida, M., Burke, B.**, (2012). A promiscuous biotin ligase fusion protein identifies proximal and interacting proteins in mammalian cells. *J Cell Biol* **196**, 801-810.
- Samereier, M., Baumann, O., Meyer, I., Graf, R.**, (2010a). Analysis of Dictyostelium TACC reveals differential interactions with CP224 and unusual dynamics of Dictyostelium microtubules. *Cell Mol Life Sci*.
- Samereier, M., Baumann, O., Meyer, I., Graf, R.**, (2011). Analysis of Dictyostelium TACC reveals differential interactions with CP224 and unusual dynamics of Dictyostelium microtubules. *Cell Mol Life Sci* **68**, 275-287.
- Samereier, M., Meyer, I., Koonce, M.P., Graf, R.**, (2010b). Live cell-imaging techniques for analyses of microtubules in Dictyostelium. *Methods Cell Biol* **97**, 341-357.
- Schliwa, M.**, (1982). Action of cytochalasin D on cytoskeletal networks. *J Cell Biol* **92**, 79-91.
- Schnackenberg, B.J., Khodjakov, A., Rieder, C.L., Palazzo, R.E.**, (1998). The disassembly and reassembly of functional centrosomes in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 9295-9300.
- Schneider, N., Weber, I., Faix, J., Prassler, J., Muller-Taubenberger, A., Kohler, J., Burghardt, E., Gerisch, G., Marriott, G.**, (2003). A Lim protein involved in the progression of cytokinesis and regulation of the mitotic spindle. *Cell Motil Cytoskeleton* **56**, 130-139.
- Schroer, T.A.**, (2004). Dynactin. *Annu Rev Cell Dev Biol* **20**, 759-779.

- Schulz, I., Baumann, O., Samereier, M., Zoglmeier, C., Graf, R.,** (2009a). Dictyostelium Sun1 is a dynamic membrane protein of both nuclear membranes and required for centrosomal association with clustered centromeres. *European Journal of Cell Biology* **88**, 621-638.
- Schulz, I., Erle, A., Graf, R., Kruger, A., Lohmeier, H., Putzler, S., Samereier, M., Weidenthaler, S.,** (2009b). Identification and cell cycle-dependent localization of nine novel, genuine centrosomal components in Dictyostelium discoideum. *Cell Motil Cytoskeleton* **66**, 915-928.
- Schulz, I., Reinders, Y., Sickmann, A., Graf, R.,** (2006). An improved method for Dictyostelium centrosome isolation. *Methods Mol Biol* **346**, 479-489.
- Strnad, P., Leidel, S., Vinogradova, T., Euteneuer, U., Khodjakov, A., Gonczy, P.,** (2007). Regulated HsSAS-6 levels ensure formation of a single procentriole per centriole during the centrosome duplication cycle. *Dev Cell* **13**, 203-213.
- Sutherland, B.W., Spiegelman, G.B., Weeks, G.,** (2001). A Ras subfamily GTPase shows cell cycle-dependent nuclear localization. *EMBO Rep* **2**, 1024-1028.
- Teixido-Travesa, N., Villen, J., Lacasa, C., Bertran, M.T., Archinti, M., Gygi, S.P., Caelles, C., Roig, J., Luders, J.,** (2010). The gammaTuRC revisited: a comparative analysis of interphase and mitotic human gammaTuRC redefines the set of core components and identifies the novel subunit GCP8. *Mol Biol Cell* **21**, 3963-3972.
- Tikhonenko, I., Irizarry, K., Khodjakov, A., Koonce, M.P.,** (2016). Organization of microtubule assemblies in Dictyostelium syncytia depends on the microtubule crosslinker, Ase1. *Cell Mol Life Sci* **73**, 859-868.
- Ueda, M., Schliwa, M., Euteneuer, U.,** (1999). Unusual centrosome cycle in Dictyostelium: correlation of dynamic behavior and structural changes. *Mol Biol Cell* **10**, 151-160.
- Valetti, C., Wetzel, D.M., Schrader, M., Hasbani, M.J., Gill, S.R., Kreis, T.E., Schroer, T.A.,** (1999). Role of dynactin in endocytic traffic: effects of dynamitin overexpression and colocalization with CLIP-170. *Mol Biol Cell* **10**, 4107-4120.
- Vaughan, K.T., Tynan, S.H., Faulkner, N.E., Echeverri, C.J., Vallee, R.B.,** (1999). Colocalization of cytoplasmic dynein with dynactin and CLIP-170 at microtubule distal ends. *J Cell Sci* **112 (Pt 10)**, 1437-1447.
- Wang, G., Jiang, Q., Zhang, C.,** (2014). The role of mitotic kinases in coupling the centrosome cycle with the assembly of the mitotic spindle. *J Cell Sci* **127**, 4111-4122.
- Webster, D.R., Gundersen, G.G., Bulinski, J.C., Borisy, G.G.,** (1987). Differential turnover of tyrosinated and detyrosinated microtubules. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**, 9040-9044.
- Wehland, J., Willingham, M.C.,** (1983). A rat monoclonal antibody reacting specifically with the tyrosylated form of alpha-tubulin. II. Effects on cell movement, organization of microtubules, and intermediate filaments, and arrangement of Golgi elements. *J Cell Biol* **97**, 1476-1490.
- Weijer, C.J.,** (2009). Collective cell migration in development. *J Cell Sci* **122**, 3215-3223.

Williams, K.L., Newell, P.C., (1976). A genetic study of aggregation in the cellular slime mould *Dictyostelium discoideum* using complementation analysis. *Genetics* **82**, 287-307.

Williams, R.S., Boeckeler, K., Graf, R., Muller-Taubenberger, A., Li, Z., Isberg, R.R., Wessels, D., Soll, D.R., Alexander, H., Alexander, S., (2006). Towards a molecular understanding of human diseases using *Dictyostelium discoideum*. *Trends Mol Med* **12**, 415-424.

Wulf, E., Deboben, A., Bautz, F.A., Faulstich, H., Wieland, T., (1979). Fluorescent phallotoxin, a tool for the visualization of cellular actin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**, 4498-4502.

Yu, I., Garnham, C.P., Roll-Mecak, A., (2015). Writing and Reading the Tubulin Code. *J Biol Chem* **290**, 17163-17172.

Abkürzungen

AS	Aminosäure
ATP	Adenosine-5'-triphosphat
BCIP	Bromo-chloro-indolylphosphat
BSA	Rinderserumalbumin ("bovine serum albumin")
C-	Carboxyterminal
Dd	<i>Dictyostelium discoideum</i>
DMF	Dimethylformamid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dNTP	Desoxyribonucleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
et al.	"And others"
g	Gravitation
g	Gramm
GFP	Grün-fluoreszierendes-Protein
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-Ethansulfonsäure
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid
kD	Kilo-Dalton
MBP	Maltose-bindendes-Protein
N-	Aminoterminal
NBT	Nitroblautetrazoliumchlorid
OD	Optische Dichte
p.a.	pro analysi (= für analytisch Zwecke)
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat gepufferte isotonische Salzlösung
PCR	Polymerase Kettenreaktion ("polymerase chain reaction")
PIPES	1,4-Piperazindiethan-Sulfonsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute

SDS	Sodium (Natrium)-dodecylsulfat
TBS	Tris gepufferte isotonische Salzlösung
TEMED	N, N, N, N'-Tetramethylenediamin
Tris	Tris-hydroxymethyl-ammoniumethan
Triton-X-100	t-Octylphenoxyethoxyethanol

Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name: Tatjana Peter, geb. Walter
Geburtsdatum und Ort: 24. August 1983, Kaskelen in Kasachstan
Staatsangehörigkeit: Deutsch

Praktische Erfahrungen

Seit 08.2010 **Wissenschaftliche Mitarbeiterin**
AG Zellbiologie am Institut für Biochemie und Biologie der Universität Potsdam

Promotionsarbeit: **„Molekulare Charakterisierung von CP75, einem neuen centrosomalen Protein in *Dictyostelium discoideum*“**

2007-2009 **Studentische Mitarbeiterin**
AG Molekularbiologie am Institut für Biochemie und Biologie der Universität Potsdam

Forschungsprojekte : **„Synthetische Biologie“
„KCO-Kanäle in *Arabidopsis thaliana*“**

Studium

03.2005-01.2010 **Studium der Biologie an der Universität Potsdam**
Thema der Diplomarbeit „Aufbau und Analyse artifizierlicher genregulatorischer Netzwerke“ (Note 1,0)

10.2004-02.2005 **Studium der Biologie an der Justus-Liebig Universität in Gießen**

Praktika

05.2008 **Institut für vegetative Anatomie der Charité-Universitätsmedizin Berlin: Immunhistochemie**

08.2007-09.2007 **Max-Planck Institut für Molekulare Pflanzenphysiologie:** Gaschromatographie, HPLC, Massenspektrometrie
07.2003 **Biotechnische Betriebseinheit der Justus-Liebig Universität in Gießen:** Molekularbiologie

Schule

02.2001-07.2004 Evangelisches Gymnasium Hermannswerder in Potsdam, Abschluss: Abitur

09.1989-10.2000 Gymnasium in Almaty, Kasachstan

Sprachkenntnisse

Russisch	Muttersprache
Deutsch	Muttersprachenniveau
Englisch	gut
Französisch	Grundkenntnisse

Danksagung

Mein allergrößter Dank gilt Prof. Dr. Ralph Gräf, dem besten, coolsten und verständnisvollsten Doktorvater, den man sich wünschen hat. Er hat sich immer Zeit für einen genommen, gute Ratschläge gegeben und stets in allen Sachen unterstützt.

Ich möchte mich auch bei Dr. Irene Meyer für ihre Unterstützung bei Experimenten, anregende Diskussionsrunden und Korrekturlesen herzlich bedanken.

Außerdem möchte ich mich sehr herzlich bei Prof. Dr. Silke Leimkühler und Prof. Dr. Christian Hammann für die Bereitschaft bedanken, diese Arbeit zu begutachten.

Vielen Dank auch an Anita Guhlan für ihre tatkräftige Unterstützung im Labor und Sandra Pauluhn für ihre Hilfsbereitschaft und immer ein offenes Ohr für mich. Unsere lustigen Mittags- und Kaffeepausen werden mir fehlen.

Ich danke Dr. Petros Batsios dafür, dass er ein toller Büronachbar war und mir immer in allen Fragen geholfen hatte. Und ich danke Dr. Oliver Kuhnert für die Einarbeitung am Anfang der Promotion und für seine große Hilfsbereitschaft.

Vielen Dank an meine liebe Freundin Aljona für das Korrekturlesen, aufmunternde Worte und große Unterstützung!

Schließlich möchte ich mich bei meinem Mann Mihail für seine große Liebe und unerschütterliche Geduld und bei meinem kleinen Sonnenschein Leo dafür, dass er mein Leben einfach besser gemacht hat, herzlich bedanken.

Ein besonderer Dank gilt meinen Eltern, die immer an mich geglaubt und mir vieles ermöglicht haben. Papa, auch wenn Du dieses Moment nicht mehr so miterleben wirst, wie ich mir das gerne gewünscht hätte, habe ich es auch für Dich gemacht!