

**DdEB1, DdMoe1 und DdLIS1:
drei neue, centrosomale und
Mikrotubuli-assoziierte Proteine bei
*Dictyostelium discoideum***

Dissertation
der Fakultät für Biologie der
Ludwig-Maximilians-Universität
München

vorgelegt von
Markus Rehberg
aus Prien am Chiemsee
Januar 2004

Ehrenwörtliche Versicherung

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

Markus Rehberg
Prien, Januar 2004

Dissertation eingereicht: 30.01.2004

Tag der mündlichen Prüfung: 03.03.2005

Erstgutachter: Prof. Dr. Harry K. MacWilliams

Zweitgutachter: Prof. Dr. Michael Boshart

Sondergutachter: PD Dr. Ralph Gräf

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Originalarbeiten:

Markus Rehberg and Ralph Gräf. (2002). *Dictyostelium* EB1 is a genuine centrosomal component required for proper spindle formation. *Mol Biol Cell* 13(7):2301-2310.

Ralph Gräf, Ursula Euteneuer, Thi-Hieu Ho and Markus Rehberg (2003). Regulated expression of the centrosomal protein DdCP224 affects microtubule dynamics and reveals mechanisms for the control of supernumerary centrosome number. *Mol Biol Cell* 14(10):4067-4074.

Übersichtsartikel

Hestermann, A., Rehberg, M. and Gräf, R. (2002). Centrosomal microtubule plus end tracking proteins and their role in *Dictyostelium* cell dynamics. *J. Muscle Res. Cell Motil.*, 23: 621-630

Tagungsbeiträge:

Markus Rehberg and Ralph Gräf (2002). DdMoe1, a homologue of the EB1-binding Moe1 protein, is a microtubule associated protein and a permanent centrosomal resident in *Dictyostelium*. *Mol Biol Cell* 13(11) Supplement

Markus Rehberg, Julia Kleylein-Sohn, Irene Schulz and Ralph Gräf (2003). *Dictyostelium* LIS1 is a centrosomal and microtubule-associated protein required for microtubule / cell cortex interactions and cell migration. *Mol Biol Cell* 14(11) Supplement

Die vorliegende Arbeit wurde von Mai 2000 bis September 2004 im Labor von Prof. Dr. Manfred Schliwa angefertigt und von PD. Dr. Ralph Gräf betreut. Die Vertretung vor der Fakultät wurde von Prof. Dr. Harry MacWilliams übernommen. Gefördert wurde die Arbeit durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft.

CD-Supplement:

Ergänzend liegt dieser Arbeit eine CD mit Animationssequenzen einiger Abbildungen bei.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	1
Zusammenfassung	5
Abkürzungen	7
1. Einleitung	9
1.1 <i>Dictyostelium discoideum</i> als Modellorganismus	9
1.2 Das Mikrotubuli-Cytoskelett	10
1.2.1 Mikrotubulidynamik	10
1.2.2 Das Mikrotubuli-Cytoskelett bei <i>Dictyostelium</i>	11
1.3 Struktur und Funktion von Centrosomen	12
1.4 Centrosomenduplikation bei <i>Dictyostelium</i>	14
1.5 Die Rolle von Mikrotubuli-plus-End bindenden Proteinen	15
1.6 Ziele dieser Arbeit	17
1.6.1 EB1-Proteine	18
1.6.2 Moe1-Proteine	19
1.6.3 LIS1-Proteine	20
2. Material und Methoden	22
2.1 Material	22
2.1.1 Reagenzien	22
2.1.2 Antikörper	22
2.1.3 Enzyme	23
2.1.4 Inhibitoren	23
2.1.5 Antibiotika	23
2.1.6 Medien	23
2.1.6.1 Medien für die <i>D. discoideum</i> Kultur	23
2.1.6.2 Medien für die <i>E. coli</i> Kultur	24
2.1.7 Puffer und Lösungen	25
2.1.8 Vektoren	26
2.1.9 Bakterien und <i>D. discoideum</i> Stämme	26
2.1.10 Computer Programme	26
2.1.11 Andere Materialien	27
2.2 Molekularbiologische Methoden	27
2.2.1 Agarose-Gelelektrophorese	27
2.2.2 DNA Extraktion aus Agarosegelen	27
2.2.3 Bestimmung der DNA-Konzentration	27

Inhaltsverzeichnis

2.2.4	Präparation von Plasmid-DNA	28
2.2.5	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	28
2.2.6	Reverse-Transkriptions-PCR (RT-PCR)	28
2.2.7	Oligonukleotide	29
2.2.9	Phosphatase Behandlung	30
2.2.10	Überführung überstehender Enden in glatte Enden	30
2.2.11	DNA-Ligase Reaktion	31
2.2.12	Herstellung elektrokompenter <i>E. coli</i> Zellen	31
2.2.13	Elektrotransformation von <i>E. coli</i> Zellen	31
2.2.14	Identifikation transformierter Klone in <i>E. coli</i>	31
2.2.15	Präparation chromosomaler DNA aus <i>D. discoideum</i>	32
2.2.16	Transformation und Klonierung von <i>D. discoideum</i>	32
2.2.17	Isolierung polyadenylierter RNA aus <i>D. discoideum</i>	33
2.2.18	Digoxygenin-Markierung von DNA-Sonden, Hybridisierung und Detektion	33
2.2.19	“Screening” von cDNA- und genomischen Bibliotheken	34
2.2.20	Vektor Konstruktionen	35
2.2.20.1	Konstruktion der MBP-DdEB1 Expressionsvektoren	35
2.2.20.2	Konstruktion der GFP-DdEB1 Expressionsvektoren	36
2.2.20.3	Konstruktion des DdEB1 Gendisruptionsvektors und Herstellung einer DdEB1-Nullmutante	36
2.2.20.4	Konstruktion des MBP-DdMoe1 <i>E. coli</i> Expressionsvektors	36
2.2.20.5	Konstruktion des GFP-DdMoe1 Expressionsvektors	37
2.2.20.6	Klonierung der kompletten DdLIS1 Sequenz	37
2.2.20.7	Konstruktion der MBP-DdLIS1 Expressionsvektoren	37
2.2.20.8	Konstruktion des GFP-DdLIS1 Expressionsvektors	38
2.2.20.9	Konstruktion des DICAC-myc Expressionsvektors	38
2.2.20.10	Konstruktion des GFP- α -Tubulin Expressionsvektors	38
2.3	Biochemische und Immunologische Methoden	38
2.3.1	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	38
2.3.2	Native Gradientengelelektrophorese	39
2.3.3	Coomassie-Blau-Färbung von Proteinen	39
2.3.4	Methanol/Chloroform Proteinpräzipitation	39
2.3.5	Immunoblot (Western Blot), Immunfärbung und Chemilumineszenz	40
2.3.6	Bestimmung der Proteinkonzentration	40
2.3.7	Aufreinigung von bakteriell exprimierten MBP-Fusionsproteinen durch Amylose-Affinitätschromatographie	41
2.3.8	Gewinnung von cytosolischen Extrakten, Kernen und Centrosomen aus <i>D. discoideum</i>	41
2.3.9	Gelfiltration	42
2.3.10	Herstellung von polyklonalen Antisera aus Kaninchen	43
2.3.11	Kovalente Kopplung von Antikörpern und Proteinen an NHS-aktivierte Sepharose	43
2.3.12	Immunpräzipitation	44
2.3.13	Bestimmung des F-Aktin Gehalts	45

2.4	Zellbiologische Methoden	45
2.4.1	Kultivierung und Konservierung von <i>E. coli</i>	45
2.4.2	Kultivierung und Sporenkonservierung von <i>D. discoideum</i>	45
2.4.3	Nocodazolbehandlung und Latrunculin A Behandlung	46
2.4.4	Indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie von <i>D. discoideum</i> und isolierten Centrosomen	46
2.4.5	Konfokale Mikroskopie	47
3.	Ergebnisse	49
3.1	Untersuchung von <i>D. discoideum</i> EB1	49
3.1.1	Klonierung von DdEB1	49
3.1.2	Untersuchung der subzellulären Lokalisation	50
3.1.2.1	Untersuchung der Lokalisation von DdEB1 mit Hilfe polyklonaler Antikörper und einer GFP-Mutante	50
3.1.2.2	DdEB1 ist ein integraler Bestandteil der centrosomalen Corona	51
3.1.3	Die DdEB1 Mikrotubuli-Bindung benötigt die „coiled-coil“-Domäne	53
3.1.3.1	Analyse der Domänenstruktur von DdEB1 durch Expression von GFP-DdEB1-Deletionsmutanten	53
3.1.3.2	Analyse der „coiled-coil“-Domäne durch Expression von MBP-DdEB1 Deletionen	55
3.1.4	DdEB1 interagiert mit DdCP224 und Dynein	57
3.1.4.1	DdEB1 und DdCP224 colokalisieren an Mikrotubulienden und sind Bestandteil des selben cytosolischen Komplexes	57
3.1.4.2	DdEB1 interagiert mit der intermediären Dyneinkette (DIC) und der schweren Dyneinkette (DHC)	59
3.1.5	Untersuchung der Funktion von DdEB1	60
3.1.5.1	Herstellung einer DdEB1-Nullmutante	60
3.1.5.2	DdEB1 wird zur korrekten Ausbildung der Mitosespindel benötigt	61
3.2	Untersuchung von <i>D. discoideum</i> Moe1	64
3.2.1	Klonierung und Sequenzvergleich von DdMoe1	64
3.2.2	Untersuchung der subzellulären Lokalisation von DdMoe1	65
3.2.2.1	Herstellung eines MBP-DdMoe1-Fusionsproteins und polyklonaler Antikörper	65
3.2.2.2	DdMoe1 lokalisiert entlang von Mikrotubuli und ist ein Bestandteil des Centrosoms	66
3.2.2.3	Lokalisation von GFP-DdMoe1	68
3.2.2.4	Die Lokalisation von DdMoe1 an Mikrotubuli ist nicht von DdEB1 abhängig	70
3.2.3	Untersuchungen zur Funktion von DdMoe1	70
3.3	Untersuchung von <i>D. discoideum</i> LIS1	72
3.3.1	Klonierung von DdLIS1	72
3.3.2	Untersuchung der subzellulären Lokalisation von DdLIS1	73
3.3.2.1	Untersuchung der Lokalisation von DdLIS1 mit Hilfe polyklonaler Antikörper	73
3.3.2.2	DdLIS1 und DHC sind integrale Bestandteile der centrosomalen Corona	74

Inhaltsverzeichnis

3.3.3	Für die Untersuchung von DdLIS1 erzeugte Mutanten	75
3.3.4	Analyse der Lokalisation von GFP-DdLIS1 vom Beginn bis zum Ende einer Mitose	76
3.3.5	DdLIS1 spielt eine Rolle bei der Cytokinese und dem Spindelaufbau	78
3.3.6	DdLIS1 spielt eine Rolle bei der Mikrotubuli/Zellcortex Verankerung	79
3.3.6.1	DdLIS1-Überexpression führt zu Disorganisation des Mikrotubuli-Cytoskeletts	79
3.3.6.2	DdLIS1 interagiert mit DdCP224 und der schweren Dyneinkette	82
3.3.6.3	Überexpression von DdLIS1 verursacht einen Zerfall des Golgi-Apparates	83
3.3.7	DdLIS1-Überexpression verringert Zellmotilität und verändert die Aktindynamik	84
3.3.7.1	DdLIS1-Überexpression führt zu verringerter Zellmotilität	84
3.3.7.2	<i>Dictyostelium</i> Zellmotilität benötigt kein intaktes Mikrotubuli-Cytoskelett	86
3.3.7.3	DdLIS1 exprimierende GFP-Aktin-Zellen zeigen eine veränderte Aktindynamik	87
3.3.7.4	F-Aktin Verteilung und Gehalt sind in GFP-DdLIS1-Mutanten verändert	90
3.3.7.5	DdLIS1 Expression verändert den F-Aktin/G-Aktin Gehalt ähnlich wie eine Behandlung mit Latrunculin A	91
3.3.8	Überexpression der intermediären Dyneinkette führt zu Störung der Mikrotubuli/Zellcortex Verankerung und einer Veränderung des Aktin-Cytoskelett	92
4.	Diskussion	94
4.1	Untersuchung von <i>D. discoideum</i> EB1	94
4.1.1	Domänenanalyse und Bindungspartner von DdEB1	94
4.1.2	DdEB1 Funktion bei der Mitose	96
4.2	Untersuchung von <i>D. discoideum</i> Moe1	98
4.3	Untersuchung von <i>D. discoideum</i> LIS1	100
4.3.1	DdLIS1 ist ein integraler Bestandteil des Centrosoms	100
4.3.2	DdLIS1 Funktion bei der Mikrotubuli/Zellcortex Verankerung	100
4.3.3	Spindelaberrationen und Cytokinesedefekte	102
4.3.4	Das Mikrotubuli-Cytoskelett ermöglicht gerichtete Zellbewegung	104
4.3.5	DdLIS1-Überexpression beeinflusst die Aktindynamik	105
4.3.6	DdLIS1 ist bei der Kontrolle der Aktindynamik durch kleine GTPasen beteiligt	106
5.	Literatur	109
	Lebenslauf	120
	Danksagung	121

Zusammenfassung

Die Organisation und Dynamik des Mikrotubuli-Cytoskeletts wird von großen Proteinkomplexen an den plus- und minus-Enden der Mikrotubuli reguliert. Am minus-Ende befindet sich das Centrosom, das als Mikrotubuli-organisierendes Zentrum dient. Am plus-Ende der Mikrotubuli findet sich ein Komplex von Proteinen, der die Dynamik der Mikrotubuli reguliert sowie ihre Verankerung am Zellcortex vermittelt. DdCP224 ist ein centrosomales und Mikrotubuli-assoziiertes Protein bei *Dictyostelium discoideum*, das zur ubiquitären XMAP215-Familie gehört und eine wichtige Rolle bei der Dynamik des Centrosoms und des Mikrotubuli-Cytoskeletts spielt. Ziel dieser Arbeit war die Charakterisierung zuvor unbekannter *Dictyostelium*-Proteine, die mit DdCP224 bei diesen dynamischen Vorgängen zusammenwirken.

Mit DdEB1, DdMoe1 und DdLIS1 konnten drei neue Mikrotubuli-assoziierte Proteine bei *Dictyostelium* identifiziert und charakterisiert werden. Alle drei Proteine konnten gleichzeitig auch als echte centrosomale Bestandteile nachgewiesen werden, da ihre Lokalisation am Centrosom unabhängig von Mikrotubuli ist. DdEB1 ist aufgrund seines Molekulargewichts, das größte Mitglied der ubiquitären EB1-Proteinfamilie. DdEB1 zeigte eine cytosolische Interaktion mit DdCP224 und Dynein. Am Beispiel von DdEB1 und DdCP224 konnte in dieser Arbeit nicht nur erstmals die Interaktion von Proteinen aus der EB1- und XMAP215-Familie, sondern auch ihre lange vermutete Colokalisation an Mikrotubuli-plus-Enden nachgewiesen werden. Mit Hilfe der Expression von GFP-DdEB1-Deletionsmutanten konnte gezeigt werden, dass die DdEB1 Bindung an Mikrotubuli von einer Homo-Oligomerisierung des Proteins abhängt, die durch eine „coiled-coil“-Domäne vermittelt wird. DdEB1-Nullmutanten zeigen in erster Linie mitotische Defekte, d.h. Störungen der Centrosomenduplikation, Spindelbildung und Chromosomensegregation. Die mikroskopische Analyse lebender Zellen ergab, dass DdEB1 für die Spindelbildung, nicht aber für die Spindelelongation oder die Mikrotubuli/Zellcortex-Interaktion benötigt wird.

Bei der Suche nach möglichen DdEB1-Interaktoren wurde mit DdMoe1 das *Dictyostelium*-Homologe von *Schizosaccharomyces pombe* Moe1 isoliert, das dort ein Interaktionspartner des entsprechenden EB1-Proteins ist. Eine solche Interaktion ist den durchgeführten Untersuchungen zufolge bei *Dictyostelium* jedoch unwahrscheinlich. Dafür konnte hier zum ersten mal ein Moe1-

homologes Protein als echte Centrosomenkomponente identifiziert werden und die Mikrotubuli-Bindung eines solche Proteins *in vivo* nachgewiesen werden.

Wie EB1 ist auch das humane LIS1-Protein ein Mikrotubuli-plus-End und Dynein-assoziiertes Protein. Mutationen in diesem Gen führen zu einer schweren Entwicklungsstörung des Gehirns (Lissenzephalie), aufgrund eines neuronalen Migrationsdefekts. *Dictyostelium* LIS1 (DdLIS1) bindet nicht nur an Dynein, sondern auch an DdCP224, womit auch erstmals die Interaktion mit einem Protein der XMAP215-Familie nachgewiesen werden konnte. DdLIS1 spielt gemeinsam mit Dynein eine Rolle bei der Mikrotubuli/Zellcortex Verankerung, was in DdLIS1-Überexpressionsmutanten deutlich wurde. Die Überexpression von DdLIS1 führte außerdem zur Centrosomenamplifikation, Defekten bei der Organisation der Mitosespindel, schweren Cytokinesedefekten und einer drastisch eingeschränkten Zellmotilität. Letztere steht im Einklang mit dramatischen Veränderungen der Aktindynamik, bei der charakteristische wandernde Aktin-Polymerisationswellen am Zellcortex auftreten. Da derselbe Aktin-Phänotyp auch durch Behandlung von Kontrollzellen mit der F-Aktin depolymerisierenden Droge Latrunculin A simuliert werden konnte wurde angenommen, dass die DdLIS1-Überexpression den Aktin-Gehalt beeinflusst. Tatsächlich konnte in mikroskopischen und biochemischen Nachweisen bestätigt werden, dass die Überexpression von DdLIS1 den F-Aktin Gehalt der Zellen vermindert. Das Mikrotubuli-assoziierte Protein DdLIS1 ist also ein mögliches Bindeglied zwischen dem Mikrotubuli- und Aktin-Cytoskelettsystem.

ABKÜRZUNGEN

AS	Aminosäure
ATP	Adenosine-5'-triphosphat
BCIP	Bromo-chloro-indolylphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin ("bovine serum albumin)
C-	Carboxyterminal
cDNA	komplementäre DNA
Dd	<i>Dictyostelium discoideum</i>
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dNTP	Desoxyribonucleotidtriphosphat
ds	doppelsträngig
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethyleneglykol-bis(2-aminoethylether)-N,N'-tetraessigsäure
et al.	"And others"
FITC	Fluoreszein-Isothiocyanat
g	Gravitation, Gramm
GFP	Grün-fluoreszierendes-Protein
h	Stunde
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-Ethansulfonsäure
H ₂ O	destilliertes Wasser
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalaktopyranosid
IgG	Immunglobulin G
IP	Immunpräzipitation
k	Kilo
kbp	Kilo-Basenpaare
kDa	Kilo-Daltons

Abkürzungen

l	Liter
M	Mol/l
m-	Milli-
μ	Mikro-
MBP	Maltose-bindendes-Protein
Min	Minute
MT	Mikrotubuli
MW	Molekulargewicht
N-	Aminoterminal
NBT	Nitroblautetrazoliumchlorid
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat gepufferte isotonische Salzlösung
PCR	Polymerase Kettenreaktion (“polymerase chain reaction”)
pfu	“Plaque forming units”
PIPES	1,4-Piperazindiethan-Sulfonsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT-PCR	Reverse-Transkriptions-Polymerase Kettenreaktion
s	Sekunde
SDS	Sodium (Natrium)-dodecylsulfat
TBS	Tris gepufferte isotonische Salzlösung
TEMED	N, N, N, N'-Tetramethylenediamin
Tris	Tris-hydroxymethyl-ammoniumethan
Triton-X-100	t-Octylphenoxypolyethoxyethanol
Tween 20	Polyoxyethylen-sorbitanmonolaureat
U	Unit(s), Einheit der Enzymaktivität
4D	vier-dimensional
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Masse pro Volumen
wt	Wildtyp
x	mal, -fach konzentriert

1. Einleitung

1.1 *Dictyostelium discoideum* als Modellorganismus

Dictyostelium discoideum Amöben sind seit langem ein anerkanntes experimentelles System für die Erforschung molekularer und funktioneller Aspekte der Zellbiologie, wie zum Beispiel der Zelldifferenzierung, Zellbewegung, Chemotaxis, Signaltransduktion und Cytoskelettdynamik (Zusammenfassung bei Kessin (2001)). Dies wird durch seine kürzliche Anerkennung als eines von sechs Nicht-Säuger-Modellorganismen durch die National Institutes of Health in den U. S. A. unterstrichen. *Dictyostelium* gehört zur monophyletischen Gruppe der Mycetozoa, die den Pilzen und Tieren nahe steht (Baldauf und Doolittle, 1997). *Dictyostelium* Zellen (Abbildung 1) verhalten sich ähnlich wie amöboid-bewegliche menschliche Zellen (z. B. Makrophagen), sind aber leichter und kostengünstiger in großen Mengen zu kultivieren und einfacher mit gentechnologischen Methoden zu manipulieren. Die Amöben leben unter natürlichen Bedingungen als Bodenorganismen, die sich vegetativ vermehren und von Bakterien ernähren. Bei Nahrungsmangel wird ein einfacher asexueller Entwicklungszyklus induziert (Abbildung 1 A) (Loomis, 1982). Hungernde Zellen produzieren cAMP, das als chemotaktisches Signal wirkt und die Aggregation von jeweils etwa 10^5 Amöben verursacht. Diese bilden zusammen ein vielzelliges, wurmförmiges Zellaggregat „slug“, welches sich kriechend fortbewegen kann und nach Differenzierung in Sporen- und Stielzellen einen Fruchtkörper bildet. Die widerstandsfähigen Sporen keimen bei günstigen Bedingungen und entlassen einzelne Amöben. Hinsichtlich der Erforschung der molekularen Struktur und Funktion des Centrosoms war *Dictyostelium* lange Zeit ein wenig bearbeitetes Modellsystem. Dies lag in erster Linie am Fehlen molekularer Marker und den zunächst vorhandenen Problemen bei der Aufreinigung der *Dictyostelium* Centrosomen. Inzwischen hat *Dictyostelium* aber aufgrund der absehbaren Fertigstellung des Genomprojekts (im Moment liegt ca. fünffache Sequenzabdeckung des Genoms vor; (Kay und Williams, 1999)) und nicht zuletzt durch die in unserem Labor erzielten Erfolge enorm an Attraktivität als Modellorganismus für die Erforschung des Centrosoms gewonnen (Dauderer *et al.*, 1999; Gräf *et al.*, 2000a; Kay und Williams, 1999). Auch gab es vor Beginn dieser Arbeit nur wenige Arbeiten zu Mikrotubuli-assoziierten Proteinen von *Dictyostelium*.

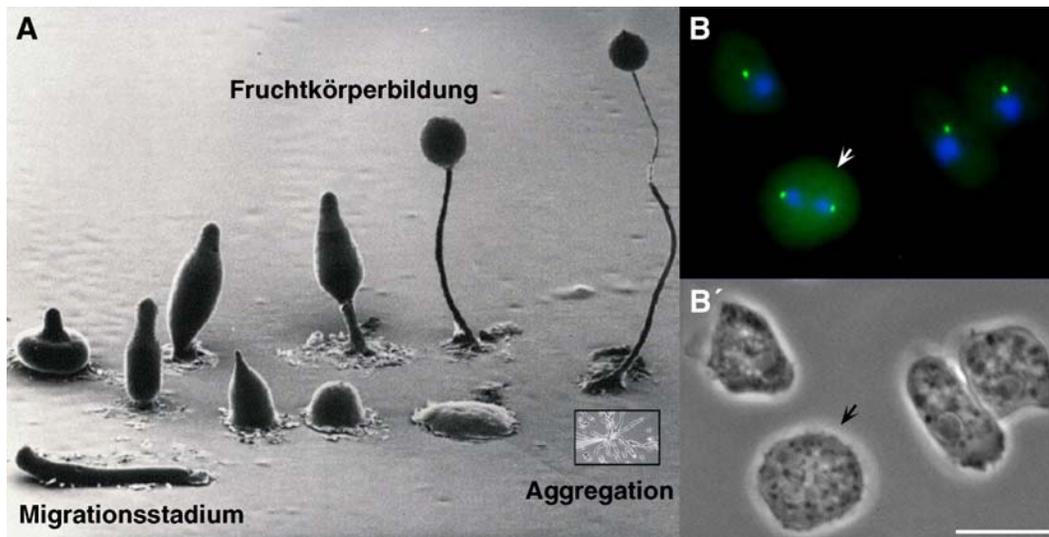


Abbildung 1: Entwicklungszyklus von *Dictyostelium discoideum* (nach R.L. Blanton und M. Grimson). (A) Die frei lebenden Amöben ernähren sich von Bakterien; bei Nahrungsentzug beginnen die Amöben zu aggregieren und ein Zellaggregat auszubilden, das eine Wanderungsphase durchlaufen kann. Unter Laborbedingungen beginnt nach 18 Stunden die Kulmination, bei der die Sporen vom wachsenden Stiel nach oben getragen werden. Das reife Sorocarp zerfällt bei Berührung und setzt die Sporen frei. (B, B') Amöben in Interphase und Mitose (Pfeil). (B) Die Fluoreszenzmikroskopie zeigt eine DAPI-Kernfärbung (blau) und grüne GFP-Fluoreszenz der Centrosomen wegen der Expression eines γ -Tubulin-GFP-Fusionsproteins. (B') Phasenkontrastbild. Balken, 10 μ m. Aus Gräf *et al.* (2000a)

1.2 Das Mikrotubuli-Cytoskelett

1.2.1 Mikrotubulidynamik

Mikrotubuli erfüllen in eukaryotischen Zellen mannigfaltige essentielle Funktionen. So sind sie bei zellulären Transportprozessen, bei der Morphogenese, Zellorganisation und Motilität beteiligt. Strukturell sind Mikrotubuli hohle Röhren mit einem Außendurchmesser von 25 nm. Diese entstehen durch geordnete Polymerisation von Heterodimeren aus α - und β -Tubulin. Mikrotubuli besitzen eine intrinsische Polarität, mit einem *in vitro* schnell wachsenden plus- und einem langsam wachsenden minus-Ende. *In vivo* ist die Mikrotubuli-Polymerisation auf die plus-Enden beschränkt. Die Mikrotubulidynamik wird durch einen als „dynamic instability“ bezeichneten Mechanismus charakterisiert, bei dem einzelne Mikrotubuli ständig zufällig

zwischen Wachstum und Abbau wechseln. Der Übergang von Wachstum zu Deassemblierung heißt „catastrophe“, der Übergang von Deassemblierung zu Wachstum wird „rescue“ genannt. Somit beschreiben vier Parameter die Mikrotubulidynamik: Wachstum („growth“), Abbau („shrinkage rate“), „catastrophe-“ und „rescue“-Frequenz. Zusammenfassung bei Desai und Mitchison (1997).

1.2.2 Das Mikrotubuli-Cytoskelett bei *Dictyostelium*

Das Interphase-Mikrotubulisystem (Abbildung 2) bei *Dictyostelium* besteht aus 30-70 Mikrotubuli, die radial vom Centrosom ausgehen und sich zum Zellcortex hin und an diesem entlang erstrecken (Kimble *et al.*, 2000; Kitanishi-Yumura und Fukui, 1987). Die meisten Mikrotubuli sind nicht gebündelt, haben eine relativ konstante Länge (Kimble *et al.*, 2000) und zeigen kaum plus-End-Dynamik. Dagegen weisen sie eine hohe laterale Motilität mit charakteristischen Biegungs- und Wellenbewegungen auf (Kimble *et al.*, 2000; Neujahr *et al.*, 1998), die nicht auf Cytoplasma Bewegungen, sondern auf spezifische Kräfte zurückzuführen sind, die auf die Mikrotubuli wirken. Diese Kräfte könnten durch die Aktivität von Mikrotubuli-assoziierten Motorproteinen (z.B. Kinesine), durch eine direkte Verbindung zu Aktin/Myosin-Strukturen oder durch die Aktivität von cortical verankerten Motorproteinen (Dynein) entstehen. Entlang der Mikrotubuli findet Organellentransport statt (Ma *et al.*, 2001; Roos *et al.*, 1987). Bei Eintritt in die Mitose werden die Mikrotubuli sehr schnell abgebaut, indem sie vom Centrosom freigesetzt und fragmentiert werden (Kitanishi-Yumura und Fukui, 1987) (vgl. Abbildung 29). Die Mitosespindel wird als kompakte, balkenartige Struktur aus überlappenden Mikrotubuli (Moens, 1976) zwischen den duplizierten Spindelpolen gebildet. Die Kernhülle bleibt dabei als Kontinuum erhalten. (Ueda *et al.*, 1999). Der Eintritt von Tubulin-Dimeren erfolgt durch *Fenestrae* der, in diesem Mitosestadium, porösen Zellkernhülle. Die Anzahl der Spindelpol-assoziierten Mikrotubuli nimmt während der frühen Mitosestadien auf etwa 140-160 in der Metaphase und frühen Anaphase zu (McIntosh *et al.*, 1985). Die sechs Chromosomen werden an den Kinetochoren, die die für höhere Eukaryonten charakteristische Lagenstruktur aufweisen (McIntosh *et al.*, 1985; Moens, 1976), mit den Spindelmikrotubuli verbunden. Die Spindelelongation geschieht hauptsächlich während der Telophase. Die Spindel wird zu diesem

Zeitpunkt um das dreifache verlängert. Erst während der Telophase entsteht eine signifikante Anzahl astraler Mikrotubuli an den Spindelpolen, aus denen nach der erfolgten Cytokinese wieder das Interphase-Cytoskelett gebildet wird.

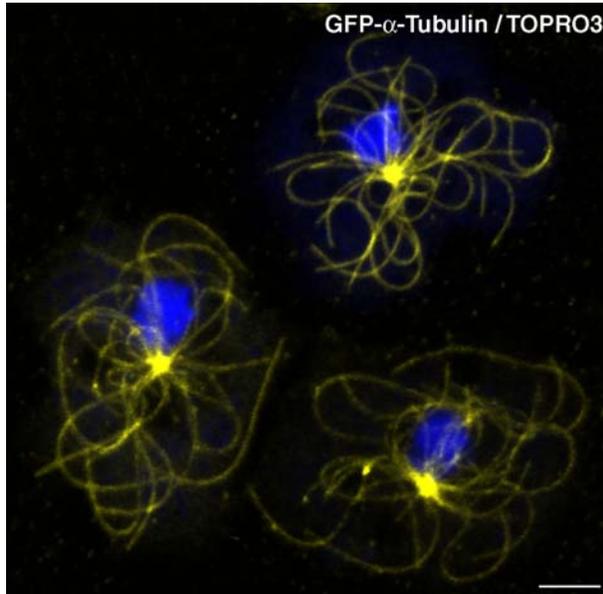


Abbildung 2: Das Interphase-Mikrotubuli-Cytoskelett bei *Dictyostelium*. In der Abbildung sind drei GFP- α -Tubulin exprimierende Zellen gezeigt. Die GFP- α -Tubulin Fluoreszenz ist in gelb und die DNA-Färbung (TOPRO3) in blau dargestellt. Die Bilder sind Projektionen (maximale Intensitäts Modus) konfokaler Bilderstapel (Zeiss 510Meta). Maßstab, 2 μ m.

1.3 Struktur und Funktion von Centrosomen

Die Organisation und Dynamik des Mikrotubuli-Cytoskeletts muss streng reguliert werden. Dies geschieht durch Proteine, die direkt oder indirekt an Mikrotubuli binden, insbesondere an deren plus- oder minus-Enden. Die Mikrotubuli-minus-Enden sind am Centrosom verankert, dem größten Proteinkomplex einer eukaryotischen Zelle. Die fundamentale Rolle dieses Organells für die Zellteilung und den Aufbau des Spindel-Apparates erkannte Theodor Boveri bereits vor mehr als einem Jahrhundert, durch seine Beobachtungen in sich teilenden *Ascaris*-Eiern (Boveri, 1887). Das Centrosom organisiert in der Interphase das Mikrotubuli-Cytoskelett und, nach seiner Verdopplung, den Spindelfaserapparat. Bei amöboid beweglichen Zellen ist seine Positionierung relativ zum Zellkern für die Einhaltung der eingeschlagenen Wanderrichtung entscheidend (Ueda *et al.*, 1997). Neueren Arbeiten zufolge ist das Centrosom für den korrekten Ablauf der Cytokinese und das Durchlaufen des G1/S-Übergangs des nächsten Zellzyklus notwendig (Hinchcliffe *et al.*, 2001; Khodjakov und Rieder, 2001; Piel *et al.*, 2001). In sich teilenden Zellen

ist eine Kontrolle der Centrosomen-Anzahl essentiell für eine genaue Aufteilung der Erbinformation. Überzählige Centrosomen sind ein Kennzeichen von Tumorzellen, obwohl noch nicht geklärt werden konnte, ob dies eine Ursache oder eine Folge der Tumorentstehung ist (Lingle *et al.*, 2002; Nigg, 2002). Somit ist das Centrosom für alle Mikrotubuli-abhängigen Bewegungsvorgänge und für den exakten Ablauf des Zellzyklus von grundlegender Bedeutung. Obwohl die Aufgaben des Centrosoms universell sind, ist sein morphologischer Aufbau bei tierischen Zellen, Protisten und Pilzen unterschiedlich (Gräf *et al.*, 2000a).

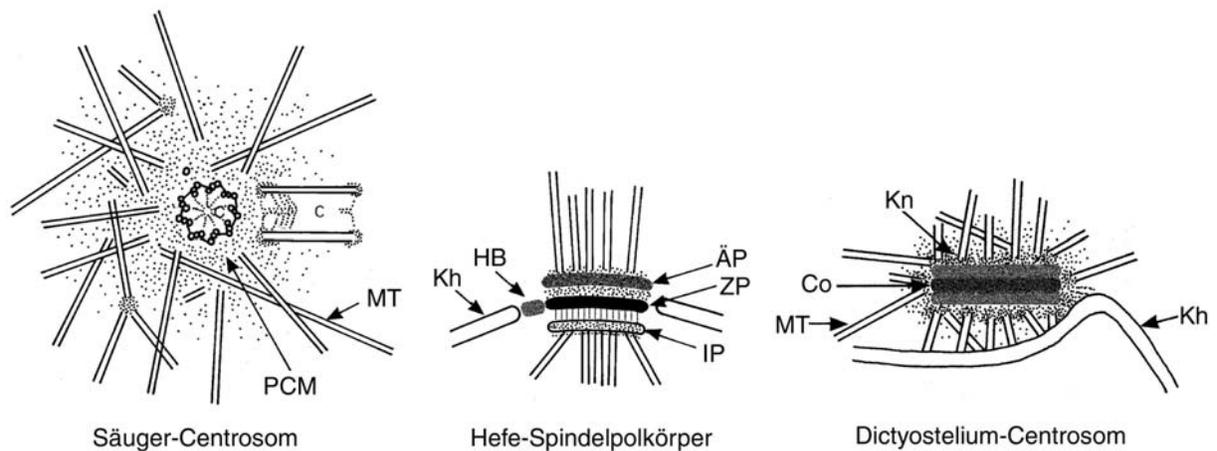


Abbildung 3: Centrosomentypen in verschiedenen Organismen. Abkürzungen: C, Centriol; PCM, pericentrioläre Matrix; MT, Mikrotubuli; Kh, Kernhülle; HB, "Half-Bridge"; ÄP, äußerer Plaque; ZP, zentraler Plaque; IP, innerer Plaque; Co, Corona; Kn, "Knötchen".
Abbildung modifiziert nach Dauderer *et al.* (1999).

Die Centrosomen tierischer Zellen enthalten ein Paar Centriolen, die von pericentriolärem Material mit Mikrotubuli-Nukleationskomplexen umgeben sind. Diesem Centrosomentyp stehen die acentriolären Centrosomen gegenüber, wie der in die Kernhülle eingebettete, dreilagige Spindelpolkkörper der Hefe oder das *Dictyostelium* Centrosom. Letzteres befindet sich auf der cytoplasmatischen Seite der Kernhülle und besteht aus einer dreilagigen Zentralstruktur, die von einer Corona umgeben ist (Abbildung 3). Eingebettet im unstrukturierten Material der Corona befinden sich elektronendichtere γ -Tubulin-haltige "Knötchen", von denen Mikrotubuli ausgehen (Euteneuer *et al.*, 1998). Trotz der auf den ersten Blick ähnlichen zentralen Lagenstrukturen bei

der Bäckerhefe und *Dictyostelium* unterscheiden sich die beiden Centrosomentypen grundlegend hinsichtlich des Zellzyklus-Zeitpunkts ihrer Duplikation, des Duplikationsvorgangs an sich und der vermuteten Proteinzusammensetzung (Gräf *et al.*, 2000a).

1.4 Centrosomenduplikation bei *Dictyostelium*

Bei *Dictyostelium* sind die ersten Anzeichen der Centrosomverdoppelung nicht, wie bei den meisten anderen Organismen, am G1/S-Übergang, sondern erst am G2/M-Übergang zu beobachten (Ueda *et al.*, 1999). Der Duplikationsprozeß (Abbildung 4) wird daher, anders als bei tierischen Zellen und Hefe, vermutlich nicht mit der DNA-Synthese synchronisiert. In der frühen Prophase vergrößert sich das Centrosom zunächst, danach dissoziiert die Corona und mit ihr die Mikrotubuli ab. Im folgenden Aufspaltungsprozess verschwindet die mittlere Lage der Zentralstruktur, die beiden äußeren Domänen weichen auseinander und bilden die beiden plaqueartigen mitotischen Centrosomen. Auf den einander zugewandten Oberflächen der beiden Plaques werden sofort Spindelmikrotubuli nukleiert, die eine zentrale Spindel ausbilden. Die beiden Centrosomen werden in dieser frühen Mitosephase durch die Elongation der zentralen Spindel separiert. Später werden dafür auch Interaktionen der wieder ausgewachsenen astralen Mikrotubuli mit dem Zellcortex benötigt. In der Telophase falten sich die mitotischen Centrosomen schließlich so zusammen, dass die ursprünglich zum Cytoplasma hin orientierte Außenfläche dem Inneren des neuen Interphase-Centrosoms zugewandt ist (Abbildung 4).

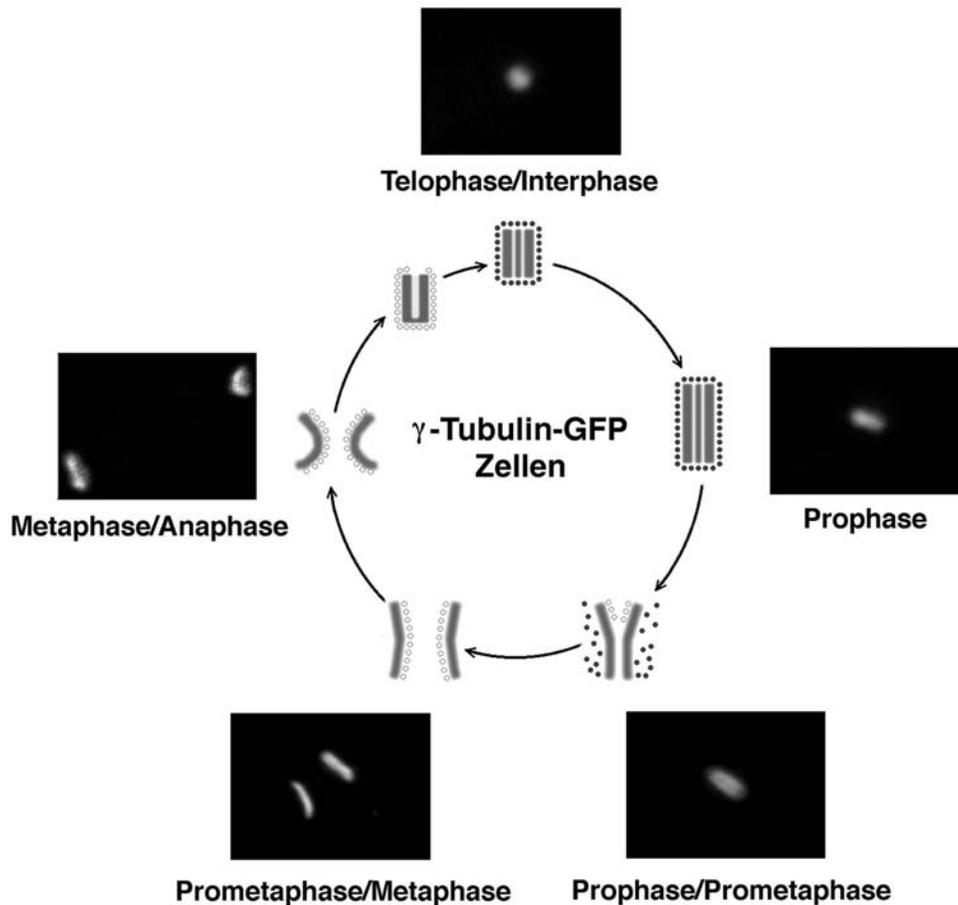


Abbildung 4: Der *Dictyostelium* Centrosomenzyklus. In der Abbildung sind konfokalmikroskopische Aufnahmen von γ -Tubulin-GFP-Zellen (Ueda *et al.*, 1997) dargestellt, die die morphologischen Veränderungen des *Dictyostelium* Centrosoms während der Mitose zeigen (Ueda *et al.*, 1999). Die Bilder sind durch schematische Zeichnungen ergänzt. Die mehrlagige Zentralstruktur des Interphase-Centrosoms (graue Balken) ist von einer amorphen Corona umgeben (schwarze Kreise). Zu Beginn der Prophase wird die Zentralstruktur vergrößert, am Übergang von Prophase zur Prometaphase dissoziiert die Corona, in der γ -Tubulin vorliegt, von der Zentralstruktur ab. Dies geschieht zeitgleich mit der Freisetzung der cytoplasmatischen Mikrotubuli. Die zwei äußeren Lagen der Zentralstruktur trennen sich, und γ -Tubulin reassoziert an der Innenseite der getrennten Lagen (offene Kreise) und bildet so neue Nukleationsstellen für die Spindelmikrotubuli. Die zwei Tochtercentrosomen beginnen sich während der Metaphase und Anaphase aufzufalten und schließlich in der Telophase eine neue innere Lage auszubilden, woraus zwei komplette Interphase-Centrosomen resultieren. Aus Dauderer *et al.* (1999).

1.5 Die Rolle von Mikrotubuli-plus-End bindenden Proteinen

Für die Regulation der Dynamik und die Organisation des Mikrotubuli-Cytoskeletts sind plus-End bindende Proteine essentiell. An den Mikrotubuli-plus-Enden findet Wachstum und Abbau

statt, und über diese werden die Mikrotubuli am Zellcortex und den Kinetochoren verankert. Aktuelle Arbeiten haben gezeigt, dass die Mikrotubuli-plus-Enden mit Proteinkomplexen assoziiert sind, die diese Funktionen vermitteln. Dieser supramolekulare Komplex besteht aus einer wachsenden Anzahl von Proteinen, die auch als “microtubule plus end tracking proteins” bekannt sind (Schuyler und Pellman, 2001). Diese umfassen CLIP-170 (Perez *et al.*, 1999), CLIP-115 (Hoogenraad *et al.*, 2000), CLIP-170-assoziierte Proteine (CLASPs) (Akhmanova *et al.*, 2001), LIS-1 (Coquelle *et al.*, 2002; Faulkner *et al.*, 2000), das Adenomatous-Polyposis-Coli-Protein (APC) (Mimori-Kiyosue *et al.*, 2000a), α/β -Catenin (Ligon *et al.*, 2001), EB1 (Mimori-Kiyosue *et al.*, 2000b), die XMAP215-Familie Mikrotubuli-assoziiierter Proteine (Lee *et al.*, 2001), die intermediäre Dyneinkette (Beach und Bloom, 2001; Vaughan *et al.*, 1999), p150^{glued} (Habermann *et al.*, 2001; Vaughan *et al.*, 1999) und die Dynaktin-Untereinheiten Arp1, p50 (Dynamitin) und p62 (Garces *et al.*, 1999; Valetti *et al.*, 1999; Vaughan *et al.*, 1999). Diese Proteine scheinen einen hoch dynamischen Mikrotubuli-plus-End-Komplex zu bilden, dessen Zusammensetzung vom Zellzyklus-Stadium, dem Zelltyp, der Mikrotubulidynamik und von der Interaktion mit dem Zellcortex abhängig ist. Die Größe dieses Komplexes übertrifft sehr wahrscheinlich die des Dynein/Dynaktin Komplexes (2 - 3 MDa), der eine wichtige Rolle bei Mikrotubuli-plus-End Interaktionen spielt (Karki und Holzbaur, 1999). Durch die Verankerung der Mikrotubuli am Zellcortex wird das radiale Mikrotubulisystem aufrechterhalten, das für die Centrosomenpositionierung essentiell ist (Euteneuer und Schliwa, 1992; Koonce *et al.*, 1999). Die Regulation und die Bindungsabfolge der “microtubule plus end tracking proteins” an den Mikrotubulienenden und am Cortex ist nicht bekannt. Die dynamischen Interaktionen zwischen den Mikrotubuli-plus-End-Komplex Proteinen und das Einfangen von Mikrotubuli an cortikalen Bindestellen werden zur Zeit eingehend studiert, da diesen Mechanismen eine Schlüsselrolle bei Zellmotilität, Positionierung der Organellen, Orientierung der Mitosespindel und Migration des Zellkerns zukommen.

Die cortikalen Interaktionen scheinen je nach Zelltyp und Funktion auf verschiedene Art zustände zu kommen. So kann die plus-End/Cortex-Interaktion von den Proteinen EB1 und APC abhängig sein (vgl. 1.6.1). Nach einem von Allan und Näthke (2001) vorgeschlagenen Modell sind an der cortikalen Verankerung via EB1 und APC auch Dynein/Dynaktin und der Dynein Regulator LIS1 beteiligt (Abbildung 5 A).

Mikrotubuli-plus-Enden können auch unabhängig von APC mit dem Cortex interagieren. Diese Interaktion wird von einem Komplex vermittelt, der aus dem minus-End gerichteten Motor Dynein mit seinem Aktivator Dynaktin und dem “wingless”-Signaltransduktions-Effektor β -Catenin besteht. Letzterer bindet an das Zelladhensionsmolekül E-Cadherin (Ligon *et al.*, 2001). Zudem bindet β -Catenin an α -Catenin und bildet somit eine Verbindung zwischen den Aktin- und Mikrotubuli-Cytoskelettsystemen (Abbildung 5 B).

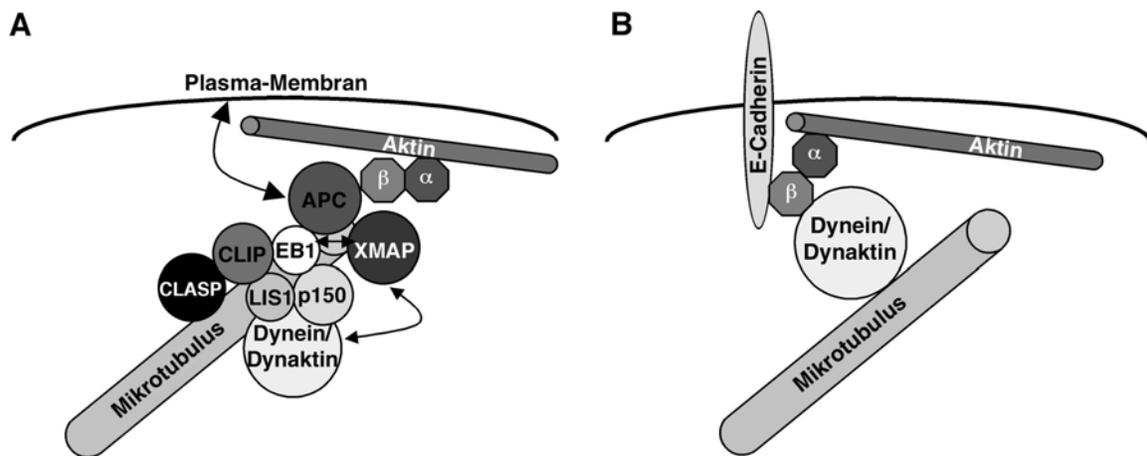


Abbildung 5: Schematischer Überblick der Mikrotubuli/Cortex-Interaktion und den Interaktionen von Mikrotubuli-plus-End Proteinen. (A) APC-abhängige Interaktionen. Die exakten Bindungen einiger Komponenten und die genaue Art und Weise der APC/Plasmamembran-Interaktion müssen noch untersucht werden. Dies wird durch die Doppelpfeile angezeigt. (B) APC-unabhängige Interaktionen. α / β -Catenin ist durch α bzw. β abgekürzt. Aus Hestermann *et al.* (2003)

1.6 Ziele dieser Arbeit

In unserem Labor wurde ursprünglich versucht, Komponenten des *Dictyostelium* Centrosoms zu identifizieren. Durch die Herstellung von Antikörpern gegen isolierte Centrosomen konnte zunächst DdCP224 als neues centrosomales Protein bei *Dictyostelium* identifiziert werden (Gräf *et al.*, 2000b).

DdCP224 gehört zur XMAP215-Proteinfamilie Mikrotubuli-assoziiierter Proteine, die nach ihrem *Xenopus*-Mitglied benannt ist. Im Gegensatz zu den meisten anderen Mikrotubuli-assoziierten

Proteinen sind diese in allen untersuchten Organismen, einschließlich der Pflanzen vertreten, was die Wichtigkeit ihrer Funktion unterstreicht (Ohkura *et al.*, 2001). In den meisten Spezies, mit der Ausnahme von Bäckerhefe und *Caenorhabditis elegans* sind XMAP215-Proteine längliche, monomere Moleküle von ca. 230 kDa (Cassimeris *et al.*, 2001). XMAP215-Proteine sind bei der Regulation der plus-End-Dynamik beteiligt. So fördern sie das Mikrotubuliwachstum, spielen eine Rolle bei der Mikrotubulinukleation (Popov *et al.*, 2002) und bei der Centrosomen-Duplikation (Gräf *et al.*, 2000b).

Ausgangspunkt für diese Arbeit war, mögliche Bindungspartner von DdCP224 zu identifizieren und deren Funktion zu charakterisieren. In einem Meeting-Abstrakt wurde eine Hefe “Two-Hybrid”-Interaktion von Stu2p, dem Hefehomologen von DdCP224, mit Bim1p, dem EB1-Homologen berichtet (Kosco *et al.*, 1999). So war es meine Aufgabe zunächst nach einem EB1-Homologen bei *Dictyostelium* zu suchen und eine mögliche Interaktion mit DdCP224 nachzuweisen. Mit DdLIS1 wurde im Folgenden ein weiterer Bestandteil des Mikrotubuli-plus-End-Komplexes untersucht. Zusätzlich wurde mit DdMoe1 ein möglicher EB1-Bindungspartner näher charakterisiert.

1.6.1 EB1-Proteine

Der Name des Proteins EB1 steht für „end binding“ und beschreibt somit einen Teil seiner Lokalisation. EB1 wurde sowohl an den Enden von wachsenden astralen Mikrotubuli (Mimori-Kiyosue *et al.*, 2000b) als auch am Centrosom und an den Kinetochoren gefunden (Pellman, 2001; Tirnauer und Bierer, 2000). Homologe des menschlichen EB1 (Su *et al.*, 1995) wurden in verschiedenen Organismen gefunden und charakterisiert; bei der Bäckerhefe Bim1p (Schwartz *et al.*, 1997), Spaltheife Mal3 (Beinhauer *et al.*, 1997), *Drosophila* DmEB1 (Lu *et al.*, 2001; Rogers *et al.*, 2002) und *Arabidopsis* AtEB1 (Chan *et al.*, 2003). Die EB1-Proteinfamilie ist damit neben den XMAP215-Proteinen die einzige Familie von Mikrotubuli-assoziierten-Proteinen (MAP), die in allen eukaryotischen Organismen gefunden wurde. Dies unterstreicht ihre herausragende Bedeutung für die Funktion des Mikrotubuli-Cytoskeletts. EB1 wurde ursprünglich als Bindungspartner des Tumor Suppressorproteins APC (Su *et al.*, 1995) identifiziert. Die EB1/APC-Interaktion ist in der Mehrzahl der humanen colorectalen Tumoren gestört. Neue Arbeiten weisen darauf hin, dass die EB1/APC-Interaktion die Verbindung zwischen den

wachsenden Mikrotubuli und den Kinetochoren herstellt (Fodde *et al.*, 2001). Der Verlust der EB1/APC-Interaktion könnte somit die chromosomale Instabilität verursachen, die für gewöhnlich mit dem Darmkrebs einhergeht (Fodde *et al.*, 2001). APC und EB1 haben anscheinend vergleichbare Funktionen an cortikalen Mikrotubuli-Bindungsstellen, wo beide Proteine essentiell für die Interaktion der Mikrotubulien mit *Zonulae adherentes* sind. Die cortikale Verankerung ist für die Orientierung der Spindel und die symmetrische Teilung von Epithelzellen notwendig (Lu *et al.*, 2001). Diese Funktion wird auch bei Bäckerhefe *bim1*- und Spaltheefe *mal3*-Nullmutanten deutlich, die zwar lebensfähig sind, aber Defekte in der Positionierung der Spindel und der Zellkerne aufweisen (Beinhauer *et al.*, 1997; Schwartz *et al.*, 1997; Tirnauer *et al.*, 1999). Weiterhin beeinflussen EB1-Proteine auch die Mikrotubulidynamik (Tirnauer und Bierer, 2000; Tirnauer *et al.*, 2002). So erhöht Bim1p die Mikrotubuli-Depolymerisationsrate, fördert aber die netto Polymerisation durch eine Erhöhung der Wachstumszeit und der "rescue" Häufigkeit, was schließlich in längeren, dynamischeren Mikrotubuli resultiert (Tirnauer *et al.*, 1999). Somit ist Bim1p ein Protein, das die dynamische Instabilität fördert, ähnlich wie *Xenopus* XMAP215 (Gard und Kirschner, 1987; Tournebize *et al.*, 2000; Vasquez *et al.*, 1994).

1.6.2 Moe1-Proteine

Moe1 ist ein mit EB1 interagierendes Protein. In einem Hefe „Two-Hybrid-Screen“, in dem Interaktionspartner von Moe1 gesucht wurden, wurde Mal3, das *Schizosaccharomces pombe*-Homologe von EB1, gefunden (Chen *et al.*, 2000).

Ursprünglich wurde Moe1 in einem Hefe „Two-Hybrid-Screen“ als direkter Interaktor des Guaninnukleotid-Austauschfaktors Scd1 gefunden. Scd1 ist Teil des Ras1-Cdc42-G-Protein Signalübertragungswegs. Ras-Proteine spielen zusammen mit Rho-ähnlichen GTPasen, wie *S. pombe* Cdc42, eine wichtige regulative Rolle bei der Organisation des Cytoskeletts (Lowy und Willumsen, 1993). In *S. pombe* reguliert die kleine GTPase Ras1 Cdc42 durch die Interaktion mit seinem Guaninnukleotid-Austauschfaktor Scd1. Diese Signalkaskade ist für die Bildung der Mitosespindel in *S. pombe* essentiell, was durch eine gestörte Spindelbildung in *scd1*- und *ras1*-Nullmutanten zum Ausdruck kommt. Die *moe1*-Nullmutante (*moe1Δ*) weist abnormal lange Mikrotubulibündel auf, die unempfindlich gegen Mikrotubuli-destabilisierende Agenzien sind

(Chen *et al.*, 1999). Der Name Moe1 resultiert aus diesem Phänotyp (microtubules overextended). Wie die *scd1*- und *ras1*- Nullmutanten weisen *moe1Δ* Spindeln auf. Die jeweiligen Doppelmutanten mit *moe1Δ* sind synthetisch letal (Chen *et al.*, 1999). Diese Daten weisen darauf hin, dass Moe1 eine Komponente in der Ras1-Signalkaskade zur Spindelbildung ist. GFP-Moe1 lokalisiert vorwiegend im Cytosol und findet sich konzentriert in der Zellkernperipherie. Eine Lokalisation an den Mikrotubuli wurde nicht gezeigt.

Die Rolle des EB1-Homologen Mal3 in dieser Signalkaskade ist noch nicht vollständig geklärt. Die in einem Hefe „Two-Hybrid-Screen“ gefundene Interaktion zwischen Moe1 und Mal3 wurde mit den bakteriell exprimierten Proteinen bestätigt. Ein Nachweis dieser Interaktion *in vivo* gelang jedoch nicht (Chen *et al.*, 2000). Während die jeweiligen Nullmutanten lebensfähig sind, führt die *moe1mal3* Doppelmutation zum Zelltod bei verringerten Temperaturen. Unter diesen Bedingungen weisen die Zellen starke Spindeldefekte, monopolare Spindeln und fehlerhafte Chromosomensegregation auf. Nur einer der beiden Spindelpolkörper enthält γ -Tubulin. Die Interphase-Mikrotubuli der *moe1mal3*-Zellen sind bei verringerten Temperaturen verkürzt und vermehrt gebündelt. Somit scheinen Moe1 und Mal3 zusammen die Mikrotubulidynamik und Integrität zu beeinflussen und für die richtige Verteilung von γ -Tubulin auf die Spindelpolkörper verantwortlich zu sein (Chen *et al.*, 2000).

1.6.3 LIS1-Proteine

Das LIS1-Protein ist ebenfalls ein Bestandteil des Mikrotubuli-plus-End-Komplexes, der die Mikrotubulidynamik und Verankerung kontrolliert (Schroer, 2001). Das LIS1-Gen wurde ursprünglich als eine Ursache für die Miller-Dieker-Lissenzephalie identifiziert. Das Gen kodiert für eine nicht-katalytische Untereinheit der „platelet-activating factor“ Acetylhydrolase (Hattori *et al.*, 1994; Lo Nigro *et al.*, 1997; Reiner *et al.*, 1993). Lissenzephalie ist eine schwere Entwicklungsstörung des Neocortex. Der Name leitet sich aus dem griechischen ab und steht für „glatte“ Hirnoberfläche (gr. *lissos* = glatt). Das Gehirn betroffener Personen zeichnet sich durch das Fehlen der charakteristischen Oberflächenstrukturen, Sulci und Gyri, eines normal entwickelten Gehirns aus. Im Gehirnschnitt kann nicht zwischen grauer und weißer Substanz differenziert werden. Dieser Phänotyp beruht auf Störungen bei der neuronalen Differenzierung

und Zellmigration in der ersten Schwangerschaftshälfte. Lissenzephalie-Patienten sind in ihrer geistigen Entwicklung stark retardiert, leiden an Epilepsie und sterben in der Regel in der frühen Kindheit. Die häufigste Form der Lissenzephalie, die Typ 1-Lissenzephalie wird durch sporadische Mutationen im menschlichen LIS1-Gen hervorgerufen und tritt mit einer Häufigkeit von 1:30000 auf (Pilz *et al.*, 1998).

LIS1 ist ein 45 kDa Protein mit einer N-terminalen Domäne, die eine für die Dimerisierung benötigte "coiled-coil"-Region beinhaltet und einer C-terminalen Domäne, die sieben WD40-Motive (Tryptophan-, Asparaginsäure) enthält, die wahrscheinlich wie bei heterotrimeren G-Proteinen eine β -Propellerfaltblattstruktur ausbilden (Ahn und Morris, 2001; Garcia-Higuera *et al.*, 1996). Diese konservierte Struktur kennzeichnet eine Familie von Proteinen, die sich durch ihre multiplen Protein-Protein-Interaktionen auszeichnet. LIS1 wurde in den verschiedensten Organismen wie Hefe, *Aspergillus*, *C. elegans*, *Drosophila* und Säugern gefunden. Mutationen von LIS1 oder seiner Homologen führen häufig zu Defekten in der Spindelorientierung oder der Migration des Zellkerns. Dies erinnert an Phänotypen, die durch Mutationen in Dynein oder Dynaktin Genen verursacht wurden. So ist die normale Lokalisation von cortikalem Dynein in *Drosophila* LIS1-Mutanten (Swan *et al.*, 1999) und in LIS1 überexprimierenden Säugerzellen (Faulkner *et al.*, 2000) verändert. Somit wurde LIS1 als Regulator des cytoplasmatischen Dyneins identifiziert. Außerdem interagiert LIS1 direkt mit CLIP170 (Coquelle *et al.*, 2002), der Dynaktin-Untereinheit p50 (Dynamitin) und den cytoplasmatischen schweren und intermediären Dyneinketten (Tai *et al.*, 2002). LIS1-Überexpression führt zu einem Verschwinden von p150^{glued} von den Mikrotubulienden und verhindert die Lokalisation von Dynein und Dynaktin am Zellcortex. Dies beeinträchtigt die Interaktion der Mikrotubuli-plus-Enden mit cortikalen Bindungsstellen, was wiederum auf eine Rolle von Dynein/Dynaktin und LIS1 in diesem Prozess hinweist (Faulkner *et al.*, 2000). Auch ein sehr ähnlicher Vorgang, die Interaktion von Mikrotubuli-plus-Enden mit den Kinetochoren, wird von LIS1 vermittelt (Faulkner *et al.*, 2000; Tai *et al.*, 2002).

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Reagenzien

Soweit nicht anders erwähnt, stammten die verwendeten Laborchemikalien von Sigma-Aldrich (Deisenhofen), Merck (Darmstadt), Carl Roth (Karlsruhe), Difco (Augsburg), Serva (Heidelberg) und Boehringer Mannheim (Mannheim) und hatten den Reinheitsgrad "p. a."

2.1.2 Antikörper

Anti-Aktin,	mAb Act1	(Simpson <i>et al.</i> , 1984)
Anti-Aktin,	mAb 224-236-1	(Westphal <i>et al.</i> , 1997)
Anti-c-myc,	mAb 9E10	(Evan <i>et al.</i> , 1985)
Anti-Comitin,	mAb	(Weiner <i>et al.</i> , 1993)
Anti-DdEB1,	Kaninchen Antiserum	diese Arbeit
Anti-DdLIS1,	Kaninchen Antiserum	diese Arbeit
Anti-DdMoe1,	Kaninchen Antiserum	diese Arbeit
Anti-DdCP224,	DdCP224HIND Kaninchen Antiserum	(Dr. Ralph Gräf)
Anti-DdCP224,	mAb 4-148	(Gräf <i>et al.</i> , 1999)
Anti-DHC,	y7 Kaninchen Antiserum	(Koonce und Samso, 1996);
Anti-DIC,	IC144 Ratten Antiserum	(Ma <i>et al.</i> , 1999)
Anti- γ -tubulin,	Kaninchen Antiserum	(Euteneuer <i>et al.</i> , 1998)
Anti-GFP,	Kaninchen Antiserum	(Faix <i>et al.</i> , 2001)
Anti-GFP,	mAb 264-449-2	(Weber <i>et al.</i> , 1999)
Anti-GFP,	mAb 264-236-1	(Chemicon, Hofheim, Deutschland)
Anti-MBP,	Kaninchen Antiserum	(Gräf, 2001a)
Anti-Tubulin,	YL1/2	(Chemicon, Hofheim, Deutschland)
Anti-Digoxigenin		Boehringer Mannheim
Ziege-anti-Kaninchen IgG Antikörper, gekoppelt an alkalische Phosphatase		Sigma
Ziege-anti-Maus IgG Antikörper,		

gekoppelt an alkalische Phosphatase	Sigma
Ziege-anti-Kaninchen IgG Antikörper, gekoppelt an Cy3 oder FITC	Dianova
Ziege-anti-Maus IgG Antikörper, gekoppelt an Cy3 oder FITC	Dianova
Ziege-anti-Kaninchen Alexa 488 oder 568	Molecular probes, Inc.
Ziege-anti-Maus Alexa 488 oder 568	Molecular probes, Inc.
Ziege-anti-Ratte Alexa 488 oder 568	Molecular probes, Inc.

2.1.3 Enzyme

Alle Restriktionsenzyme und Puffer wurden von New England Biolabs bezogen.

Andere Enzyme werden zusammen mit der jeweiligen Methode aufgeführt.

2.1.4 Inhibitoren

Benzamidin	Sigma
Diethylpyrocarbonat (DEP)	Sigma
Phenylmethylsulfonylfluorid	Sigma

2.1.5 Antibiotika

Blastizidin S	ICN Biochemicals
Geneticin (G418)	Sigma
Penicillin/Streptomycin	Sigma
Ampicillin	Roth
Kanamycin	Sigma

2.1.6 Medien

2.1.6.1 Medien für die *D. discoideum* Kultur

AX Medium (Claviez *et al.*, 1982)

14.3 g/l Pepton (Oxoid), 7.15 g/l Hefeextrakt (Oxoid), 50 mM Maltose, 3.5 mM Na₂HPO₄, 3.5 mM KH₂PO₄, pH 6.7.

HL-5c Medium

5 g/l Hefeextrakt (Difco), 2.5 g/l Bacto Trypton (Difco), 2.5 g/l Casein Pepton (Merck), 5 g/l Proteose Pepton (Oxoid) 10 g/l Glukose, 1.2 g/l KH_2PO_4 , 0.35 g/l Na_2HPO_4 , pH 6.5.

Phosphat Agarplatten

15 g/l Bacto Agar in Soerensen Puffer.

SM Agarplatten

10 g/l Pepton (Oxoid), 1 g/l Hefeextrakt (Oxoid), 10 g/l Glukose, 9 g/l Bacto Agar, 16 mM KH_2PO_4 , 5.7 mM KH_2PO_4 , 4 mM MgSO_4 , pH 6.5.

Soerensen Puffer (Malchow *et al.*, 1972)

14.6 mM KH_2PO_4 , 2 mM Na_2HPO_4 , pH 6.0.

2.1.6.2 Medien für die *E. coli* Kultur (Sambrook *et al.*, 1989)

LB Agarplatten

1,5 % Agar in LB Medium.

LB/Ampicillin

LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin.

LB Medium

10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 5 g/l NaCl, pH 7.4.

NZYM Agarplatten

10 g/l Casein (hydrolysiert), 5 g/l NaCl, 5 g/l Hefeextrakt, 2 g/l MgSO_4 , 15 g/l Agar.

SM Puffer

100 mM NaCl, 8 mM MgSO_4 , 50 mM Tris/HCl pH 7.5, 0.01 % Gelatine.

SOB Medium

20 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 10 mM NaCl, 2.55 mM KCl.

SOB-MM Medium

SOB Medium supplementiert mit 20 mM Glukose, 10 mM MgSO₄, 10 mM MgCl₂.

Top Agar

10 g/l Casein (hydrolysiert), 5 g/l NaCl, 5 g/l Hefeextrakt, 2 g/l MgSO₄, 7 g/l Agarose.

2.1.7 Puffer und Lösungen

Hier nicht aufgeführte Puffer und Lösungen finden sich unter den jeweiligen Methoden.

PHEM-Puffer (Schliwa *et al.*, 1982)

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

TE-Puffer

10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0.

20x SSC

3 M NaCl, 0.3 M Na-Citrat.

10x TAE

400 mM Tris, 10 % Eisessig, 10 mM EDTA, pH 8.3.

PBS

70 mM Na₂HPO₄, 30 mM KH₂PO₄, 150 mM NaCl, pH 7.0.

TBS

10 mM Tris/HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl.

Harnstoff Probenpuffer

9 M Harnstoff, 10 % SDS, 5 % 2-Mercaptoethanol.

5x Laemmli Probenpuffer

625 mM Tris/HCl, pH 6.8, 25 % Saccharose, 10 % SDS, 0.025 % Bromphenolblau, 10 %, 2-Mercaptoethanol.

SDS Laufpuffer

25 mM Tris/HCl, pH 8.3, 0.1 % SDS (w/v), 192 mM Glycin.

2.1.8 Vektoren

pA6PsgGFPXN	(Dr. Ralph Gräf)
p1ABsr8	(Gräf <i>et al.</i> , 2000b)
pDiscGFPSSEB2	(Daunderer und Gräf, 2002)
pSPORT1	(Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland)
pMALc2	New England Biolabs
pUCBsrΔBam	(Adachi <i>et al.</i> , 1994)
GFP _{xamcs1}	(Dr. Jan Faix; Derivat von pDGFP-MCN-Neo (Dumontier <i>et al.</i> , 2000)

2.1.9 Bakterien und *D. discoideum* Stämme

E. coli XL-1 blue (Stratagene) wurde für Klonierungen und zum “Screening” von cDNA-Bibliotheken verwendet.

E. coli LE392 (NEB) wurde zum “Screening” von cDNA-Bibliotheken verwendet.

Klebsiella aerogenes (Williams und Newell, 1976) wurde für die Kultivierung von *D. discoideum* benutzt.

SOLR (Stratagene) wurde für die *in vivo* Excision benutzt.

D. discoideum Stamm AX2-214 (axenisch wachsendes Derivat des Isolats NC-1 (Raper, 1935)).

2.1.10 Computer Programme

Winword 6.0 und 8.0 (Microsoft), Adobe Photoshop 5.5, Apple Works 5.0, MacDraw Pro 1.5, Endnote 5.0, Image J 1.29e, NIH-Image 1.6.2, Phylip Phylogeny package version 3.5 (Felsenstein, 1993), (alle Macintosh), Zeiss LSM 510Meta Software 3.2, Leica TCS-NT

Confocal Imaging System, Hoigens Essential 2.4.1, Imaris 3.3, Unix GCG-package (University of Wisconsin Genetics Computer Group).

2.1.11 Andere Materialien

NHS-Sepharose 4B	Pharmacia
Hybond N Nylon Membran	Amersham Pharmacia Biotech
Nitrocellulose BA85	Schleicher & Schüll
Dialyse Membran	Biomol

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Agarose-Gelelektrophorese (Sambrook *et al.*, 1989)

Die elektrophoretische Auftrennung von DNA erfolgte in Agarosegelen mit einem Agarosegehalt von 1 % (w/v) in TAE Puffer. Laufpuffer und Gelpuffer waren identisch. Die zu trennende DNA wurde vor dem Beladen des Gels mit 1/5 Volumen 6x TAE Probenpuffer (10 mM Tris/HCl, pH 8.0, 50 mM Na-EDTA, pH 8.0, 1 % SDS, 30 % Glycerin, 0.1 % Bromphenolblau) vermischt. Die Trennung erfolgte bei 5 V/cm. Nach dem Lauf wurden die Gele mit 1 µg/ml Ethidiumbromid in TAE 20 min gefärbt. Die Banden wurden durch UV-Licht sichtbar gemacht und mit dem Eagle Eye II System (Stratagene, Heidelberg) dokumentiert.

2.2.2 DNA Extraktion aus Agarosegelen

Die Banden wurden ausgeschnitten, in sterile Eppendorf-Reaktionsgefäße transferiert, gewogen und mit Hilfe von Qia Quick Säulchen (Qiagen), nach Herstellerangabe gereinigt.

2.2.3 Bestimmung der DNA-Konzentration

Die Konzentration von DNA in Lösungen wurde durch Messung der Absorption bei 260 nm der verdünnten Probe bestimmt. Zuvor wurde das Photometer gegen eine Pufferkontrolle kalibriert. Einer A_{260} von 1.0 entsprechen 50 µg/ml DNA (Sambrook *et al.*, 1989). Die DNA-Konzentration von in Ethidiumbromid gefärbten Agarosegelen wurde durch den Vergleich der Bandenintensitäten mit einem Molekulargewichts-Marker abgeschätzt.

2.2.4 Präparation von Plasmid-DNA

Aus 3-5 ml Übernachtskulturen wurde die Plasmid-DNA, mit Hilfe des "Qia Spin Prep Kit" präpariert. Das Qiagen Plasmid Midi Kit (beide Qiagen, Hilden, Deutschland) wurde für die Plasmidpräparation aus Kulturen bis zu 100 ml verwendet.

2.2.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Zur analytischen Vervielfältigung von DNA-Fragmenten durch die Polymerase-Kettenreaktion wurde Taq-Polymerase (verschiedener Hersteller) benutzt. 25 µl Reaktionen enthielten 0.8 mM dNTP (0.2 mM jedes Nukleotids), 25 pmol 5'- und 3'-Primer, 1 U Taq-Polymerase und 2.5 µl 10x PCR Puffer (100 mM Tris/HCl, pH 8.3), 500 mM KCl, 15 mM MgCl₂, 0.1 % (w/v) Gelatine). Als "Template" wurden Bakterienzellen, λ-Phagen, cDNA, genomische oder Plasmid-DNA benutzt. Vor den Amplifizierungsschritten wurde der Reaktionsansatz bei 94°C für 2 min denaturiert (bzw. 5 min. für Bakterien oder λ-Phagen als "Template"). Generell wurden 30 Vervielfältigungs-Zyklen (Denaturierung bei 94°C für 30 s, Hybridisierung bei 50-55°C für 45 s, Elongation bei 72°C für 30-120 s) durchgeführt. Die Hybridisierungstemperatur eines bestimmten Oligonukleotids wurde anhand der Basenzusammensetzung folgendermaßen abgeschätzt: $4 \times (\text{Anzahl der G/C-Nukleotide}) + 2 \times (\text{Anzahl der A/T-Nukleotide}) - 3$.

Die Elongationszeit betrug 1 min pro 1000 bp. Für präparative PCRs wurde das Expand-high-fidelity PCR System (Boehringer Mannheim) unter Befolgung der Herstellerangaben benutzt.

2.2.6 Reverse-Transkriptions-PCR (RT-PCR)

Diese Methode wurde zur Vervielfältigung von cDNA-Fragmenten mit bekannten flankierenden Sequenzen (Genomische DNA) verwendet. 1 µg polyadenylierte RNA wurde mit 1 µg eines spezifischen reversen Primers in einem Gesamtvolumen von 16 µl gemischt, bei 70°C für 5 min denaturiert und langsam auf 42°C abgekühlt, um eine spezifische Hybridisierung zu ermöglichen. Die Reverse-Transkription wurde durch Zusatz von 5 µl 5x M-MLV Puffer (Promega), 2 µl dNTP-Mix (5 mM jedes Nukleotids), 1 µl RNasin Inhibitor (Boehringer Mannheim) und 1 µl M-MLV Reverse-Transkriptase (Promega) gestartet und bei 42°C für 1h durchgeführt. 2.5 µl der Reversen-Transkriptions-Reaktion wurden als "Template" für die folgende Vervielfältigung durch PCR mit einem spezifischen Oligonukleotidpaar eingesetzt.

2.2.7 Oligonukleotide

EB1-Kpn	GGG <u>GTA CCG</u> ATT GAA CAA TTA GGT AGT GG
EB1-5-Bam	CGC <u>GGA TCC</u> ATG GAG GGA TTT GGA AGA AAT G
EB1-6-Hind*	TT CCC <u>AAG CTT</u> TTA ATA TTC ATC TTG AAG TAA ACT ATC
EB1-7-Sal	ATT AAA <u>GTC GAC</u> TAA TGG AGG GAT TTG GAA GAA ATG
EB1-8-Bam*	CGC <u>GGA TCC</u> TTA ATA TTC ATC TTG AAG TAA ACT ATC
EB1-8-Nsi*	CCA <u>ATG CAT</u> TTA ATA TTC ATC TTG AAG TAA ACT ATC
EB1-16-Hind	CGG CCC <u>AAG CTT</u> TTG TGT TAA TGT TGG TTT TCC
EB1-17-Xba	GCT <u>CTA GAA</u> CTA AAA CAG TGA TTG TAT CAG
EB1-Nsi-del1	CCA <u>ATG CAT</u> TTA TTC TGA TAC AAT CAC TGT TTT AG
EB1-Nsi-del2	CCA <u>ATG CAT</u> TTA ACA AAA GAT TTC AGC TTC TCT TAA AC
EB1-Nsi-del3	CCA <u>ATG CAT</u> TTA GTT ATC TTG ATC TGG TGG
EB1-Nsi-del4	CCA <u>ATG CAT</u> TTA ATT TTG AAG TAC AGA ATT CAT AAT TTC
EB1-Sal-del2N	ATT AAA <u>GTC GAC</u> AAA TGA GAT CAT CAT TAA AAG GTA AGA C
Ndel3-EB1-Bam	CGC <u>GGA TCC</u> ATG CCA GTA TCA AAA CCA ACT ACA AC
Bam-Moe1	CGC <u>GGA TCC</u> ATG TCA TTA GAG TTG AAT ACA ATT AAA GTC
Sal-Moe1	ATT AAA <u>GTC GAC</u> CCA TGT CAT TAG AGT TGA ATA C
Moe1-Eco2*	CGG <u>AAT TCT</u> TAT TCT CTT GAT TCT TCA ACC C
Moe1-Hind6*	TT CCC <u>AAG CTT</u> TTA TTC TCT TGA TTC TTC AAC CCA ACC
Lis1-4	GTG TTT CTC TGG TGG CCT TGG
Lis1-6	GAT GGT TGC ATC CTC TGA TGC
Lis1-1-Eco	CCG <u>GAA TTC</u> GAA TCA ATT TTA GAT TAT TTT GAA TCA
Lis1-Sal	ATT A <u>AAG TCG ACT</u> GAA TCA ATT TTA GAT TAT TTT GAA TCA
Lis1-2-Bam*	CGC <u>GGA TCC</u> TTA TTG TAA TTT CCA AAC TTT TAT TAC
Lis-1-2Xba	GGC <u>TCT AGA</u> TTA TTG TAA TTT CCA AAC TTT TAT TAC
Eco-Lis1-8	CG <u>GAA TTC</u> ATG GTA TTA ACT TCA AAA CAA AAG G
Eco-Lis1-95	CG <u>GAA TTC</u> ATG AGG CCA CCA GAG AAA CAC AT
Lis1-96-Bam*	CGC <u>GGA TCC</u> TTA TGG TAA TGC ATC CTC TTT ACC TC
T3+4	GAA ATT AAC CCT CAC TAA AGG
Mbp-Kpn	CGG <u>GGT ACC</u> AAA ATC GAA GAA GGT AAA CTG G (Gräf, 2001a)
TubA-Sal1	TAC GCG <u>TCG ACT</u> AAT GGG TCG TGA AAT TAT TTC

TubA-2-Bam CGG GAT CCT TAA TAT TCT TCT TCT TGT TC
DIC1-Nhe AAC TAG CTA GCA TGG ATA GAG ATC AAA AGA AAA AAG
DIC4-myc-Bam CCG GGA TCC TTA ATT TAA ATC TTC TTC TGA TAA TAA TTT TTG
TTC TCT ATG TTT AGT CCA TCT TTC

2.2.8 DNA-Spaltung mit Restriktionsenzymen

Die Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen erfolgte jeweils in dem vom Hersteller empfohlenen Puffersystem und unter den angegebenen Temperaturbedingungen. In der Regel wurden pro μg DNA 2-10 Enzymeinheiten (U) eingesetzt. Plasmid-DNA und PCR-Fragmente wurden zwischen 1 und 12 h gespalten. Die Vollständigkeit der Reaktion wurde auf einem Agarosegel überprüft.

2.2.9 Phosphatase Behandlung (Sambrook *et al.*, 1989)

Um eine Religation von linearisierten Vektoren mit kompatiblen Enden zu verhindern, wurden die 5'-Phosphat-Gruppen durch Behandlung mit alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm entfernt. 2.5 μg des linearisierten Vektors wurden in einem Reaktionsansatz von 25 μl in 1x Phosphatase Puffer (50 mM Tris/HCl, pH 9.0, 1 mM MgCl_2 , 0.1 mM ZnCl_2 , 1 mM Spermidin) oder NEB Puffer 2-4, mit 1 U alkalischer Phosphatase für 30 min bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Phenol/Chloroform-Extraktion beendet, die DNA anschließend über ein Agarosegel gereinigt.

2.2.10 Überführung überstehender Enden in glatte Enden (Sambrook *et al.*, 1989)

Sowohl 3' als auch 5' überstehende Enden können mit T4 DNA-Polymerase in der Gegenwart von Nukleotiden in glatte Enden überführt werden. 1 μg DNA wurde in einem 20 μl Reaktionsansatz in 1x T4 DNA-Polymerase Puffer (33 mM Tris-Acetat, 66 mM K-Acetat, 10 mM Mg-Acetat, 0.5 mM DTT, 0.1 mg/ml BSA) mit dNTPs (0.5 mM jedes Nukleotids) und 1 U T4 DNA Polymerase bei 15°C für 20 min inkubiert. Die Reaktion wurde durch Phenol/Chloroform-Extraktion gestoppt, die DNA mit Hilfe eines Superdex 200 HR Zentrifugationssäulchens, bzw. über ein Agarosegel gereinigt.

2.2.11 DNA-Ligase Reaktion

DNA-Fragmente wurden mit T4 DNA-Ligase in einem Gesamtvolumen von 10 μ l bei 16°C für 16 h in dem vom Hersteller gelieferten Puffer verknüpft. Für die Ligation überstehender Enden betrug das molare Verhältnis von Vektor zu Fragment etwa 1:2, für glatte Enden etwa 1:3. Die Konzentrationen der eingesetzten DNA wurde auf einem analytischen Agarosegel abgeschätzt.

2.2.12 Herstellung elektrokompetenter *E. coli* Zellen

1 l LB Medium wurde mit 5 ml Übernachtskultur des gewünschten *E. coli* Stammes (meist XL1-blue) angeimpft, und bei 37° mit 240 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von 0.5 geschüttelt. Die Zellen wurden auf Eis abgekühlt, in sterile Röhren überführt, abzentrifugiert (3000 rpm, JA 14.1 Rotor, 10 min, 4°C) und in sterilem eiskaltem Wasser resuspendiert. Nach drei Waschschritten mit kaltem Wasser (in sterilen Falconröhren) wurden die Zellen mit 10 % Glycerin gewaschen und schließlich in 2 ml 10 % Glycerin aufgenommen. Nach Aliquotierung (50 μ l) in sterile Eppendorfröhren wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff schock gefroren und bei -70°C gelagert.

2.2.13 Elektrotransformation von *E. coli* Zellen

Elektrokompetente Zellen wurden auf Eis aufgetaut, mit 1-5 μ l DNA vermischt und in eine vor gekühlte sterile Elektroporationsküvette transferiert (Abstand zwischen den Elektroden: 2 mm). Nach Elektroporation bei 2.5 kV, 25 mF und 200 Ω in einem Elektroporationsgerät (Gene Pulser, Biorad) wurde der Transformationsansatz in 1 ml SOB-MM Medium aufgenommen, die Zellen 30 min bei 37°C regeneriert und auf LB Agarplatten, mit dem jeweiligen Selektionsantibiotikum plattiert.

2.2.14 Identifikation transformierter Klone in *E. coli*

Plasmid DNA wurde aus 2 ml Übernachtskulturen präpariert und mit den jeweiligen Restriktionsenzymen verdaut. Die Identifizierung der erwünschten Transformanden erfolgte durch Analyse des Restriktionsverdaus auf einem Agarosegel.

2.2.15 Präparation chromosomaler DNA aus *D. discoideum*

1-2 x 10⁸ Zellen einer axenisch wachsenden Kultur wurde zweimal mit kaltem H₂O gewaschen, das Zellpellet wurde in 50 ml Lysepuffer (10 mM Mg-Acetat, 10 mM NaCl, 30 mM HEPES, pH 7.5, 10% Saccharose, 2% Nonidet P40) resuspendiert. Die Zellen wurden durch diese Behandlung lysiert. Die Zellkerne wurden bei 6000 g (JA20, 7500 rpm, 10 min, 4°C) sedimentiert, in SDS-Lysepuffer (TE Puffer mit 0.7% SDS) resuspendiert und mit 100 µl Proteinase K Lösung (14,7 mg/ml) supplementiert. Nach 2-3 h Inkubation bei 60°C wurde das Lysat vorsichtig mit Phenol/Chloroform (Sambrook *et al.*, 1989) extrahiert, bis die obere Phase klar erschien (2-4 Wiederholungen). Die DNA wurde durch Zugabe von 1/10 Volumen 2 M Na-Acetat (pH 5,2) und 2 Volumen Ethanol präzipitiert. Die weißen DNA-Fäden wurden mit einer Pipettenspitze aufgewickelt. Die DNA wurde in 70% Ethanol gewaschen, an der Luft getrocknet und in 200-500 µl TE Puffer gelöst.

2.2.16 Transformation und Klonierung von *D. discoideum*

Elektroporation

Dictyostelium Zellen wurden bis zu einer Dichte von 2-3 x 10⁶ Zellen/ml kultiviert, geerntet und einmal in kaltem Soerensen Puffer und zweimal in kaltem Elektroporationspuffer (50 mM Saccharose, 10 mM KH₂PO₄, pH 6.1) gewaschen. Die Zellen wurden zu einer Endkonzentration von 1 x 10⁸ Zellen/ml in kaltem Elektroporationspuffer resuspendiert, mit 15-30 µg Plasmid DNA vermischt und in eine vorgekühlte sterile Elektroporationsküvette transferiert (Abstand zwischen den Elektroden: 4 mm). In der Elektroporationsapparatur (Gene Pulser, Biorad) wurden die Zellen, bei einer Kondensatorkapazität von 3 µF, einer Spannung von 1,0 kV ausgesetzt. Danach wurden die Zellen in eine sterile Zellkulturflasche überführt und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe einer MgCl₂/CaCl₂ Lösung (Endkonzentration je 1 mM) wurden die Zellen für weitere 15 min bei Raumtemperatur geschwenkt. Zuletzt wurden die Zellen in 25 ml HL-5c Medium aufgenommen und auf eine 24-Loch-Zellkulturplatte verteilt. Nach einer Erholungsperiode von 24 h wurde durch Zugabe des entsprechenden Antibiotikums Selektionsdruck ausgeübt (4 µg/ml Blastizidin S (ICN) bzw. 10 µg/ml G418 (Sigma)). Die Zellen wurden für 8-14 Tage bei 21°C inkubiert bis Kolonien resistenter Zellen auftraten. Um eine Doppelmutante zu generieren, wurde zuerst ein Stamm hergestellt, der das Konstrukt mit der Blastizidinresistenz trug. In diesen Stamm wurde dann das G418 Konstrukt transformiert.

Klonierung der Transformanden

Die Transformanden wurden mit einer sterilen Pipette resuspendiert und ein Tropfen der Zellsuspension auf einen Objektträger gegeben. Die Zellen wurden durch Immunfluoreszenzmikroskopie auf die Expression des transformierten Markers (siehe Abschnitt 2.4.4) hin untersucht. Falls die gewünschten Zellen gefunden worden waren, wurden verschiedene Konzentrationen der verbliebenen Zellen zusammen mit einer dichten Suspension *Klebsiella aerogenes* Zellen auf SM Agarplatten ausgebracht. Nach zwei bis drei tägiger Inkubation bei 21°C erschienen Fraßhöfe. Mit einem sterilen Zahnstocher wurden einzelne Kolonien in 24-Lochplatten mit HL-5c Medium mit Blastizidin S (4 µg/ml) bzw. G418 (10 µg/ml) und einer Penicillin/Streptomycin Lösung (Sigma) überführt.

2.2.17 Isolierung polyadenylierter RNA aus *D. discoideum*

Polyadenylierte RNA (mRNA) wurde mit dem “QuickPrep mRNA Micro Kit” (Amersham-Pharmacia) nach Herstellerangaben präpariert. Die Ausbeute betrug 7-8 µg mRNA pro 1×10^7 Zellen. Die mRNA wurde in 2-4 Aliquots mit 1/10 Volumen 2 M K-Acetat und 2 Volumen Ethanol und Glykogen präzipitiert und bei -70°C gelagert. Die präzipitierte mRNA wurde durch 15 minütige Zentrifugation bei 14000 rpm (Beckman CS-15R Zentrifuge, F2402 Rotor) pelletiert, mit 70 % Ethanol in DEPC-behandelten Wasser gewaschen, Luft getrocknet und in DEPC-behandelten Wasser gelöst.

2.2.18 Digoxigenin-Markierung von DNA-Sonden, Hybridisierung und Detektion

Zur Digoxigenin-Markierung von DNA-Sonden wurde das DIG DNA-Markierungs- und Detektions-System (Boehringer Mannheim) benutzt. DIG-markierte DNA-Sonden wurden durch PCR synthetisiert. Dazu wurde eine 20x dNTP-Mischung, supplementiert mit einem gleichen Volumen 10x DIG DNA-Markierungsmixtur (gleiche absolute dNTP-Konzentration), eingesetzt. Die markierte Sonde, die im Vergleich mit dem nicht markierten entsprechenden PCR-Fragment langsamer wandert, wurde auf einem Agarosegel aufgereinigt. Die Sonde wurde entweder aus dem Gel eluiert, oder das geschmolzene Gelstückchen wurde direkt für die Hybridisierung verwendet. Die Nylon Filter mit immobilisierter DNA wurden mit Easy Hyb-Lösung (Boehringer Mannheim) in einer Hybridisierungsröhre bei 37°C für 1 h vorhybridisiert. Danach wurde die frisch denaturierte DIG-markierte Sonde zugegeben (mindestens 50 ng/100 cm² Filter

Oberfläche, die Konzentration wurde aus der Bandenintensität auf Ethidiumbromid gefärbten Agarosegelen abgeschätzt). Die Hybridisierung wurde bei 37°C über Nacht durchgeführt. Die Filter wurden zweimal mit Hochsalzpuffer (2x SSC, 0.1 % SDS) für 5 min bei Raumtemperatur und zweimal mit Niedrigsalzpuffer (0.1x SSC, 0.1 % SDS) 15 min bei 65°C gewaschen. Die Filter wurden mit Maleinsäure Puffer (100 mM Maleinsäure, 150 mM NaCl, pH 7.5) für 5 min äquilibriert und mit anti-Digoxigenin Antikörper, gekoppelt mit alkalischer Phosphatase (1:5000 Verdünnung in Maleinsäurepuffer mit 1 % Blockreagenz (Boehringer Mannheim)), für 30-60 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nicht gebundene Antikörper wurden durch drei zehninütige Waschschrte in Maleinsäure Puffer entfernt. Die Sonde wurde durch NBT/BCIP-Färbung sichtbar gemacht (Abschnitt 2.3.5).

2.2.19 “Screening” von cDNA- und genomischen Bibliotheken

Für das Durchsuchen der λ ZAP *D. discoideum* Bibliothek (Gräf *et al.*, 2000b) wurden XL1-blue Zellen über Nacht in LB Medium (mit 10 mM MgSO₄ und 0.02 % Maltose) kultiviert, geerntet und in 10 mM MgSO₄ auf eine OD₆₀₀ von 1.0 eingestellt. 600 μ l der Bakteriensuspension wurden mit 60000-70000 pfu der λ -Phagen Bibliothek infiziert und 20 min bei 37°C geschüttelt. Die Suspension wurde dann mit 12-13 ml aufgeschmolzenem 50°C warmen Topagar gemischt und sofort auf vorgewärmte NZYM Agarplatten (\varnothing 9 cm) gegossen. Die Platten wurden bei 37°C für 4-6 h inkubiert, bis die Plaques einen Durchmesser von ca. 1 mm erreicht hatten. Die Platten wurden bei 4°C abgekühlt, bevor auf Plattengröße zurecht geschnittene Nylonmembranen kurz auf die Plaques aufgelegt wurden. Die Orientierung der Membran wurde mit einer Nadel markiert und die Membran vorsichtig abgezogen. Die Membran wurde für ca. 5 min mit der Phagenseite nach oben auf ein mit Denaturierungspuffer (1.5 M NaCl, 0.5 M NaOH) getränktes Whatman 3mm Filterpapier gelegt, so dass die Phagen lysierten und die DNA denaturiert wurde. Die Membranen wurden dann auf die gleiche Weise mit Neutralisierungspuffer (1 M Tris/HCl, pH 7.4, 1.5 M NaCl) und zuletzt mit 2x SSC behandelt. Nach Lufttrocknung der Membran wurde die DNA mit UV-Licht immobilisiert. Anschließend wurden die Membranen mit DIG-markierten Sonden hybridisiert und die Färbereaktion wie in Abschnitt 2.3.5 beschrieben, durchgeführt. Positive Plaques wurden mit einer abgeschnittenen Pipettenspitze ausgestochen, und für wenigstens 15 min bei 37°C mit 500 μ l SM Puffer/10 μ l Chloroform vermischt. Danach wurde die Suspension über Nacht bei 4°C stengelassen, so dass die Mehrzahl der Phagen aus dem

Agar in das Medium diffundiert waren. Das Screening wurde mit den isolierten Phagen wiederholt, wobei jedes mal die Anzahl der Phagen reduziert wurde (pfu) bis Klone isoliert werden konnten (3-4 Wiederholungen).

Die pBluescript-Plasmide, die die gewünschte cDNA als Teil der λ ZAP Sequenz enthielten, wurden durch *in vivo*-Excision isoliert (Short *et al.*, 1988). Dazu wurden 200 μ l einer Übernachtskultur XL-1 blue Zellen, die in 10 mM MgSO₄ auf eine OD₆₀₀ von 1.0 eingestellt worden waren, mit 250 μ l Phagenlösung und 1 μ l ExAssist-Helferphage (Stratagene) vermischt und bei 37°C für 15 min geschüttelt. Danach wurden 3 ml LB Medium zugegeben und die Lösung für weitere 2.5 - 3 h bei 37°C und 200 rpm geschüttelt. Die Röhrchen wurden für 20 min auf 65°C erhitzt und danach 15 min bei 1000 g zentrifugiert. 10-100 μ l des Überstands wurde mit 200 μ l frisch gewachsenen SOLR-Zellen (auf eine OD₆₀₀ von 1.0 in 10 mM MgSO₄ eingestellt) bei 37°C für 15 min inkubiert und auf LB/Amp Agarplatten plattiert. Kolonien der SOLR-Zellen, die die excisierten pBlueskript-Phagemide enthielten, wurden aus Kolonien der SOLR-Zellen präpariert und analysiert.

2.2.20 Vektor-Konstruktionen

Alle Vektoren zur Herstellung von Fusionsproteinen mit dem grün-fluoreszierenden-Protein (GFP) und dem Maltose-bindenen-Protein (MBP) bzw. der Gendisruptionen wurden durch PCR unter Verwendung von Oligonukleotiden mit Restriktionsenzym-Erkennungssequenzen hergestellt. Die angegebenen Basenpositionen beziehen sich auf die kompletten cDNA-Sequenzen.

2.2.20.1 Konstruktion der MBP-DdEB1 Expressionsvektoren

Zur Expression der MBP-DdEB1-Fusionsproteine in *E.coli* wurden die PCR-Fragmente MBP-DdEB1 (17-1537; EB1-5-Bam/EB1-6-Hind*), MBP-DdEB1 Δ 1□□N (404-1537; Nde3-EB1-Bam/EB1-6-Hind*), MBP-DdEB1 Δ 281C (17-860; EB1-5-Bam / EB1-16-Hind) in die *Bam*HI / *Hind*III Restriktionsschnittstellen des Vektors pMALc2 ligiert.

Für die Expression von MBP-DdEB1 in *D. discoideum* wurde die komplette MBP-DdEB1 Sequenz mit den Primern MBP-Kpn und EB1-8-Nsi* unter Benutzung des entsprechenden *E.coli* Expressionsvektors amplifiziert und in die *Kpn*I/*Nsi*I Restriktionsschnittstellen des Vektors p1ABsr8 kloniert.

2.2.20.2 Konstruktion der GFP-DdEB1 Expressionsvektoren

Die PCR-Konstrukte zur Expression von N-terminalen GFP-DdEB1-Fusionsproteinen in *D. discoideum* waren GFP-DdEB1 (17-1537; EB1-7-Sal / EB1-8-Nsi*), GFP-DdEB1 Δ 1□□N (404-1537; EB1-Sal-del2N / EB1-8-Nsi*), GFP-DdEB1 Δ 482C (17-1517; EB1-7-Sal / EB1-Nsi-del1), GFP-DdEB1 Δ 431C (17-1364; EB1-7-Sal / EB1-Nsi-del 2); GFP-DdEB1 Δ 328C (17-1055; EB1-7-Sal / EB1-Nsi-del3), GFP-DdEB1 Δ 281C (17-860; EB1-7-Sal / EB1-Nside14). Alle PCR-Konstrukte wurden in die *SalI/NsiI* Restriktionsschnittstellen des Vektors pA6PsgGFPXN ligiert.

2.2.20.3 Konstruktion des DdEB1-Gendisruptionsvektors und Herstellung einer DdEB1-Nullmutante

Die DdEB1 Sequenz wurde von den Basenpositionen 85-1537 mit den Primern EB1-Kpn und EB1-8-Bam durch PCR amplifiziert und in die *KpnI/BamHI* Restriktionsschnittstellen des pSPORT1-Vektors kloniert. Nachdem die pSPORT1 *HindIII* Schnittstelle durch Restriktionsverdau und Auffüllen der überstehenden Enden und Religation zerstört worden war, wurde die gesamte pSPORT1 Sequenz sowie die N- und C-terminale DdEB1 Sequenz durch Inverse-PCR (Primer EB1-17-Xba und EB1-16-Hind) amplifiziert. Dadurch wurde die Sequenz zwischen den Basen 767-835 deletiert. Das resultierende PCR-Produkt wurde mit der Blastizidin-Resistenzkassette ligiert, die durch *XbaI/HindIII* Restriktionsverdau des Vektors pUCBsr Δ Bam erhalten wurde.

Vor der Transformation in *D. discoideum* wurde das DdEB1-Gendisruptionsplasmid mit *XbaI / HindIII* verdaut, was die Effizienz der homologen Rekombination auf ca. 80 % erhöhte. Die DdEB1-Nullmutanten wurden durch Immunfluoreszenzmikroskopie unter Verwendung des anti-DdEB1 Antikörpers identifiziert.

2.2.20.4 Konstruktion des MBP-DdMoe1 *E. coli* Expressionsvektors

Zur Expression von MBP-DdMoe1-Fusionsprotein in *E.coli* wurde die gesamte DdMoe1 Sequenz mit den Primern Bam-Moe1 und Moe-Hind6* (Position 13-1597 auf dem cDNA-Klon slg776, Universität Tsukuba, Japan) amplifiziert und in die *BamHI/HindIII* Restriktionsschnittstellen des Vektors pMALc2 ligiert.

2.2.20.5 Konstruktion des GFP-DdMoe1 Expressionsvektors

Zur Konstruktion des GFP-DdMoe1 Expressionsvektors wurde die komplette DdMoe1 Sequenz mit den Primern Sal-Moe1 und Moe1-Eco2* (13-1597) mittels PCR amplifiziert und in die *SalI/EcoRI* Restriktionsschnittstellen des Vektors GFPxamcs1 kloniert.

2.2.20.6 Klonierung der kompletten DdLIS1 Sequenz

Der Klon SLE 307 (Universität Tsukuba, Japan) enthält die partielle genomische DNA Sequenz von DdLIS1. Der fehlende 5'-Bereich der kodierenden Sequenz wurde mit Hilfe der PCR mit den Primern T3+4 und Lis1-6 aus einer cDNA-Bank (Gräf *et al.*, 2000b) (Oligo dT Bank, Fraktion mit 1-2 kb Inserts) gewonnen und mit den Primern T3 und Lis1-4 nachamplifiziert. Das so erhaltene DNA-Stück wurde über seine internen *EcoRI/NsiI* Schnittstellen in die *EcoRI/NsiI* Schnittstellen des Klons SLE 307 eingebaut, so dass nun ein Plasmidklon mit der kompletten kodierenden DdLIS1 Sequenz zur Verfügung stand („psportLIS1“) (EMBL Genbank Zugriffsnummer AJ512794 Position 276-1535).

2.2.20.7 Konstruktion der MBP-DdLIS1 Expressionsvektoren

Zur Konstruktion des volllängen MBP-DdLIS1-Fusionsproteins wurde die kodierende DdLIS1 Sequenz mit den Primern *EcoRI*-Lis1-8 und Lis1-2-*XbaI* (278-1535) amplifiziert und in die *EcoRI/XbaI* Restriktionsschnittstellen des *E. coli* Expressionsvektors pMALc2 ligiert. Für das C-terminal deletierte MBP-DdLIS Δ C Konstrukt wurde die DdLIS1 Sequenz von den Positionen 278 bis 559 mit den Primern *EcoRI*-Lis1-8 und Lis1-96-*Bam** amplifiziert. Für das MBP-DdLIS Δ N Konstrukt wurde die Sequenz von Position 560 bis 1535 mit den Primern *Eco*-Lis1-95 und Lis1-2-*Bam** amplifiziert. Beide PCR-Fragmente wurden ebenfalls in die *EcoRI/XbaI* Restriktionsschnittstellen des *E. coli* Expressionsvektors pMALc2 ligiert.

Für die Expression von MBP-DdLIS1 und MBP-DdLIS Δ N in *D. discoideum* wurden die jeweiligen MBP-DdLIS1 Sequenzen mit den Primern MBP-*KpnI* und LIS1-2-*Bam** amplifiziert; MBP-DdLIS Δ C wurde mit den Primern MBP-*KpnI* und Lis-96-*Bam** amplifiziert. Als Template dienten die entsprechenden *E. coli* Expressionsvektoren. Die resultierenden PCR-Produkte wurden in die *KpnI/BamHI* Restriktionsschnittstellen des Vektors p1ABsr8 kloniert.

2.2.20.8 Konstruktion des GFP-DdLIS1 Expressionsvektors

Zur Konstruktion des N-terminalen GFP-DdLIS1 Expressionsvektors wurde die kodierende DdLIS1 Sequenz mit den Primern Lis1-Sal und Lis1-2-Bam* (315-1535) amplifiziert und in die *SalI/BamHI* Restriktionsschnittstellen des Vektor pA15GFP V18 ligiert.

2.2.20.9 Konstruktion des DICAC-myc Expressionsvektors

Zur Konstruktion von DICAC-myc wurde die DIC Sequenz von Position 1 (entspricht dem Startcodon) bis Basenposition 883 mit den Primern DIC1-Nhe und DIC4-myc-Bam aus dem Plasmid GFP-DIC amplifiziert (Arbeit von Ralph Gräf; GFP-DIC enthält die gesamte kodierende DIC-Sequenz) und in die *NheI/BamHI* Restriktionsschnittstellen von pA15pGFPV18Sac ligiert.

2.2.20.10 Konstruktion des GFP- α -Tubulin Expressionsvektors

Zur Konstruktion des GFP- α -Tubulin Expressionsvektors wurde die komplette *D. discoideum* α -Tubulin Sequenz (EMBL Genbank, Zugriffsnummer L13999) mit den Primern TubA-Sal1 und TubA-2-Bam mittels RT-PCR aus mRNA amplifiziert. Das PCR-Fragment wurde in die *SalI/BamHI* Restriktionsschnittstellen des Vektors pDiscGFPSSEB2 kloniert.

2.3 Biochemische und Immunologische Methoden

2.3.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Proteine wurden wie bei Bollag *et al.* (1996) beschrieben auf diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamid Gelen aufgetrennt. Um Partikel zu entfernen, wurden die Stammlösungen durch ein 0.4 μ m Polykarbonat Filter filtriert. Die Gele wurden aus frischen Stammlösungen gefertigt. Die Elektrophorese wurde in Biorad Minigel System Gelkammern bei 15 mA pro Gel für 15 min und anschließend bei 30 mA pro Gel für 45 min durchgeführt.

Die Proteinproben wurden entweder mit gleichem Volumen Harnstoff Probenpuffer oder 1/4 Volumen 5x Laemmli Probenpuffer versetzt und 2-5 min gekocht.

Tab. 1 Zusammensetzung der SDS-Polyacrylamidgele mit verschiedenen Acrylamid Konzentrationen

Stammlösung	3 % Sammelgel	12.5 % Trenngel
30 % Acrylamid	0.68 ml	3.70 ml
1 % Bis-Acrylamid	0.50 ml	0.93 ml
Trenngelpuffer (2M Tris/HCl, pH 8.7, 0.4 % SDS)	-	2.5 ml
Sammelgelpuffer (0.25M Tris/HCl, pH 6.8, 0.4 % SDS)	1.0 ml	1.8 ml
H ₂ O	1.78 ml	1.80 ml
10 % APS	35 µl	45 µl
TEMED	7 µl	9 µl

Als Standard wurde ein Proteingemisch definierter Molekülmasse verwendet:

LMW (Sigma): 92.5, 67, 45, 30, 20, 14 kDa

HMW (Sigma): 205, 116, 97, 66, 45, 29 kDa

2.3.2 Native Gradientengelelektrophorese

Die Auftrennung nativer Proteine wurde auf vorgefertigten Gradientengelen (Ready Gel; Bio-Rad, München, Deutschland) mit 4 bis 20 % Acrylamid durchgeführt.

2.3.3 Coomassie-Blau-Färbung von Proteinen

SDS-PAGE-Gele wurden 1 h in der Coomassie-Färbelösung (0,1 % Coomassie Brilliant Blue R250) gefärbt. Nicht gebundener Farbstoff wurde durch Schütteln in einer Entfärbelösung (10 % Ethanol, 7 % Essigsäure) ausgewaschen.

2.3.4 Methanol/Chloroform Proteinpräzipitation

Diese Methode, beschrieben von (Wessel und Flügge, 1984) eignet sich für verdünnte Proteinlösungen, die Detergenzien, Phospholipide oder Salz enthalten. Die Proteinlösung wurde mit 5 Volumen einer Methanol/Chloroform-Mixtur (4:1) vermischt, dann wurden 3 Volumen H₂O zugesetzt und kräftig gemischt. Die obere flüssige Phase wurde nach Zentrifugation (10000 g, 1 min) entfernt. Das Chloroform-Kissen mit dem präzipitierten Protein wurde mit

3 Volumen Methanol vermischt und zentrifugiert (10000 g, 2 min). Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen, das Proteinpellet getrocknet und in 0.5x Harnstoff Probenpuffer aufgenommen.

2.3.5 Immunoblot (Western Blot), Immunfärbung und Chemolumineszenz

Nach der Auftrennung der Proteinproben mittels SDS-PAGE wurden die Proteine auf Nitrocellulose transferiert. Dazu wurde eine „semi-dry“ Elektrophorese-Apparatur (BioRad Trans-Blot SD) und das Puffersystem nach Kyhse-Anderson (1984) benutzt; modifiziert durch die Zugabe von 20 % Methanol. Puffer 1 (300 mM Tris, 0.01 % SDS), Puffer 2 (30 mM Tris, 0.01 % SDS), Puffer 3 (30 mM Tris, 40 mM ϵ -Amino-n-Capron-Säure).

Der Transfer wurde bei 1 mA/cm² für 1 h durchgeführt, die Membran reversibel mit 0,25 % Ponceau S (Sigma) in 40 % Methanol/15 % Essigsäure, gefärbt. Der Größenstandard wurde vor Absättigung in TBST (20 mM Tris/HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.05 % Tween-200) /3 % Fischgelatine gekennzeichnet. Die Inkubation mit dem primären Antikörper verdünnt in TBST/1 % Fischgelatine erfolgte für 1 h bei Raumtemperatur. Danach wurde die Membran in TBST (3 x 5 min) gewaschen und mit dem sekundären Antikörper (1:10000 Verdünnung in TBST/1 % Fischgelatine von anti-Kaninchen oder anti-Maus Antikörper, alkalische Phosphatase-Konjugat) für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Membran wurde 3 x 5 min mit TBST gewaschen, kurz in AP-Reaktionspuffer (100 mM Tris/HCl pH 9.5, 100 mM NaCl, 50 mM MgCl₂) geschwenkt. Durch 5-20 min Inkubation in AP-Reaktionspuffer supplementiert mit 4.5µl/ml NBT (75 mg/ml Stammlösung in 70 % Dimethylformamid) und 3µl/ml BCIP (50 mg/ml in Dimethylformamid) erfolgte die Färbereaktion für alle in dieser Arbeit gezeigten Immunfärbungen.

2.3.6 Bestimmung der Proteinkonzentration

Zur annähernden Bestimmung der Proteinkonzentration wurde die OD₂₈₀ einer Proteinlösung gemessen, wobei 0.7 mg Protein pro 1 OD₂₈₀ zugrunde gelegt wurde (dieser Wert ist für Immunoglobuline am genauesten). Exakte Konzentrationsmessungen wurden nach der Methode von Bradford durchgeführt (Bradford, 1976). Für jede Messung wurde eine BSA-Referenzkurve erstellt.

2.3.7 Aufreinigung von bakteriell exprimierten MBP-Fusionsproteinen durch Amylose-Affinitätschromatographie

Diese Aufreinigung wurde für die jeweiligen Fusionsproteine aus dem Maltose-bindenden-Protein und den DdEB1, DdMoe1 und DdLIS1 Konstrukten durchgeführt. 0.5 l der entsprechenden *E.coli* Kultur wurde in LB/Amp Medium, supplementiert mit 10 mM Glukose, bei 37°C bis zu einer OD₂₈₀ von 1.0 kultiviert. Nach Induktion mit 0.3 mM IPTG wurden die Zellen für weitere 4-12h bei 21°C geschüttelt. Die Zellen wurden abzentrifugiert (5000 rpm, 10 min, Sorvall-Rotor GSA, 4°C), in einem kleinen Volumen TE Puffer resuspendiert und anschließend bei -20°C eingefroren. Nach Auftauen wurden die Zellen durch sonifizieren lysiert und dann für 20 min bei 20000 rpm (Sorvall SS34-Rotor) zentrifugiert. Der Überstand wurde mit NaCl auf 100 mM supplementiert. Die Lösung wurde langsam auf eine Säule mit 1 ml Amyloseharz (ca. 10 s pro Tropfen) aufgetragen. Das Harz wurde gründlich mit Säulenpuffer (200 mM NaCl, 10 mM Tris/HCl, pH 7.5, 1 mM EDTA) oder Lyse-Puffer (150 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 50 mM HEPES/K, pH7.4) gewaschen. Das MBP-Fusionsprotein wurde mit Säulen- bzw. Lyse-Puffer, beide mit 10 mM Maltose versetzt, eluiert. Die Reinheit der Präparation wurde durch SDS-PAGE untersucht.

2.3.8 Gewinnung von cytosolischen Extrakten, Kernen und Centrosomen aus *D. discoideum*

Ca 5 x 10⁹ axenisch gewachsene *Dictyostelium discoideum* Zellen wurden bei einer Zelldichte von 4-5 x 10⁶ Zellen/ml geerntet und dreimal in Soerensen Puffer gewaschen. Dieser und alle folgenden Reinigungsschritte wurden bei 4°C durchgeführt. Beim letzten Waschschrift wurden 2 µM Cytochalasin A (Sigma) zugegeben.

Zur Gewinnung von Rohextrakten für SDS-PAGE wurden die Zellen an dieser Stelle entnommen, in 0.5x Harnstoff Probenpuffer/Trenngelpuffer resuspendiert und 3 min gekocht.

Zur Gewinnung von Zellkernen wurde das Zellpellet in 5 Volumen Lysepuffer (50 mM Na-Hepes pH 7.4, 100 mM NaCl, 10 % Saccharose, 2 mM MgCl₂, 1 mM ATP, 2 µM Cytochalasin A, Protease Inhibitor Cocktail) resuspendiert, und die Zellen durch Filtration durch einen 5 µm Polycarbonat Filter (Nuclepore, Costar GmbH, Bodenheim, Deutschland) lysiert. Die Kerne wurden durch Zentrifugation (2500 g, 10 min) pelletiert.

Für cytosolische Extrakte für SDS-PAGE wurde der Kernüberstand verwendet, in 0.5x Harnstoff Probenpuffer resuspendiert und für 3 min gekocht.

Die Centrosomen wurden aus den isolierten Zellkernen wie bei Gräf *et al.* (1998) beschrieben isoliert. Dazu wurde das Kernpellet in 30 ml Pyrophosphat Puffer (100 mM Na-PIPES, pH 6.9, 2 mM MgCl₂, 30 % (w/v) Saccharose, 40 mM Tetranatriumdiphosphat, 1 mM DTT, 1 % Triton-X-100, 1 mM Na-ATP, 1x Protease Inhibitor Cocktail) aufgenommen, 1 min gevortext und zentrifugiert (2500 g, 10 min). Der Überstand wurde mit 0.6 ml einer Heparin Lösung (10 mg/ml) supplementiert und für 5 min auf Eis inkubiert. Die Lösung wurde dann zweimal durch einen 5 µm Polycarbonat Filter filtriert und auf den ersten Saccharose Gradienten geladen (zwei Beckman SW40 Röhren mit 0.5 ml 80 % und 1.5 ml 50 % Saccharose in Gradientenpuffer: 10 mM Na-PIPES, pH 6.9, 2 mM MgCl₂, 0.1 % Triton-X-100, 0.1 % 2-Mercaptoethanol, 1 mM Na-ATP, 1x Protease Inhibitor Cocktail). Nach Zentrifugation (55000 g, 1 h) wurden die Centrosomen, die sich an der Grenze der zwei Fraktionen befanden, abgesaugt (1 ml pro Gradient). Die gesammelte Fraktion wurde mit 1.5 ml Gradientenpuffer verdünnt und abermals durch einen 5 µm Polycarbonat Filter filtriert. Danach wurde sie auf einen zweiten Saccharose Gradienten geladen (zwei Beckman SW50.1 Röhren mit 0.5 ml 80 %, 0.5 ml 70 %, 1 ml 55 % und 1 ml 50 % Saccharose Lösung). Nach Zentrifugation (40000 g, 1 h) wurde die Centrosomen enthaltende Lösung in zwei Fraktionen (0.6 ml und 0.8 ml) vom Boden des Röhrchens abgenommen. Die zweite Fraktion enthielt dabei weniger kontaminierende Vesikel und DNA.

Für die Immunfluoreszenzmikroskopie wurden 2 µl Centrosomen in 0.5 ml PBS verdünnt und durch Zentrifugation (2500 g, 10 min) auf unbehandelte runde Deckgläschen sedimentiert. Die Centrosomen wurden, wie in Abschnitt 2.4.4 beschrieben, fixiert und gefärbt.

2.3.9 Gelfiltration

Aufgereinigtes bakteriell exprimiertes MBP-DdEB1 wurde auf eine Superdex 200HR10/30 Gelfiltrationssäule geladen (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland). Die Gelfiltration wurde in 50 mM HEPES, pH 7.4, 150 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 1 mM Maltose bei einer Flussrate von 0.3 ml/min durchgeführt. 0.75 ml Fraktionen wurden gesammelt, mit Methanol/Chloroform präzipitiert, und mittels SDS-PAGE und Immunoblot analysiert. Das Molekulargewicht wurde durch Vergleich mit globulären Standardproteinen bestimmt.

(Boehringer Combithek, Calibration kit II, Cytochrom C 12.5 kDa, Ovalbumin 45.0 kDa, BSA 68.0 kDa, Aldolase 158.0 kDa, Ferritin 450 kDa).

2.3.10 Herstellung von polyklonalen Antiseren aus Kaninchen

Die durch Amylose-Affinitätschromatographie gereinigten MBP-Fusionsproteine MBP-DdEB1, MBP-DdLIS1 und MBP-DdMoe1 waren für die direkte Immunisierung geeignet. Es wurden jeweils zwei Kaninchen mit ca. 1 mg Protein immunisiert. Die Immunisierungen wurden von Pineda Antikörper Service (Berlin, Deutschland) unter Benutzung eines Standardprotokolls von fünf Immunisierungen über einen Zeitraum von 60 Tagen durchgeführt.

Zur Affinitätsreinigung der Antiseren wurden diese mit einem gleichen Volumen PBS gemischt und, um Partikel zu entfernen, durch einen 0.8 µm Polycarbonat Filter filtriert. Danach wurde das Antiserum auf eine Sepharosesäule mit dem kovalent gebundenen Antigen (vgl. Abschnitt 2.3.11) gegeben. Die Säule wurde gründlich mit PBS gewaschen. Danach wurden die spezifischen Antikörper mit 100 mM Glycerin, pH 2.7 eluiert und sofort mit 1 M Tris/HCl, pH 8.7 neutralisiert. Zur Lagerung wurde den affinitätsgereinigten Antikörpern 0.5 % BSA und 0.02 % NaN₃ zugesetzt.

2.3.11 Kovalente Kopplung von Antikörpern und Proteinen an NHS-aktivierte Sepharose

Der für die kovalente Kopplung benutzte monoklonale anti-DdCP224 Antikörper 4/148 (Gräf *et al.*, 1999) wurde aus dem Zellkulturüberstand von Maus-Hybridomazellen, die in serumfreiem Medium (Evan *et al.*, 1985) gewachsen waren, gewonnen. Polyklonale anti-DdEB1 und anti-γ-Tubulin (Euteneuer *et al.*, 1998) Antikörper wurden aus Kaninchen Antiseren gewonnen. Die Antikörper wurden aus dem Zellkulturüberstand bzw. aus den Antiseren durch langsame Zugabe eines gleichen Volumens gesättigter Ammoniumsulfat-Lösung präzipitiert (unter ständigen rühren, 1 h auf Eis). Das nach Zentrifugation (14000 rpm, 20 min, 4°C, Sorvall Rotor GSA) erhaltene Pellet, wurde in 1 ml Kopplungspuffer (0.2 M NaHCO₃, 0.5 M NaCl, pH 8.3) aufgenommen und über Nacht gegen 3 x 0.5 l Kopplungspuffer dialysiert. Vor der Kopplung wurde der Antikörper für 10 min bei 10000 g zentrifugiert, der Überstand wurde in YM30 Centriconröhrchen auf 1 ml konzentriert.

Das zur Kopplung vorgesehene aufgereinigte MBP-Fusionsprotein (zur Affinitätsreinigung der Antikörper) wurde direkt mit Kopplungspuffer, dem 100 mM NaCl zugefügt war, gewaschen, von der Säule eluiert und ebenfalls auf ein Endvolumen von 1 ml konzentriert.

Für die Kopplung wurden 0.5 ml NHS (N-Hydroxyl-Succinimid)-aktivierte Sepharose (Amersham Biosciences) mit eiskaltem 1 mM HCl gewaschen und sofort mit 1 ml der Proteinlösung (ca. 0.5-5 mg Protein) gemischt. Das Protein-Sepharose-Gemisch wurde in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß 2-4 h bei Raumtemperatur rotiert. Die Sepharose Kügelchen wurden mehrmals alternierend mit zwei Puffern gewaschen: Puffer A (0.5 M Ethanolamin, 0.5 M NaCl, pH 8.3) und Puffer B (0.1 M Essigsäure, 0.5 M NaCl, pH 4.0), mit einer einmaligen 20 minütigen Inkubationszeit in Puffer A, um nicht okkupierte Bindungsstellen abzusättigen. Die gekoppelten Sepharose Kügelchen wurden in 50 mM Phosphatpuffer (pH 7.0, 0.02 % NaN_3) aufbewahrt.

2.3.12 Immunpräzipitation

Immunpräzipitation mittels NHS Sepharose gekoppelter Antikörper

Für die Immunpräzipitation wurde 1 ml cytosolischer Extrakt (siehe Abschnitt 2.3.8) in Lysepuffer (50 mM Na-Hepes, pH 7.4, 150 mM KCl, 10 % Saccharose, 2 mM MgCl_2 1 mM ATP, 2 μM Cytochalasin A, Protease Inhibitor Cocktail) mit 1/10 Volumen Sepharose-Harz mit den immobilisierten Antikörpern (siehe Abschnitt 2.3.11) bei Raumtemperatur für 20 min auf einem Rotor inkubiert. Das Sepharose-Harz wurden fünfmal mit Lysepuffer gewaschen, in 0.5x Harnstoff Probenpuffer resuspendiert und aufgeköcht; danach gelelektrophoretisch aufgetrennt und durch Immunoblot analysiert.

Immunpräzipitation mittels Protein-G Sepharose

500 μl cytosolischer Extrakt in Lysepuffer wurde für 10 min bei 4°C mit 14000 rpm (Beckman-Zentrifuge CS-15R, F2402 Rotor) zentrifugiert. Der Überstand wurde mit dem jeweiligen Antikörper (aus Antiserum 2 μl ; gereinigter Antikörper 2 μg) für 1 h bei 4°C inkubiert. Danach wurden dem Ansatz 20 μl mit PBS / 0,5 % BSA abgesättigtes Protein-G Sepharose-Harz (Amersham Biosciences) und NP40 (Endkonzentration 0.5 %; Sigma) zugefügt. Der Ansatz wurde für 1 h bei 4°C auf einem Rotor inkubiert. Das Protein-G Sepharose-Harz wurde fünfmal mit Lysepuffer (0.5 % NP40) gewaschen, in 0.5x Harnstoff Probenpuffer resuspendiert und aufgeköcht, danach gelelektrophoretisch aufgetrennt und durch Immunoblot analysiert.

2.3.13 Bestimmung des F-Aktin Gehalts

Zur Quantifizierung des F-Aktin Gehalts wurden exponentiell wachsende Zellen geerntet und zweimal mit Phosphatpuffer gewaschen. Je 2×10^7 Zellen wurden in Phosphatpuffer (teils unter Zugabe von Latrunculin A) in 10 cm Petrischalen für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde der Phosphatpuffer entfernt, und die adherenten Zellen mit 10 ml eiskaltem Lysepuffer (80 mM Pipes, pH 6.8, 5 mM EGTA, 30 % Glycerin, 5 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 1 % Triton-X-100, Protease Inhibitor Cocktail) lysiert.

Die Aktin Konzentration der Lysate betrug etwa 0.3 μ M. Je 200 μ l Zelllysate wurden 40 min bei 50000 rpm (TLA100.3 Rotor, Beckman), 4°C zentrifugiert, die Pellets und Überstände wurden zu gleichen Volumina in SDS Probenpuffer resuspendiert.

2.4 Zellbiologische Methoden

2.4.1 Kultivierung und Konservierung von *E. coli*

E. coli Zellen wurden bei 37°C auf Agarplatten oder in Schüttelkultur bei 240 rpm in LB Medium unter Zusatz des jeweiligen Antibiotikums kultiviert (Sambrook *et al.*, 1989). Für die dauerhafte Lagerung wurden 430 μ l einer Bakterienkultur mit 70 μ l sterilem Glycerin vermischt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C gelagert.

2.4.2 Kultivierung und Sporenkonservierung von *D. discoideum*

Dictyostelium Zellen wurden in Schüttelkultur bei 150 rpm und 21°C in AX2 oder in HL5c Medium kultiviert. Bei Mutanten wurde BlastizidinS und/oder G418 zugesetzt. Die Generationszeit betrug unter diesen Bedingungen etwa 9 h. Alternativ wurden adherierte Zellen für längere Aufbewahrung in Zellkulturflaschen kultiviert. Das Medium wurde zweimal pro Woche gewechselt.

Zur dauerhaften Lagerung wurden die Zellen gehungert, was die Bildung von Sporen zur Folge hat, welche leicht bei -70°C gelagert werden können. Dazu wurden axenisch wachsende Zellen zweimal mit Soerensen Phosphatpuffer gewaschen und auf eine Dichte von $2-3 \times 10^8$ Zellen/ml eingestellt. 500 μ l der Suspension wurde auf frische Phosphat Agarplatten plattiert. Innerhalb von 2-3 Tagen bildeten sich Fruchtkörper. Diese wurden mit sterilen Phosphatpuffer (ca. 5 ml pro

Platte) abgewaschen und in 1 ml Aliquots (Nunc 2.2 ml Röhren) in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C gelagert. Zur Inoculation einer Schüttelkultur wurden die Sporen bei Raumtemperatur aufgetaut, in 30 ml HL5c Medium resuspendiert und bei 150 rpm und 21°C geschüttelt. Nach drei Tagen erreichte die Kultur normalerweise eine Dichte von ca. 5×10^6 Zellen/ml.

2.4.3 Nocodazolbehandlung und Latrunculin A Behandlung

Adhärenz *Dictyostelium* Zellen wurden auf Deckgläschen mit $10 \mu\text{g/ml}$ Nocodazol (Sigma) für 3 Stunden in Phosphatpuffer inkubiert. Danach wurden die Zellen mit Glutaraldehyd fixiert.

Die Latrunculin A (Biomol) Behandlung zur Lebendzellbeobachtung der GFP-Aktin-Zellen wurde mit $0.2 \mu\text{M}$ Latrunculin A in Plastikschrälchen mit Deckgläschenboden (World Precision Instruments, Sarasota, U.S.A.) durchgeführt.

2.4.4 Indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie von *D. discoideum* und isolierten Centrosomen

Logarithmisch wachsende Zellen einer *D. discoideum* Kultur wurden auf 1×10^6 Zellen/ml mit HL5c Medium verdünnt und zum Absetzen auf runde Deckgläschen transferiert. Nach ca. 20 min wurde das Medium entfernt und die Zellen mit der jeweiligen Methode fixiert.

Isolierte Centrosomen wurden auf runde Deckgläschen zentrifugiert (siehe Abschnitt 2.3.8) und wie ganze Zellen fixiert.

In dieser Arbeit wurden folgende Fixierungen verwendet:

Formaldehyd-Fixierung:	3.7% (v/v) Formaldehyd, 0.5% Triton-X-100 in 50% PHEM-Puffer, 5 min Fixierung
Formaldehyd-Aceton-Fixierung:	3.7% (v/v) Formaldehyd in PBS, 5 min Fixierung, anschließend 1 min in -20°C kaltem Aceton
Methanol-Fixierung:	100% Methanol (-20°C), 5 min Fixierung
Glutaraldehyd-Fixierung:	0.5% (v/v) Glutaraldehyd, 0.5% Triton-X-100 in 50% PHEM-Puffer, 5 min Fixierung, dann 2×5 min waschen in Soerensenpuffer und 1×10 min waschen in 1 mg/ml Borhydrid

Für die Immunfärbung wurden die fixierten Präparate mit einem bzw. einer Mischung aus zwei verschiedenen (für Doppelfärbungen) primären Antikörpern, verdünnt in PBS (mit 1% BSA, 0.1% NaN₃, 1 h) bei Raumtemperatur inkubiert. Nicht gebundene Antikörper wurden durch drei fünfminütige Waschschrte mit PBS entfernt. Anschließend wurden die Präparate mit den sekundären Antikörper (Alexa 488-, Alexa 568- oder Cy3-Konjugate, nach Hersteller-Angaben verdünnt) eine Stunde im Dunklen inkubiert. Die Präparate wurden zuletzt dreimal gewaschen, zur Visualisierung der Kerne und der mitochondrialen DNA wurde im zweiten Waschschrte DAPI (1 mg/ml) zugegeben bzw. 20 min mit TOPRO3 (1:1000 Verdünnung; Molecular Probes) mit 100 µg/ml RNase A (AppliChem, Darmstadt) inkubiert. Die Präparate wurden auf einem Objektträger mit 5 µl “anti-Bleach” (10 % PBS, 1 % Phenylldiamin, 89 % Glycerin) eingebettet und mit Nagellack versiegelt. Alternativ wurde als Einbettmittel das “Pro Long Antifade Kit” (Molecular Probes) verwendet. Die Fluoreszenzpräparate wurden entweder an einem Zeiss Axiophot Mikroskop mit DAPI-, Rhodamin- und Fluorescein-Filtern betrachtet, wobei die Bilder mit einer Hamamatsu CCD Kamera C5985 mit einem “frame-grabber” und einem Macintosh Computer aufgezeichnet wurden. Alternativ erfolgte die Mikroskopie und Bildaufzeichnung an einem Zeiss Axiovert 200M Mikroskop mit einer “AxioCam Mrm” Kamera und der Axiovision-Software.

Lebendzellbeobachtungen wurden in Plastikpetrischälchen mit Deckgläschenboden (World Precision Instruments, Sarasota, U.S.A.) in HL5c-Medium oder Phosphatpuffer durchgeführt.

2.4.5 Konfokale Mikroskopie

Konfokale Mikroskopie an Standard-Immunfluoreszenzpräparaten wurde an einem inversen Mikroskop (Leica DM IRBE; Leica Mikroskopie und System GmbH, Wetzlar, Germany) ausgerüstet mit dem Leica TCS NT System mit einem 63x/1.3 Objektiv bzw. an einem Zeiss Axiovert 200M/510Meta Laser Scanning System, mit einem 63x/1.4 Objektiv durchgeführt.

Lebendbeobachtungen wurden entweder am Zeiss Axiovert 200M/510Meta Konfokal-Mikroskop mit einem 63x/1.3 bzw. 40x/1.3 Objektiv oder an einem Perkin-Elmer-Wallac Ultraview “spinning disk” Konfokalsystem mit einem 100x/1.3 Objektiv und einer 12-bit CCD Kamera durchgeführt.

Lebende Zellen wurden bei sehr niedriger Laserintensität, zum Teil unter Agar-Auflage (Fukui, 1987) betrachtet. An dem Ultraview Mikroskop wurden Z-Stapel mit einer Bildrate von

1.4 Bildern pro Sekunde mit einem 2x2 binning aufgenommen. Mit dem 510Meta Mikroskop wurden die Bilder mit einer Bildrate von etwa 2 Bildern pro Sekunde und einer Auflösung von meist 512x256 Pixel aufgenommen.

Konfokale Bilderstapel wurden zum Teil mit der Huygens 2.2 Dekonvolutions-Software (Bitplane AG, Zürich, Schweiz) unter Benutzung einer berechneten theoretischen „Point Spread Function“ und des „Maximum Likelihood Estimation Algorithmus“ prozessiert. Z-Projektionen wurden entweder mit dem Programm ImageJ (National Institute of Health, Bethesda, MD) oder mit der Zeiss 510Meta Software berechnet.

3. Ergebnisse

3.1 Untersuchung von *D. discoideum* EB1

3.1.1 Klonierung von DdEB1

Eine partielle DNA Sequenz, die das *Dictyostelium*-Homologe von EB1 kodiert (Position 641-1287 der genomischen DdEB1 Sequenz auf Klon JAX4a75d11) wurde nach einer BLASTN-Suche des *Dictyostelium*-Genomprojekts wegen seiner Homologie zum menschlichen Protein identifiziert (Kay und Williams, 1999). Dieses Fragment wurde als DIG-markierte Sonde zum „screening“ einer größenfraktionierten cDNA-Bibliothek (Gräf *et al.*, 2000b), die Fragmente von 1-2 kb enthielt, benutzt. Es wurden sieben identische Klone isoliert, die die gesamte kodierende DdEB1 Sequenz enthielten (EMBL Genbank Zugriffsnummer AJ426053). Die bislang identifizierten EB1-Proteine weisen ein Molekulargewicht von 35-38 kD auf. Mit einem berechneten Molekulargewicht von 57 kDa und einer Länge von 506 Aminosäuren ist DdEB1 somit das größte bekannte Mitglied der EB1-Proteinfamilie. Zum humanen und Maus-Homologen weist DdEB1 mit 43 % Identität auf Aminosäureebene den größten Verwandtschaftsgrad auf. Die außergewöhnliche Größe des Proteins ist auf mehrere Sequenzinsertionen und eine C-terminale Extension zurückzuführen (Abbildung 6).

```

Dd      MEGFGRNEIENWINDLLEQLDYKTEQLGSGAALCOLVDIHPGKINLRKVNFNKAYDYETRNFSYLQESFAKLGVEKYVEVSELVKSRFCANLEFAQWKK 102
Hs      MAVNVYSTSVTSDNLSRHDMLAWINESLQENLTKIEQLGSGAANYCOFMDLRFPSHALRKRVRFCALKEHEYLQNFKILQAGEKRMGVDPKIIIPVDKLVKGFQDNFBEFVQWKK 113

Dd      YFDQYVTCGEFYNAIERRIALKIPTDKDRSSLKQKTAATGAPPTSKPSPSSTLKPATTAASKPAPVSKPTTTTAKPTPSSVSKPVSKEPTSSISKFVSKPTPSISKFVTKPTPT 215
Hs      FFDANVYDCKDYDPVAAR.....QQOETAV.....APSLVAPALNKE.....KKPLTSSSAAPQREI..... 164

Dd      TTSTSTTTVSTPEPSTPKPTNTPIPTSTTGKPTLTQPTPRPTPKSVSPTPFVWAGSTVTTTKTVIVSEPPTELEELEQKRELEQQRKLEBECKSVIQEMTEKIANFETITIGDI 328
Hs      ...STQRTAARE.....KAGEGVVRKNEGVGNG.....DDEARELMCCVNVL.....KLTVEDL 210

Dd      EKLRDFYFERLREAEIFCCDH..SDVLLGEVLKILYNSNGEEEGEEGEG..EEQGGEEEEEEBQGENNIEQEEBQIEQQQQQEEEEHERETLSEPEPDQNSAIP 506
Hs      EKLRDFYFGNLRNIEELCCENEGENDEVLQRIVDILLYATD.....EGFVIPDEGGPQEBQEBY 268
    
```

Abbildung 6: Vergleich der DdEB1 und der humanen EB1 Aminosäuresequenzen. Paarweiser Sequenzvergleich von DdEB1 (Dd) mit seinem humanen Homolog EB1 (Hs), durchgeführt mit dem „gap alignment“ Programm (GCG). Identische Aminosäuren sind schwarz, ähnliche grau hinterlegt. Die „coiled-coil“-Domäne, wurde mit dem „Coilscan“ Programm (Lupas *et al.*, 1991) vorhergesagt und ist in beiden Sequenzen kursiv und unterstrichen dargestellt.

3.1.2 Untersuchung der subzellulären Lokalisation

3.1.2.1 Untersuchung der Lokalisation von DdEB1 mit Hilfe polyklonaler Antikörper und einer GFP-Mutante

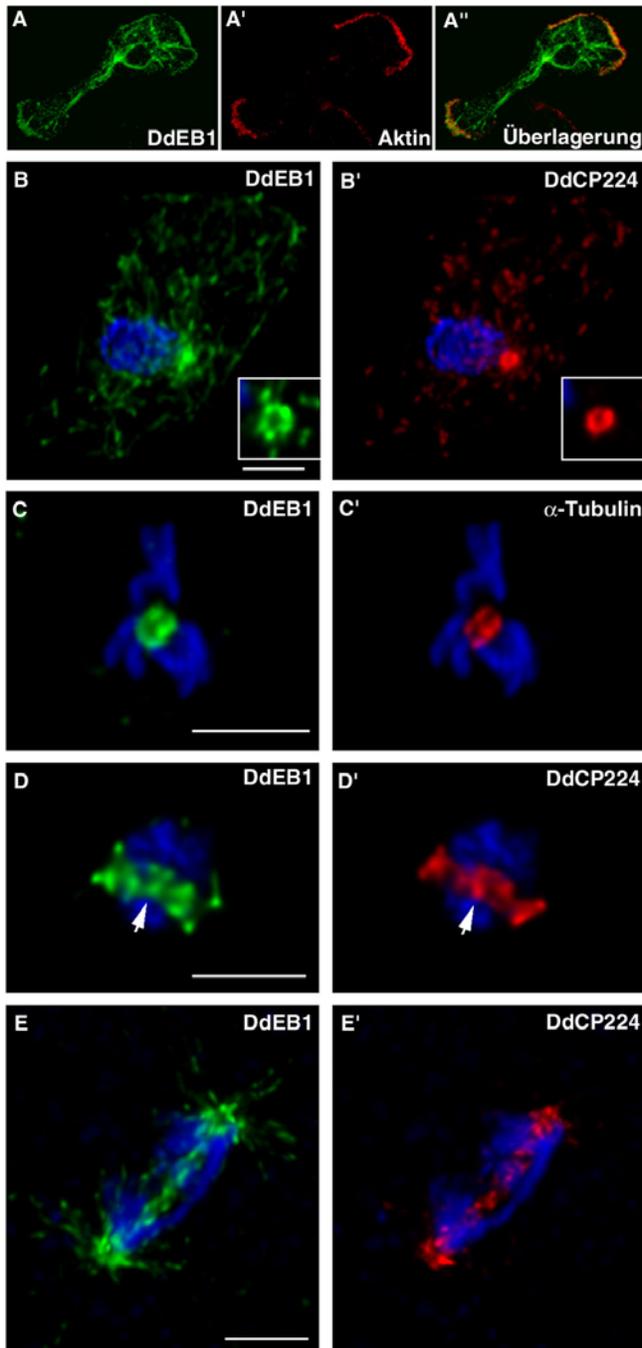


Abbildung 7: Zellzyklus-abhängige Lokalisation von DdEB1. DdEB1 (A), das mit einem anti-*Dictyostelium*-Aktin Antikörper (Simpson *et al.*, 1984) markiert wurde, colokalisierte mit Aktin an Pseudopodien (A'). In (A'') ist die Doppelfärbung dargestellt. Die abgebildeten Zellzyklusstadien sind Interphase (B), Prophase (C), Metaphase (D) und der Übergang zwischen Anaphase und Telophase (E). Die Gegenfärbung wurde mit dem monoklonalen anti-DdCP224 Antikörper 4/148 (Gräf *et al.*, 1999) (B', D', E') bzw. mit dem monoklonalen anti- α -Tubulin Antikörper YL1/2 (C') durchgeführt. Die Pfeile in (D) und (D') markieren die Kinetochoren, die durch die DdCP224-Färbung charakterisiert sind. DNA (blau) wurde mit TOPRO3 gefärbt. Alle Bilder sind maximale Intensitätsprojektionen konfokaler Bilderstapel (Leica TCS NT) nach Dekonvolution mit der Ausnahme von (A-A'') und den "Insets" in (B, B'), die eine einzelne konfokale Ebene zeigen. Die "Insets" zeigen die Ringform von Interphase-Centrosomen. Methanol-Fixierung; Maßstab, 2 μ m.

Zur Untersuchung der subzellulären Lokalisation durch Immunfluoreszenzmikroskopie wurden polyklonale Antikörper gegen DdEB1 hergestellt. Zur Immunisierung wurde ein bakteriell exprimiertes Fusionsprotein aus DdEB1 und dem Maltose-bindenden-Protein (MBP) verwendet (Zur Antikörperspezifität vgl. Abbildungen 13 A und 16 C). In Interphase-Zellen war die DdEB1-Markierung an den Mikrotubulienden und am Centrosom am deutlichsten (Abbildung 7 A und B). Darüber hinaus lokalisierte DdEB1 auch entlang der Mikrotubuli und am Zellcortex von Pseudopodien, wo eine Colokalisation mit Aktin auftrat (Abbildung 7 A). In mitotischen Zellen konnte DdEB1 entlang der Spindel, an den Spindelpolen und in der Kinetochorenregion lokalisiert werden (Abbildung 7 C-E). Diese Lokalisationen konnten in Mutanten, die ein GFP-DdEB1-Fusionsprotein exprimierten, bestätigt werden (Abbildung 8 und 11 A).

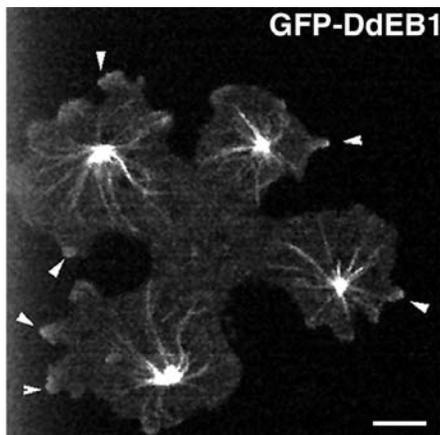


Abbildung 8 und Film_Abb8.mov: Lokalisation von GFP-DdEB1. Konfokale Aufnahme (Perkin-Elmer Ultraview) einer Zelle während der Cytokinese, die die Lokalisation von GFP-DdEB1 am Centrosom, entlang der Mikrotubuli und an den Rändern wachsender Pseudopodien (Pfeile) zeigt. Maßstab, 2 μm .

3.1.2.2 DdEB1 ist ein integraler Bestandteil der centrosomalen Corona

Das Centrosom wurde von den anti-DdEB1 bzw. den anti-DdCP224 Antikörpern als ringförmige Struktur gefärbt. Dies zeigte die konfokale Immunfluoreszenzmikroskopie an AX2-Kontrollzellen (Abbildung 7 B). Die dreilagige Zentralstruktur des *Dictyostelium* Centrosoms ist von einer Matrix (Corona) mit den Mikrotubuli-Nukleationszentren umgeben (Moens, 1976). Wird die Corona mit spezifischen Antikörpern gefärbt, erscheint sie in konfokalen Schnitten als ringförmige Struktur (Gräf *et al.*, 1998) (Abbildung 7, B und B'; Abbildung 9, A und A'). Die Colokalisation von DdEB1 mit DdCP224, einem bekannten Bestandteil der centrosomalen

Corona (Gräf *et al.*, 2000b), wurde in einem Fluoreszenz-Intensitätsprofil genauer analysiert (Abbildung 9). Der Auftrag der Fluoreszenzintensitäten entlang einer Linie durch das Zentrum des Centrosoms ergab zwei Maxima, deren Abstand mit dem Durchmesser der Corona übereinstimmt (Abbildung 9 A''). Die Position der Maxima zeigte, dass DdEB1 etwas weiter distal als DdCP224 lokalisiert ist. Diese Ergebnisse legten den Schluss nahe, dass auch DdEB1 ein integraler Bestandteil des *Dictyostelium* Centrosoms ist. Um eine durch Mikrotubuli-vermittelte Lokalisation am Centrosom auszuschließen wurden Wildtypzellen mit 30 μM Nocodazol behandelt. Diese Behandlung führte zu einer nahezu vollständigen Deassemblierung des Mikrotubuli-Cytoskeletts, hatte aber keinen Einfluss auf die centrosomale Lokalisation von DdEB1 (Abbildung 10 A). Damit konnte ausgeschlossen werden, dass DdEB1 permanent über Mikrotubuli-minus-End-gerichtete Transportprozesse aus der Peripherie zum Centrosom gebracht wird. Da die Nocodazolbehandlung in *Dictyostelium* nicht zu einer vollständigen Deassemblierung des Mikrotubuli-Cytoskeletts führt, wurde die DdEB1-Lokalisation an isolierten Centrosomen, die aufgrund der Präparationsmethode frei von $\square\square\square\square\square\square\square\square\square$ sind (Gräf *et al.*, 1998), analysiert. DdEB1 findet sich an isolierten Centrosomen (Abbildung 10 B). Somit konnte gezeigt werden, dass DdEB1 ein integraler Bestandteil der centrosomalen Corona ist.

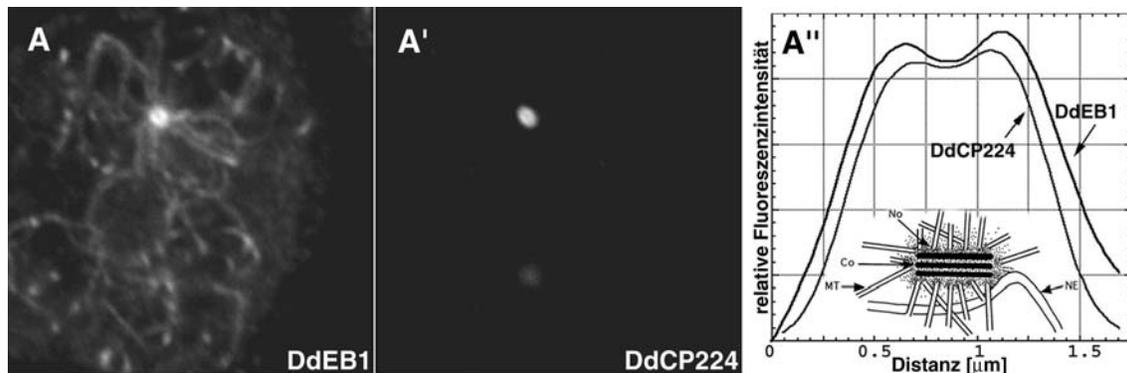


Abbildung 9: DdEB1 ist ein Bestandteil der centrosomalen Corona. Konfokale Aufnahme (Zeiss 510Meta) einer Zelle markiert mit dem anti-DdEB1 Antikörper (A) und dem anti-DdCP224 Antikörper 4/148 (A'). (A'') Ein Fluoreszenz-Intensitätsprofil entlang einer Linie durch das Zentrum des Centrosoms ergab zwei Maxima mit einer Distanz, die dem Durchmesser der Corona, welche die centrosomale Zentralstruktur umgibt, entspricht (Inset). Der Plot zeigt, dass DdEB1 (obere Linie) etwas weiter distal von der bekannten Corona-Komponente DdCP224 (untere Linie) lokalisiert ist. Methanol-Fixierung.

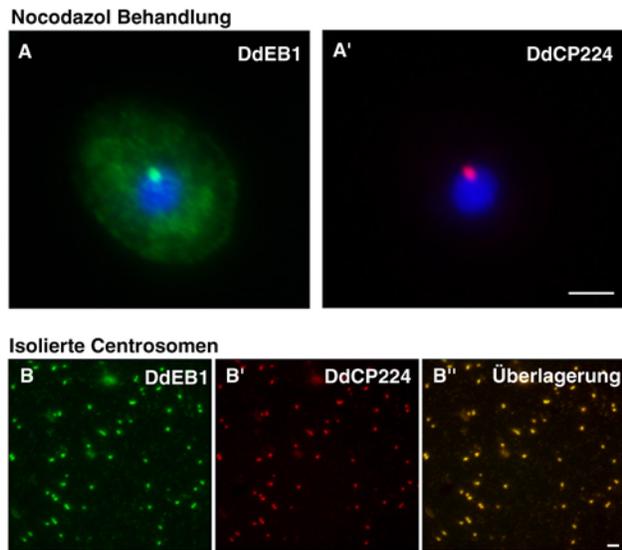


Abbildung 10: Die centrosomale Lokalisation von DdEB1 ist unabhängig von Mikrotubuli. (A) 2 h Inkubation mit 30 μ M Nocodazol hat keinen Einfluss auf die centrosomale Färbung durch DdEB1 Antikörper. (B), DdEB1 ist ein Bestandteil isolierter Centrosomen. Die Centrosomen wurden mit dem monoklonalen anti-DdCP224 Antikörper 4/148 (A', B') gegengefärbt. Die DNA wurde mit DAPI gefärbt (blau). Methanol-Fixierung; Maßstab 2 μ m.

3.1.3 Die DdEB1 Mikrotubuli-Bindung benötigt die „coiled-coil“-Domäne

3.1.3.1 Analyse der Domänenstruktur von DdEB1 durch Expression von GFP-DdEB1-Deletionsmutanten

Die strukturellen Determinanten, die für die Mikrotubuli-Bindung von DdEB1 verantwortlich sind, wurden durch Expression von GFP-DdEB1 Deletionskonstrukten in *Dictyostelium* Mutanten untersucht. Zwei strukturelle Komponenten wurden analysiert, eine N-terminale Mikrotubuli-Bindungsstelle und eine C-terminale „coiled-coil“-Domäne. Die Mikrotubuli-Bindungsstelle wurde von Juwana *et al.* (1999) für die hoch konservierte N-terminale Region des humanen EB1 vorgeschlagen. Aufgrund von Sequenzvergleichen zwischen verschiedenen EB1-Homologen und der Analyse von Deletionskonstrukten konnte die Mikrotubuli-Bindungsstelle auf den Bereich zwischen Aminosäure 79-134 eingengt werden. Die Präsenz dieser Mikrotubuli-Bindungsstelle bei DdEB1 wurde mit Hilfe der N-terminalen DdEB1-Deletionsmutante (DdEB1 Δ 129N), der die ersten 128 Aminosäuren fehlen, bestätigt. Das GFP-DdEB1 Δ 129N-Protein konnte nicht an den Mikrotubuli oder Mikrotubuli-plus-Enden nachgewiesen werden, die centrosomale Lokalisation blieb jedoch unverändert bestehen (Abbildung 11 B).

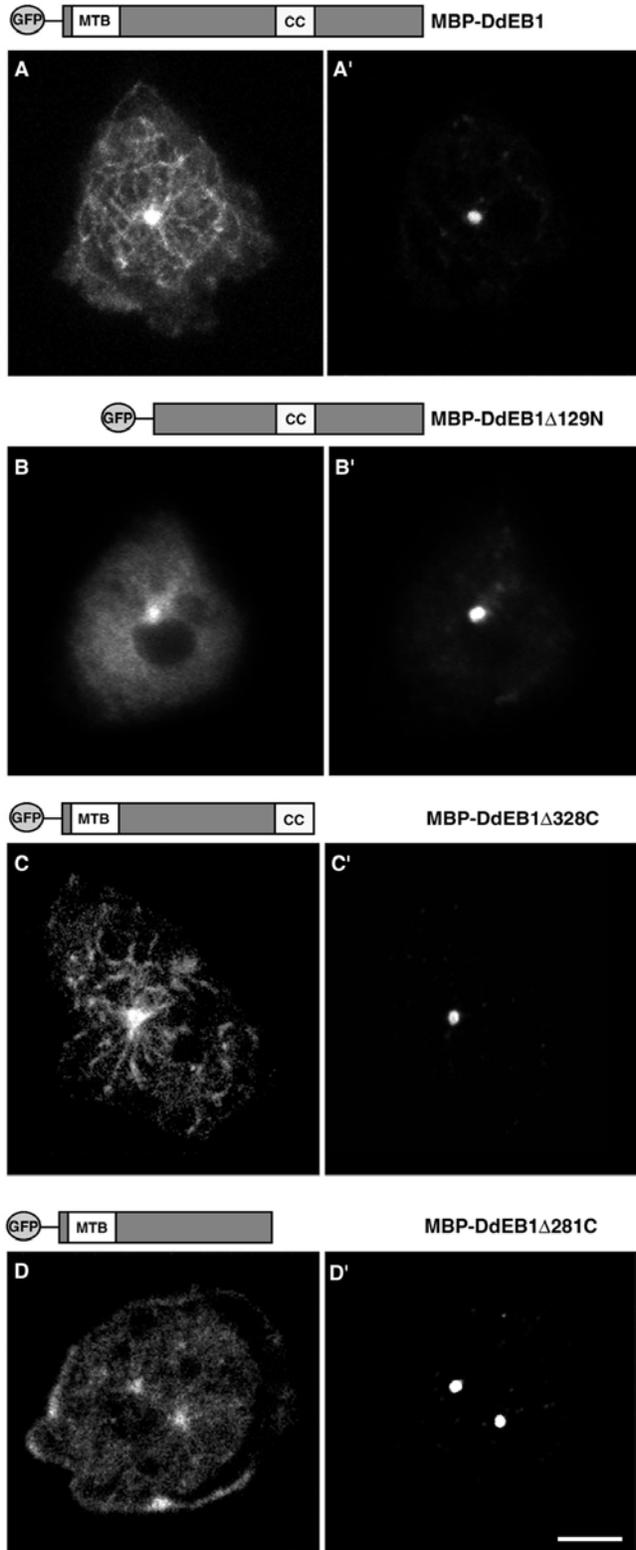


Abbildung 11: Die DdEB1 Mikrotubuli-Bindung hängt von der Anwesenheit der „coiled-coil“-Domäne ab. DdEB1 und seine Deletionsmutanten wurden als GFP-Fusionsproteine exprimiert. (A-D) GFP Fluoreszenz; ein Schema der jeweiligen Mutante ist über jedem Bild dargestellt. (A'-D') Die Centrosomen wurden mit dem monoklonalen anti-DdCP224 Antikörper 4/148 gegengefärbt. Die Zelle in (D) besitzt zwei Zellkerne. Solche mehrkernigen Zellen finden sich mit der gleichen Häufigkeit bei den Mutanten und in axenisch wachsenden *Dictyostelium* Kulturen. Abkürzungen: MTB, Mikrotubuli-Bindungsdomäne; CC, „Coiled-coil“. Methanol-Fixierung; Maßstab 2µm.

Im Gegensatz dazu hatten C-terminale Deletionen jenseits der für alle bekannten EB1-Proteine vorhergesagten „coiled-coil“-Domäne (DdEB1Δ328C) keinen Einfluss auf die DdEB1-

Lokalisation (Abbildung 11 C). Zusätzlich wurden die längeren GFP-Fusionsproteine GFP-DdEB1 Δ 482C und GFP-DdEB1 Δ 431C exprimiert, die ebenfalls keine veränderte Lokalisation aufwiesen (Daten nicht gezeigt). Die Expression einer Mutante, bei der zusätzlich die “coiled-coil”-Domäne deletiert war (DdEB1 Δ 281C), zeigte jedoch eine interessante Änderung der Lokalisation. Das GFP-Fusionsprotein war weder entlang der Mikrotubuli noch an den Mikrotubulenden zu finden, während die Lokalisation am Centrosom und am Zellcortex erhalten blieb (Abbildung 11 D). Somit trägt die “coiled-coil”-Domäne ebenfalls zur Assoziation von DdEB1 mit den Mikrotubuli bei. Da “coiled-coil”-Domänen intermolekulare Wechselwirkungen vermitteln, deuten die Ergebnisse darauf hin, dass die Mikrotubuli-Bindung von DdEB1 von der Assoziation mit einem zweiten DdEB1 Molekül, bzw. einem anderen Bindungspartner abhängt. Da von EB1-Proteinen bekannt ist, dass diese direkt an Mikrotubuli binden (Juwana *et al.*, 1999; Schwartz *et al.*, 1997), erschien die zweite Hypothese sehr unwahrscheinlich.

3.1.3.2 Analyse der „coiled-coil“-Domäne durch Expression von MBP-DdEB1 Deletionen

Um die Notwendigkeit der “coiled-coil”-Domäne für eine Homo-Oligomerisierung zu untersuchen, wurden einige der oben beschriebenen GFP-DdEB1-Deletionsmutanten als

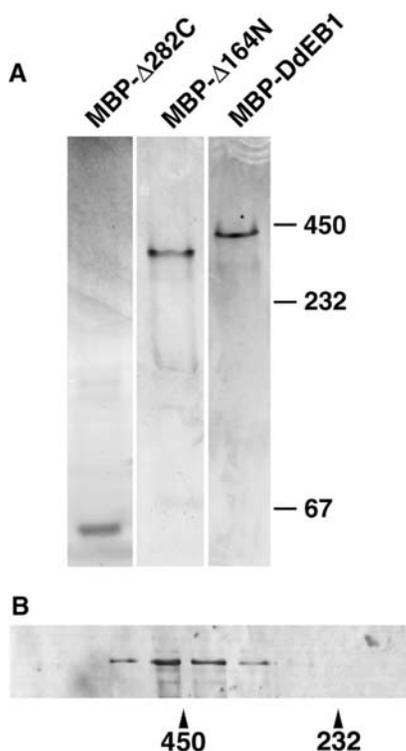


Abbildung 12: Die “coiled-coil”-Domäne ist für die Homo-Oligomerisierung notwendig.

(A), Größenbestimmung von MBP-DdEB1 und seiner Deletionsmutanten durch native Polyacrylamid-Gradientengelelektrophorese. (B), Größenbestimmung von MBP-DdEB1 durch Gelfiltration. Die Zahlen entsprechen den Molekulargewichten von Standardproteinen in kDa.

entsprechende MBP-Fusionsproteine in *E. coli* exprimiert. Die Größenanalyse der aufgereinigten MBP-DdEB1-Deletionsmutanten wurde mittels nativer Gradientengelelektrophorese durchgeführt. Diese zeigte, dass Volllängen-MBP-DdEB1 (~100 kDa) und die N-terminal verkürzte Mutante MBP-DdEB1 Δ 129N (~85 kDa) ein Wanderungsverhalten aufwiesen, das dem eines Homotetramers entsprach. Die beiden Fusionsproteine wiesen Molekulargewichte von ~400 kDa bzw. ~340 kDa auf (Abbildung 12A). Im Gegensatz dazu wies die C-terminal verkürzte Mutante MBP-DdEB1 Δ 281C, der die C-terminale Region einschließlich der “coiled-coil”-Domäne fehlte, mit einem Molekulargewicht von ~73 kDa, die elektrophoretische Mobilität eines Monomers auf (Abbildung 12 A). Diese Resultate wurden durch eine Größenbestimmung mittels Gelfiltration bestätigt. MBP-DdEB1 wurde in den Fraktionen gefunden, die einem Molekulargewicht von ~450 kDa entsprachen (Abbildung 12 B). Damit konnte gezeigt werden, dass die “coiled-coil”-Domäne für eine Homotetramerisierung und für die Mikrotubuli-Bindung von DdEB1 notwendig ist.

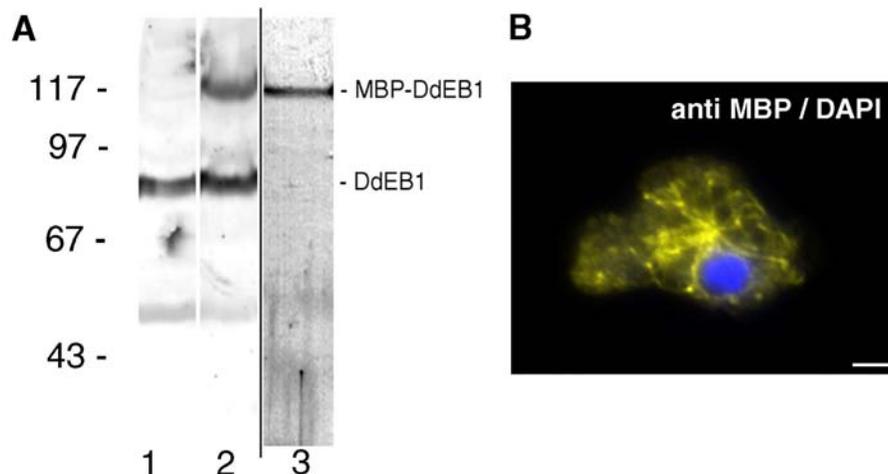


Abbildung 13: MBP-DdEB1 wird funktionsfähig exprimiert. (A; Spur 1,2) Immundetektion; Cytosolische *Dictyostelium* Zellextrakte wurden aus Wildtypzellen (Spur 1) und den MBP-DdEB1-Mutanten (Spur 2) präpariert und mit dem polyklonalen anti-DdEB1 Serum gefärbt. Das endogene DdEB1 ist in Spur 1 bei ca. 75 kDa sichtbar. In Spur 2 ist zusätzlich bei ca. 115 kDa das MBP-DdEB1-Fusionsprotein sichtbar. (A; Spur 3) Coomassie-Färbung; Das MBP-DdEB1-Fusionsprotein konnte über Amyloseharz aus cytosolischen Extrakten aufgereinigt werden. In jeder Spur wurden ca. 20 µg Protein aufgetragen. Die Zahlen entsprechen den Molekulargewichten in kDa. (B) Das MBP-DdEB1-Fusionsprotein zeigt dieselbe Lokalisation wie endogenes DdEB1 (vgl. Abbildung 7). Die MBP-DdEB1-Mutanten wurden mit einem affinitätsgereinigten polyklonalen anti-MBP Antikörper (Gräf, 2001a) gefärbt (gelb); DNA-Färbung mit DAPI (blau). Methanol-Fixierung; Maßstab, 2 µm.

3.1.4 DdEB1 interagiert mit DdCP224 und Dynein

3.1.4.1 DdEB1 und DdCP224 colokalisieren an Mikrotubulienden und sind Bestandteil desselben cytosolischen Komplexes

Von EB1-Proteinen als auch XMAP215-Homologen, zu denen DdCP224 zählt, wird angenommen, dass sie die Mikrotubulidynamik durch ihre Bindung an Mikrotubuli-plus-Enden regulieren. Im Gegensatz zu EB1 konnte jedoch bisher für kein XMAP215-Homologes eine Mikrotubuli-plus-End-Lokalisation nachgewiesen werden. In fixierten *Dictyostelium* Präparaten, die mit den Antikörpern gegen DdEB1 und dem monoklonalen anti-DdCP224 Antikörper 4/148 (Gräf *et al.*, 1999) gefärbt wurden, konnte eine klare Colokalisation beider Proteine gezeigt werden, bei der DdCP224 etwas weiter distal als DdEB1 lokalisiert war (Abbildung 14 A-A’’).

DdEB1 und DdCP224 colokalisierten nicht nur, sie sind auch Bestandteil desselben cytosolischen Komplexes. DdCP224 konnte aus cytosolischen Extrakten von MBP-DdEB1-Mutanten (Abbildung 13) zusammen mit an Amyloseharz gebundenem MBP-DdEB1 spezifisch coimmunpräzipitiert werden (Abbildung 14 B). Das Maltose-bindende-Protein ist bei *Dictyostelium* ein geeignetes Fusions-“Tag” für mikroskopische und biochemische Analysen (Abbildung 13) (Gräf, 2001a). Diese so gefundene Interaktion konnte durch Coimmunpräzipitation von DdEB1 mit DdCP224 bestätigt werden. Dabei wurde das endogene DdEB1-Protein mit dem an NHS-Sepharose immobilisierten monoklonalen anti-DdCP224 Antikörper 4/148 aus cytosolischen Extrakten von Wildtypzellen coimmunpräzipitiert (Abbildung 14 B).

Zu einem späteren Zeitpunkt stand ein polyklonaler anti-DdCP224 Antikörper, der den N-Terminus von DdCP224 erkennt (anti-DdCP224Hind, unpublizierte Arbeit von Ralph Gräf) zur Verfügung. Dieser polyklonale Antikörper eignete sich besser für die Immunpräzipitationsexperimente. So konnte mit Hilfe dieses Antikörpers und Protein G Sepharose als Matrix DdEB1 aus cytosolischen *Dictyostelium* Wildtyp-Zellextrakten präzipitiert werden. Auch das reverse Experiment, die Coimmunpräzipitation von DdCP224 und DdEB1 mit Hilfe von anti-DdEB1 Antikörpern, wurde erfolgreich durchgeführt (Abbildung 15).

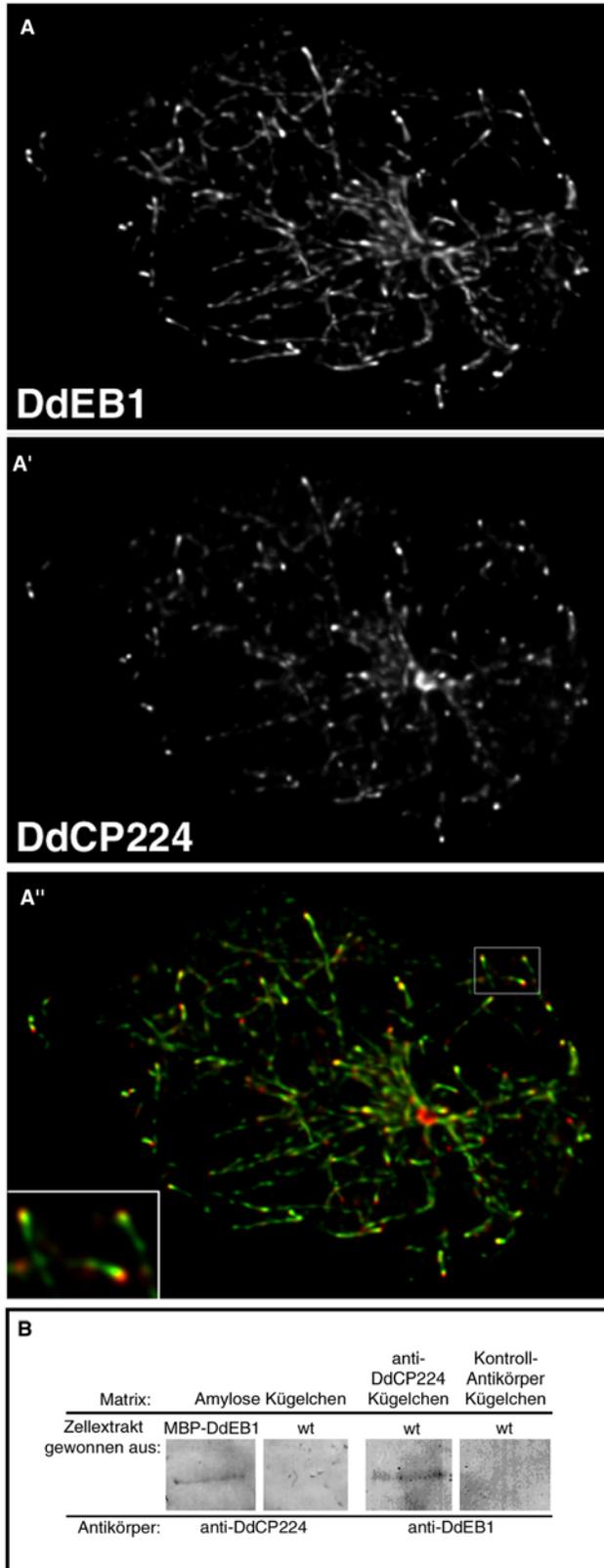


Abbildung 14 und Film_Abb14.mov: DdEB1 interagiert und colokalisiert mit DdCP224.

(A-A'') Colokalisation von DdEB1 und DdCP224 an den Mikrotubulienden. Wildtyp (AX2) *Dictyostelium* Zellen wurden mit dem anti-DdEB1 Antikörper (A) und dem monoklonalen anti-DdCP224 Antikörper 4/148 (A') gefärbt. Das "Inset" in der Doppelfärbungsdarstellung (A'') ist eine Vergrößerung des Ausschnitts aus dem markierten oberen rechten Bildteil. Die Bilder sind Projektionen (max. Int. Modus) konfokaler Bilderstapel (Leica TCS NT) nach Dekonvolution. Methanol-Fixierung. (B) Coimmunpräzipitation von DdEB1 und DdCP224 aus cytosolischen *Dictyostelium* Extrakten von MBP-DdEB1-Mutanten bzw. AX2-Kontrollzellen. Die Copräzipitate wurden auf 12.5 % Acrylamidgele geladen und nach der Elektrophorese geblottet. Die zur Präzipitation benutzte Matrix ist oben angegeben; die für die Immundetektion verwendeten Antikörper sind unter der Abbildung angegeben. Bei dem Kontrollantikörper-Harz handelt es sich um kovalent gekoppelte anti- γ -Tubulin Antikörper (Euteneuer *et al.*, 1998).

3.1.4.2 DdEB1 interagiert mit der intermediären Dyneinkette (DIC) und der schweren Dyneinkette (DHC)

DdEB1 wurde auch auf eine mögliche Interaktion mit der intermediären Dyneinkette und der schweren Dyneinkette hin untersucht, da die intermediäre Dyneinkette aufgrund ihrer Lokalisation am Centrosom (diese Arbeit; Abbildung 28) und an den Mikrotubulienden (Ma und Chisholm, 2002) eine Komplexbildung mit DdEB1 wahrscheinlich erscheinen ließ. Auch die Rolle von Dynein (DIC und DHC) bei der räumlichen Organisation der Interphase-Mikrotubuli und der Centrosomenseparation (Koonce *et al.*, 1999; Koonce und Samsó, 1996; Ma *et al.*, 1999) ließen diese Annahme zu. Tatsächlich konnte an DIC bzw. DHC gebundenes DdEB1 mit dem anti-DIC Antikörper IC144 (Ma *et al.*, 1999) bzw. dem anti-DHC Antikörper γ 7 (Koonce und Samsó, 1996) aus cytosolischen *Dictyostelium* Zellextrakten spezifisch copräzipitiert werden (Abbildung 15). Ebenso konnte an DdEB1 gebundene DHC mit dem anti-DdEB1 Antikörper coimmunpräzipitiert werden (Abbildung 15).

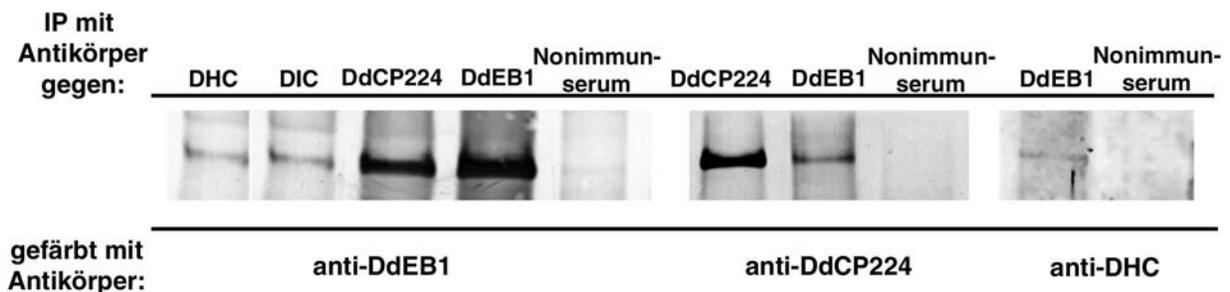


Abbildung 15: DdEB1 interagiert mit DdCP224, der intermediären Dyneinkette (DIC) und der schweren Dyneinkette (DHC). Coimmunpräzipitation von DdEB1 mit DdCP224, DIC und DHC aus cytosolischen *Dictyostelium* Wildtyp-Zellextrakten. Die Copräzipitate wurden auf 12.5 % Acrylamidgele geladen und nach Elektrophorese geblottet. Zur Präzipitation wurde Protein-G Sepharose als Affinitätsmatrix benutzt. Die zur Immunpräzipitation verwendeten Antikörper, polyklonaler anti-DIC Antikörper IC144 (Ma *et al.*, 1999), polyklonaler anti-DHC Antikörper γ 7 (Koonce und Samsó, 1996), polyklonaler anti-DdCP224 Antikörper DdCP224HIND (Ralph Gräf) und der polyklonale anti-DdEB1 Antikörper, sind oben angegeben. Die für die Immundetektion verwendeten Antikörper sind unter der Abbildung angegeben. Als Kontrolle wurde Nonimmunserum verwendet.

3.1.5 Untersuchung der Funktion von DdEB1

3.1.5.1 Herstellung einer DdEB1-Nullmutante

Zur Analyse der zellulären Funktion von DdEB1 wurde eine DdEB1-Nullmutante (*DdEB1Δ*) hergestellt. Dazu wurde ein Vektor konstruiert, in dem die DdEB1 Sequenz durch eine Blastizidin-Kassette disrumptiert war (Abbildung 16 A). Die DdEB1-Gen disruption geschah auf genomischer Ebene sehr effizient, mit einer homologen Rekombinationsrate von ca. 80%. Die DdEB1-Nullmutanten konnten sehr einfach durch ihre fehlende DdEB1-Färbung in der Immunfluoreszenzmikroskopie identifiziert werden (Abbildung 16 B). Nach Klonierung der Zellen wurde das Fehlen von DdEB1 durch Immunfärbung von cytosolischen Extrakten im Western Blot nachgewiesen (Abbildung 16 C).

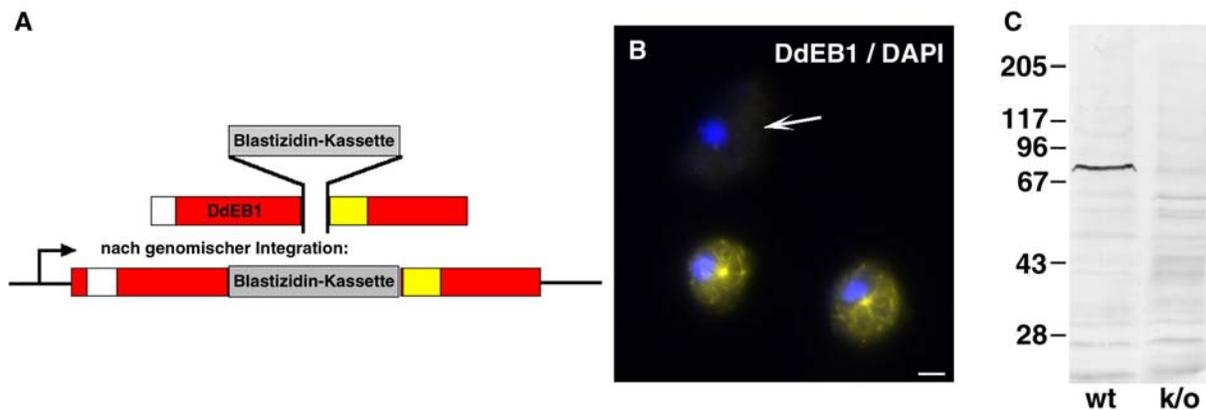


Abbildung 16: Herstellung einer *DdEB1Δ* Mutante. (A) Schema des DdEB1-Gen disruptionskonstrukts und des Zustands nach erfolgter homologer Rekombination. Das DdEB1-Gen ist schematisch in rot dargestellt, die Mikrotubuli-Bindungsdomäne ist weiß und die „coiled-coil“-Domäne gelb markiert. (B) Die DdEB1-Nullmutanten konnten in der Immunfluoreszenzmikroskopie durch die fehlende DdEB1-Färbung, nach Behandlung mit dem anti-DdEB1 Antikörper, identifiziert werden (Pfeil). Die DdEB1-Fluoreszenz ist in gelb, die DNA (DAPI) in blau dargestellt. (C) Die Abwesenheit von DdEB1 in den Nullmutanten ist aus dem Immunoblot ersichtlich. Dabei wurden cytosolische Extrakte aus Wildtypzellen (wt) und *DdEB1Δ*-Mutanten (k/o) aufgetragen und mit dem anti-DdEB1 Antikörper gefärbt. Methanol-Fixierung; Maßstab, 2 μ m.

3.1.5.2 DdEB1 wird zur korrekten Ausbildung der Mitosespindel benötigt

Die DdEB1-Nullmutanten waren lebensfähig und die Ausbildung von Fruchtkörpern verlief normal. Hingegen zeigten die *DdEB1* Δ -Mutanten kurz nach erfolgter Transformation schwere mitotische Defekte. Viele der mitotischen Zellen befanden sich in Prophase- oder Prometaphase-ähnlichen Zellzyklusstadien, die durch kondensierte aber nicht segregierte Chromosomen charakterisiert waren (Abbildung 17). In den meisten Fällen war die Mitosespindel deformiert (Abbildung 17 A) oder fehlte ganz (Abbildung 17 C). Oft waren die Zellkerne mit mehr als einem duplizierten Centrosom assoziiert (Abbildung 17 B und C). Das Auftreten von zusätzlichen kleinen DNA-Massen wies darauf hin, dass die Mutanten nicht zur korrekten Segregation der Chromosomen in der Lage, d.h. aneuploid, waren.

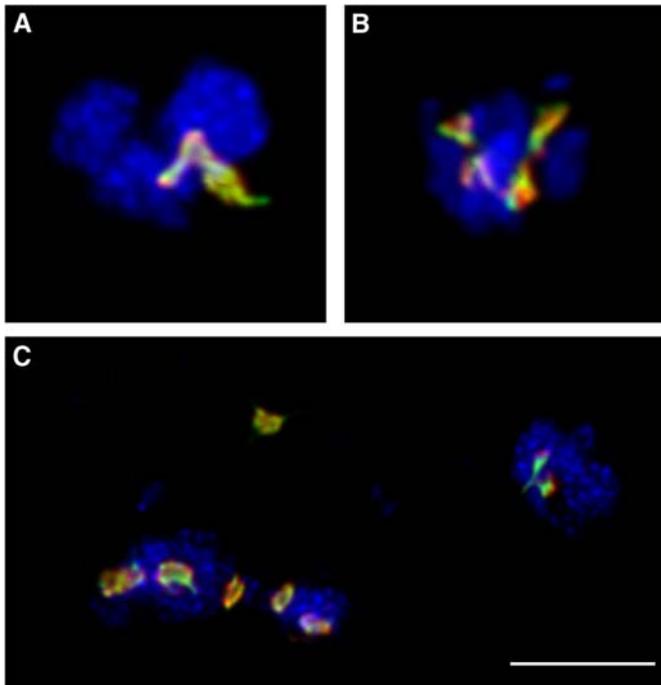


Abbildung 17 und Film_Abb17.mov: DdEB1-Nullmutanten weisen schwere Spindeldefekte auf. (A), (B), und (C) sind Bilder der *DdEB1* Δ /GFP- α -Tubulin-Mutanten ca. zwei Wochen nach Transformation mit dem DdEB1-Gendisruptions-Konstrukt. In jedem Bild sind die Zellkerne einer einzigen Zelle abgebildet. Die GFP-Fluoreszenz ist in grün, die anti-DdCP224 Centrosomenfärbung in rot und die DNA-Färbung, durch TOPRO3, ist in blau dargestellt. Die Bilder sind Projektionen (max. Int. Modus) konfokaler Bilderstapel (Leica TCS NT) nach Dekonvolution. Methanol-Fixierung; Maßstab, 2 μ m.

Mit zunehmender Anzahl an Passagen sank die Anzahl von Zellen mit schweren Mitosedefekten. Dies wurde in drei unabhängigen Transformationen beobachtet. Nach ungefähr 8 Wochen war der *DdEB1* Δ -Phänotyp stabil und im wesentlichen durch eine signifikante Zunahme des prozentualen Anteils der Prometaphase-Zellen unter allen mitotischen Zellen, um den Faktor drei,

ausgezeichnet (Tabelle 2). Wie erwartet war auch die Generationszeit in den *DdEB1Δ*-Mutanten von ca. 8 auf etwa 12 Stunden verlängert.

Tabelle 2. Der Anteil der Prometaphase-Zellen ist in den *DdEB1Δ*-Mutanten erhöht.

	Prophase	Prometaphase	Metaphase	Anaphase	Telophase
DdEB1Δ (n=109)	3 %	37 %	27 %	7 %	27 %
Wildtyp (n=120)	3 %	13 %	43 %	4 %	38 %

Prozentsatz der Zellen in den einzelnen mitotischen Stadien unter allen mitotischen Zellen einer logarithmisch wachsenden *DdEB1Δ* Kultur 8 Wochen nach Transformation und einer Kultur von AX2-Kontrollzellen. Die Verteilung war beim Vergleich von *DdEB1Δ*/GFP- α -Tubulin-Mutanten praktisch identisch (Daten nicht gezeigt).

Der verzögerte oder defekte Übergang von der Prophase zur Prometaphase zeigte sich auch bei der Beobachtung lebender Zellen. Dazu wurden *DdEB1Δ*-Zellen benutzt, die zusätzlich GFP- α -Tubulin exprimierten. Die Expression von GFP- α -Tubulin in *Dictyostelium* Wildtypzellen hat keinen Einfluss auf den Ablauf der Mitose (Kimble *et al.*, 2000; Neujahr *et al.*, 1998). In den GFP- α -Tubulin/*DdEB1Δ*-Mutanten dauerte die Prometaphase oft länger als 8 min verglichen mit 2 min bei Kontrollzellen (Ueda *et al.*, 1999), bis es zur Trennung der Spindelpole und Ausbildung der Spindel kam (Abbildung 18 A). Auch ein Fehlschlag der Spindelbildung konnte beobachtet werden (Abbildung 18 B). In diesem Beispiel wurde zwischen den duplizierten Centrosomen keine Spindel ausgebildet. Als Folge könnte daraus die Ausbildung von vergrößerten Zellkernen, die mit mehr als einem Centrosom assoziiert sind, resultieren (vgl. Abbildung 17). Im Gegensatz dazu ist die Spindelelongation in *DdEB1Δ*-Mutanten nicht betroffen. Falls eine Spindel aufgebaut wurde, verlief ihre Elongation stets normal (Abbildung 18 A).

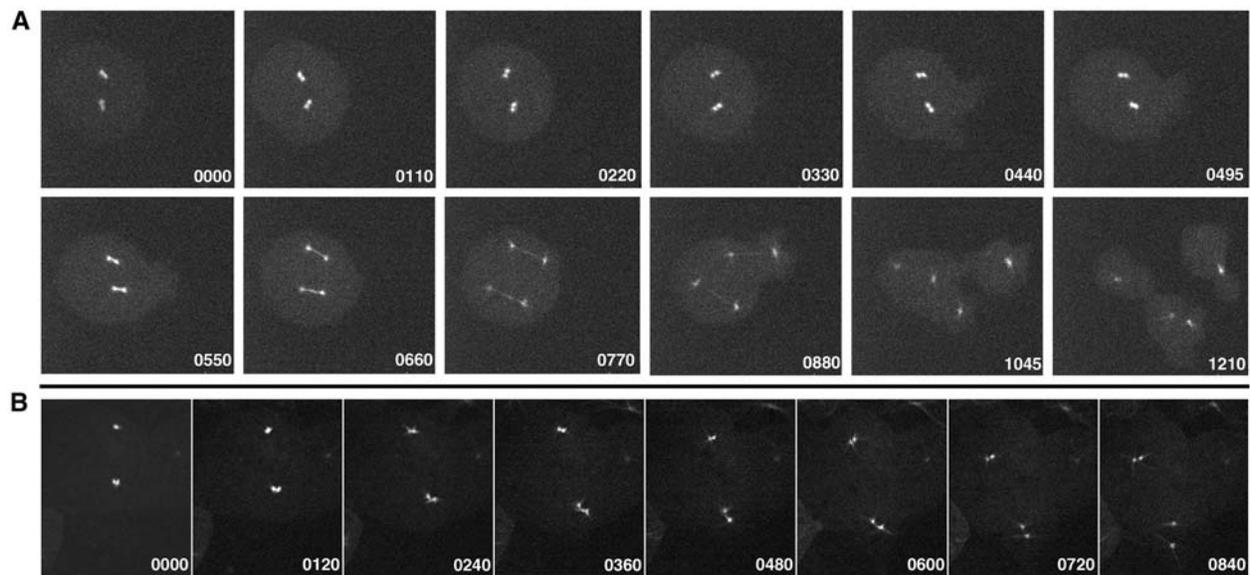


Abbildung 18 und Film_Abb18.mov: *DdEB1Δ*-Mutanten weisen einen defekten oder verzögerten Prometaphase-Übergang auf. 4D-konfokalmikroskopische Lebendzellbeobachtung zweier zweikerniger *DdEB1Δ*/GFP- α -Tubulin-Mutanten unter Agaroverlay (Fukui, 1987). (A) Die Prometaphase dauerte bereits mehr als 8 min an, bevor die Spindelbildung begann (0550 sec). (B) Die Prometaphase ist durch die gerade verdoppelten Centrosomen gekennzeichnet, die noch nicht von einer Spindel getrennt wurden. Die Sequenz zeigt das Fehlschlagen einer Spindelbildung an den beiden verdoppelten Centrosomen. Sichtbar sind einzig kurze astrale Mikrotubuli, die von den Centrosomen auswachsen. Die frisch duplizierten Centrosomen entfernen sich ohne eine dazwischen liegende Spindel etwas voneinander. Die Zeitrafferaufnahmen sind Animationen von z-Stapeln, die aus drei konfokalen Schnitten mit einem Abstand von je 0.5 μm projiziert wurden (max. Int. Modus). Die z-Stapel wurden an einem Perkin Elmer Ultraview Mikroskop mit einem 2 x 2 binning, einer Pause von 2.5 Sekunden zwischen den Stapeln und einer Aufnahmedauer von 500 ms pro Bild aufgenommen.

3.2 Untersuchung von *D. discoideum* Moe1

3.2.1 Klonierung und Sequenzvergleich von DdMoe1

Das *Dictyostelium*-Homologe von *S. pombe* Moe1 (DdMoe1) wurde als potentieller Interaktor von DdEB1 durch eine BLASTN-Suche in der Datenbank des *Dictyostelium*-cDNA-Projekts

DdMoe1	---MSLELNTIKVNPTGWPVVGKLEKFTD--IPYAPFSKCDKIKGCSDWNS-----	46
Moe1	-MATGFKLPELAPVKSAWGPPETEQIGGD-IPYAPFSKCDRLKGIADWSVDQPKDGREQR	58
HsMoe1	--MAKFMTPVLIQDNPSGWPSCAVPEQFRD--MPYQPFKCDRLGKVDWWTG---AT--YQ-	51
CeMoe1	MALPKFELLSLADNTVCGWGLASSSSADPEVPVHQQFNKADRIQGVADWIG---VDRFYRR	57
DdMoe1	-----NVRNYQ-RQNYGSNAFNPETFKLEDDDEDSFTLVVDY---TRVQNKLNKKGKTYQK	97
Moe1	GRQGAFAGRFRDQYQTYGYGASSIFGYQHSEDESSFSVIDRGSVNRTRTSARNGGTLTKV	118
HsMoe1	-----DKRYTN-KYSSQFGGGSQYAFHEEDESSFQLVDT-ARTQKTAYQRNRMRFQR	103
CeMoe1	G-----NBRYNERNVYGSAAAGSQEDYIHGMDEHNFQLVDT-SKPMARNPQRN-FRVRQRM	110
DdMoe1	QFY----QONKRGGG-----NAGGRGRRGG-----MR----GGRFGSNKRYWND	133
Moe1	RGR----GQNVORGGR----GGRYGSSGGRGAGDTTVSRSSGAGGARGRRFG--WK-DYD	167
HsMoe1	NLR----RDKDRRML--QFNLIQLPKSAKQKERERIRLQKK---F-QKQFGVRQK-WDQ	152
CeMoe1	HLRKMMEKENEKREMVNQSTNLRMKRSIAKEQQRAFQKMWQRRGNARQQRGQGR-FGG	169
DdMoe1	RRQRNRESSTIEIGSSWESKEEFDLSTFKQYTVQLPEPETIG--TYGQWKYKYNKVYDRIN	191
Moe1	KHQRLRNASVTVGDDWQLLDEVEFSLHSLKLNLAAP---VTVDSYGYIIPYDKSFDKIH	224
HsMoe1	KSQKPRDSSVEVRSDWEVKEEMDFPQLMKMRYLEVSEPDII--ECCGALYYDKAFDRIT	210
CeMoe1	DRPKERLPSVQVRPEWVVLSEEMLSAFSLKALPNIPGGDDIGDHQYGSLSQYYDKTIDRVS	229
DdMoe1	AKNEKKLQKTENSVPLIPTSDDKVRSEYMN--GNVYATDSILAVLMSAQKSVYSWDIVV	249
Moe1	VKSEKPLQALDRVHYNPTTETDPVIQKLALNSDANIFLTDLSLMLCSTRSVYPWDIVV	284
HsMoe1	TRSEKPLRSIKRIFHTVTITDDPVIRKLAKT-QCNVAFATDAILATLMCSTRSVYSWDIVV	269
CeMoe1	VKNSIPLQRCAGVFYINVITTEDPVIQELAQGGAGNVECTDILLATLMTAPRSVYSWDIVA	289
DdMoe1	QKVGARLFFELRPGTS-----EHLTVNENLTAHQDDKD--PINTTSSLSQEAQVNLNY	302
Moe1	TEQSGKLFDFKREGGP----FDYLTVNEINAYDSPMDADNREGVNSPGALSVEATYINQNF	340
HsMoe1	QRVGSKLFDFKRDNSD----FDLLTVSETANEPPEQDEGN--SPNSPRNLAMEATYINQNF	323
CeMoe1	YRVGDKLFFDKRNRTRDILNPVELTIVSETSAEPPSFDGN--GINNAKDLATEAFYINQNF	347
DdMoe1	WQQVLSQNVPEPKFDNELP--EGDEFEN-CVDVGYAYKKWDLGDDIV----VLARTEI	353
Moe1	CVQALRETEEEKYKLPHPNPFYNSKEQSEPLAAHGVIYRDVDLSLETDEKPKVLMVRTEV	400
HsMoe1	SQQCLRMGKE-RYNEFPNPNPFVDDMDKNEIASVAYRYRWRKLGDDID----LIVREH	377
CeMoe1	RRQVVKRNDAGTEFKNARAPFDEETGE--SGTAYKYRKNWLNQNGVDGKPVLEVCRTEL	404
DdMoe1	DGVVEGLPQPPKFLSIKAINEDSNRF---G-IEFRKLDLDSQRAAILATEIKNNSIKFA	409
Moe1	DGYVKNPAN-DVQYISIKALNEYDPKFTNVTGSDWRSKLESQRGAVFATEMKNNSCKLA	459
HsMoe1	DGVMTGANG-EVSFINIKTLNEWDSRHC---NGVDWRQKLDLDSQRAAVIATELKNNSYKLA	433
CeMoe1	DGVIHGLGN-ETQTLTIKAFNEWDSTQS---GVDWRQKLDVQKCAVMATEIKNNSAKVA	460
DdMoe1	KWSIQSTLAGCEMLNLGFVSRDSIRDNNNHVILGTQFYPAVADLNKQNGVDMKNQWGLKH	469
Moe1	RWIVEALLAGVDSMKVGFVSRSNARDAQHGGILGVVAYKPADLASQMNLSLNGWGIVRT	519
HsMoe1	RWICCALLAGSEYLLKGVVSRVHVKDSRHRVILGTQQFKPNEFASQINLSVENAWGILRC	493
CeMoe1	KWILQALLAGSDIMKLGIVSRNNARSTONHSILLTQYVKPTEFASNIALNMDNCGWILRC	520
DdMoe1	IACITCMKLANGKYLHHRDPNRNVINLYSPENAFDQIEEETOEEEEEQSKGWVEESRE	528
Moe1	IADVCLKMPDGKYLKDPNRPILRLYSVPPNFEAAAGPSLEASSTA-----	567
HsMoe1	VILDICMKLEEKGYLKDPNKQVIRVYSLPDGTFSSDEDEEEEEEEEEEEEEET----	548
CeMoe1	VILDICMKQKPKYLLMKDPOSPVIRLYSLPEGTFESERESSDEENSDDDQ-----	570

Abbildung 19: Paarweiser Sequenzvergleich von DdMoe1 mit seinen Homologen aus *S. pombe* (Moe1), Mensch (HsMoe1) und *C. elegans* (CeMoe1), durchgeführt mit dem „gap alignment“ Programm (GCG). Identische Aminosäuren sind schwarz, ähnliche dunkelgrau bzw. hellgrau hinterlegt.

identifiziert (Universität Tsukuba, Japan; Klon SLG776). Dieser cDNA-Klon enthielt die komplette kodierende DdMoe1 Sequenz mit 1584 bp, die für ein Protein mit einem berechneten Molekulargewicht von 60,2 kDa kodiert. Der paarweise Sequenzvergleich von DdMoe1 mit den bisher bekannten Moe1-Proteinen aus *S. pombe*, Mensch und *C. elegans* zeigte einen sehr hohen Konservierungsgrad mit einer Aminosäure-Identität von 39,7 %, 42,2 % bzw. 39,5 % zu den jeweiligen Homologen (Abbildung 19). Sowohl die *C. elegans*, als auch die menschliche Sequenz sind identisch zu der jeweiligen Sequenz der Untereinheit 7 des eukaryotischen Translations-Initiationsfaktors 3 (eIF-3 zeta). Für beide Proteine wurde gezeigt, dass sie Moe1 in einer Moe1-Nullmutante funktionell ersetzen können (Chen *et al.*, 1999).

3.2.2 Untersuchung der subzellulären Lokalisation von DdMoe1

3.2.2.1 Herstellung eines MBP-DdMoe1-Fusionsproteins und polyklonaler Antikörper

Zur Expression in *E. coli* wurde die gesamte DdMoe1 Sequenz in den pMALc2 Vektor kloniert. Das resultierende N-terminale MBP-DdMoe1-Fusionsprotein wurde nach seiner Aufreinigung (Abbildung 20 A) zur Immunisierung und Erzeugung polyklonaler Antikörper benutzt. Diese erkannten in cytosolischen *Dictyostelium* Extrakten spezifisch eine Bande bei ca. 73 kDa (Abbildung 20 B).

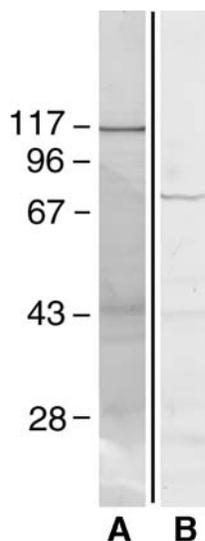


Abbildung 20: MBP-DdMoe1 wurde in *E. coli* exprimiert, aufgereinigt und zur Herstellung von polyklonalen Antikörpern verwendet. (A) Das affinitätschromatographisch an Amyloseharz aufgereinigte MBP-DdMoe1-Fusionsprotein weist ein Molekulargewicht von ca. 116 kDa auf (Coomassie-Färbung; MBP = 43 kDa, DdMoe1 = ca. 73 kDa). Das Protein wurde zur Immunisierung von zwei Kaninchen verwendet. (B) Polyklonale Antikörper gegen rekombinantes MBP-DdMoe1 erkennen spezifisch eine Bande von ca. 73 kDa in cytosolischen *Dictyostelium* Extrakten. Die Zahlen entsprechen den Molekulargewichten in kDa.

3.2.2.2 DdMoe1 lokalisiert entlang von Mikrotubuli und ist ein Bestandteil des Centrosoms

Zur Untersuchung der subzellulären Lokalisation wurden die polyklonalen anti-DdMoe1 Antikörper für die Immunfluoreszenzmikroskopie verwendet.

Die DdMoe1-Markierung befand sich in Interphase-Zellen entlang der Mikrotubuli und am Centrosom (Abbildung 21 A). In mitotischen Zellen war DdMoe1 entlang der Spindel und an den

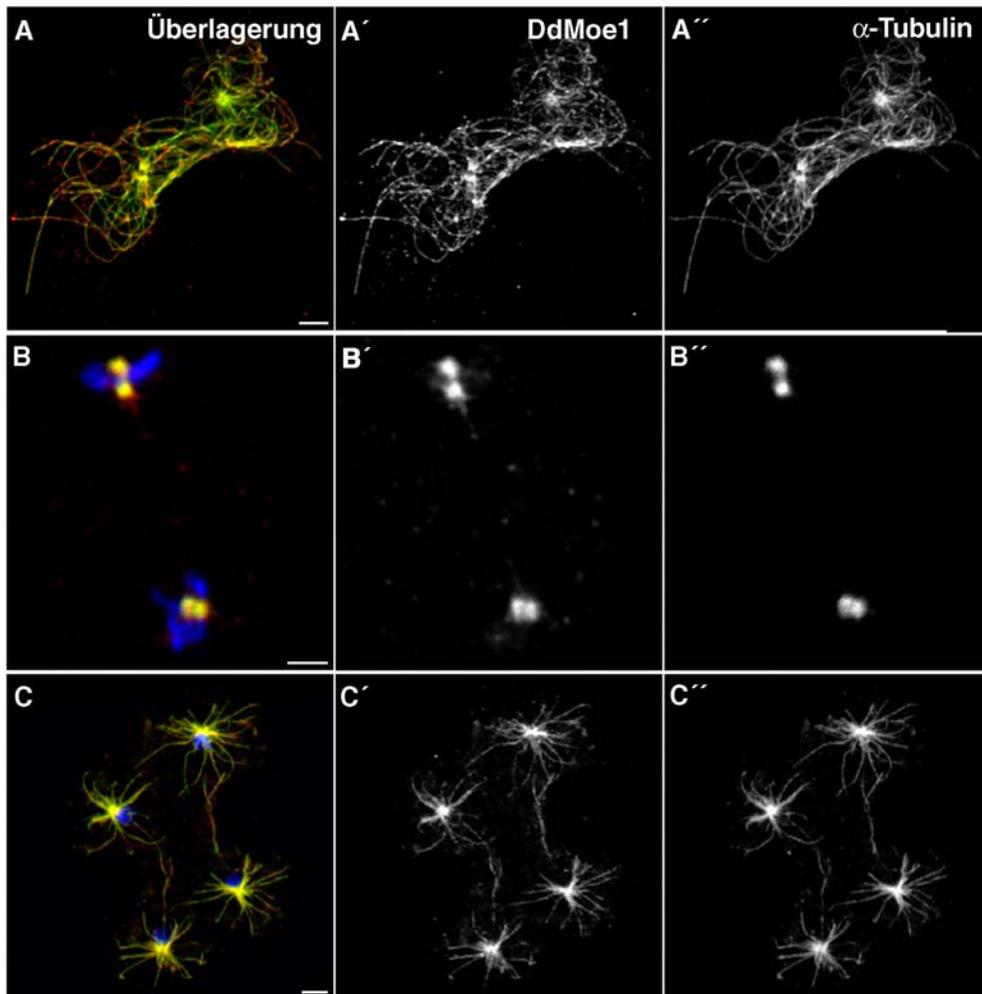


Abbildung 21: Zellzyklus-abhängige Lokalisation von DdMoe1. DdMoe1 colokalisierte während aller Zellzyklusstadien mit α -Tubulin, das mit dem monoklonalen anti- α -Tubulin Antikörper YL1/2 markiert wurde. Die abgebildeten Zellzyklusstadien sind Interphase (A), Prometaphase (B) und Telophase (C). In (B) sind beide Metaphasespindeln einer dinukleären Zelle gezeigt. In der Überlagerung ist DdMoe1 rot, α -Tubulin grün, DNA blau (TOPRO3-Färbung) dargestellt. Alle Bilder sind Projektionen (max. Int. Modus) konfokaler Bilderstapel (Zeiss LSM510Meta). Glutaraldehyd-Fixierung; Maßstab, 2 μ m.

Spindelpolen lokalisiert (Abbildung 21 B und C). DdMoe1 ist also während des gesamten Zellzyklus an den Mikrotubuli und dem Centrosom bzw. den Spindelpolen zu finden.

Um die in Ganzzellpräparaten gefundene centrosomale Lokalisation von DdMoe1 näher zu untersuchen, wurden isolierte Centrosomen, die aufgrund der Präparationsmethode frei von Mikrotubuli sind (Gräf *et al.*, 1998), mit dem polyklonalen anti-DdMoe1 Antikörper gefärbt. Aufgrund der centrosomalen DdMoe1-Färbung an diesem Präparat (Abbildung 22) kann eine Mikrotubuli-vermittelte centrosomale Lokalisation von DdMoe1 ausgeschlossen werden. Somit ist DdMoe1 ein echter Bestandteil des *Dictyostelium* Centrosoms. Die DdMoe1-Färbung war heterogen, entweder ringförmig, was auf eine Lokalisation in der centrosomalen Corona hinweist, oder diffus punkt-, hantel- oder kleeblattförmig, innerhalb der DdCP224 gegen gefärbten Corona sichtbar. Letzteres deutet auf eine Lokalisation von DdMoe1 auch innerhalb der centrosomalen Zentralstruktur hin. Die heterogene Markierung könnte auch auf eine unterschiedliche Zugänglichkeit des Antigens zurückzuführen sein. Bei den punktförmigen DdMoe1-Fluoreszenzsignalen, die nicht von einer DdCP224 gegen gefärbten Corona umschlossen waren, könnte es sich um centrosomale Zentralstrukturen handeln. Die zur Klärung dieser Frage nötige elektronenmikroskopische Analyse konnte nicht durchgeführt werden, da sich dafür der polyklonale anti-DdMoe1 Antikörper als ungeeignet erwies.

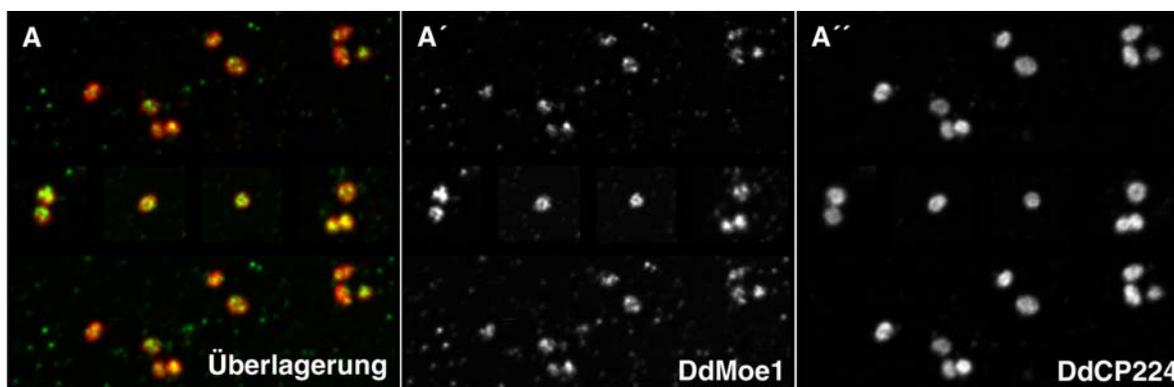


Abbildung 22: DdMoe1 ist ein Bestandteil des Centrosoms. Konfokale Aufnahme (Zeiss 510Meta) isolierter Centrosomen, die mit dem anti-DdMoe1 Antikörper (A') und dem anti-DdCP224 Antikörper 4/148 (A'') markiert wurden. Die DdMoe1-Färbung ist innerhalb jedes DdCP224 markierten Centrosoms als ringförmige oder diffus strukturierte Form vorhanden. Formaldehyd-Fixierung; Maßstab, 2 µm.

3.2.2.3 Lokalisation von GFP-DdMoe1

Zur weiteren Analyse der subzellulären Lokalisation und um Aufschluss über die zelluläre Funktion von DdMoe1 zu gewinnen, wurde eine GFP-DdMoe1 Mutante hergestellt, die ein N-terminales GFP-DdMoe1-Fusionsprotein exprimiert. Die Immunfärbungen eines Western Blots von aus GFP-DdMoe1-Mutanten gewonnenen cytosolischen Extrakten mit dem anti-DdMoe1 Antikörper (Abbildung 23 A) bzw. dem monoklonalen anti-GFP Antikörper 264-449-2 (Weber *et al.*, 1999) (Abbildung 23 B) bestätigten die Spezifität des anti-DdMoe1 Serums. In beiden Spuren wird eine bei ca. 100 kDa laufende Bande stark gefärbt, bei der es sich um das GFP-DdMoe1-Fusionsprotein handelt. In Abbildung 23 A ist bei ca. 73 kDa das endogene DdMoe1-Protein schwach sichtbar. Bei den übrigen Banden handelt es sich um Abbauprodukte. Das GFP-DdMoe1-Protein wurde also sehr stark überexprimiert.

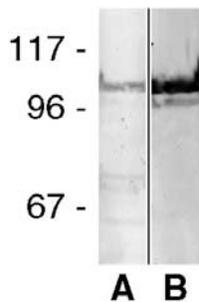


Abbildung 23: GFP-DdMoe1 wird stark exprimiert und bestätigt die Spezifität des anti-DdMoe1 Serums. Cytosolische *Dictyostelium* Zellextrakte wurden aus den GFP-DdMoe1-Mutanten präpariert und mit dem polyklonalen anti-DdMoe1 Antikörper (A) und dem monoklonalen anti-GFP Antikörper 264-449-2 (Weber *et al.*, 1999) (B) gefärbt. Die Zahlen entsprechen den Molekulargewichten in kDa.

GFP-DdMoe1 befand sich in Interphase-Zellen am Centrosom, an der Kernhülle und als kompakte Strukturen innerhalb der Kernhülle. Bei diesen könnte es sich um die Nucleoli handeln (Sameshima, 1985). Außerdem lokalisiert GFP-DdMoe1 als diffus strukturiertes Netzwerk im Cytoplasma (Abbildung 24 A und C). Das centrosomale GFP-DdMoe1 zeigte die typische ringförmige Struktur eines Bestandteils der centrosomalen Corona und befand sich innerhalb der α/β -Tubulin-Markierung am Centrosom, von der die Mikrotubuli speichenförmig ausgehen (Abbildung 24 A, Inset).

In mitotischen Zellen findet sich GFP-DdMoe1 an den Spindelpolen, im Mittelbereich der Spindel und an astralen Mikrotubuli. Ebenfalls sichtbar ist hier die strukturierte cytoplasmatische Färbung (Abbildung 24 B).

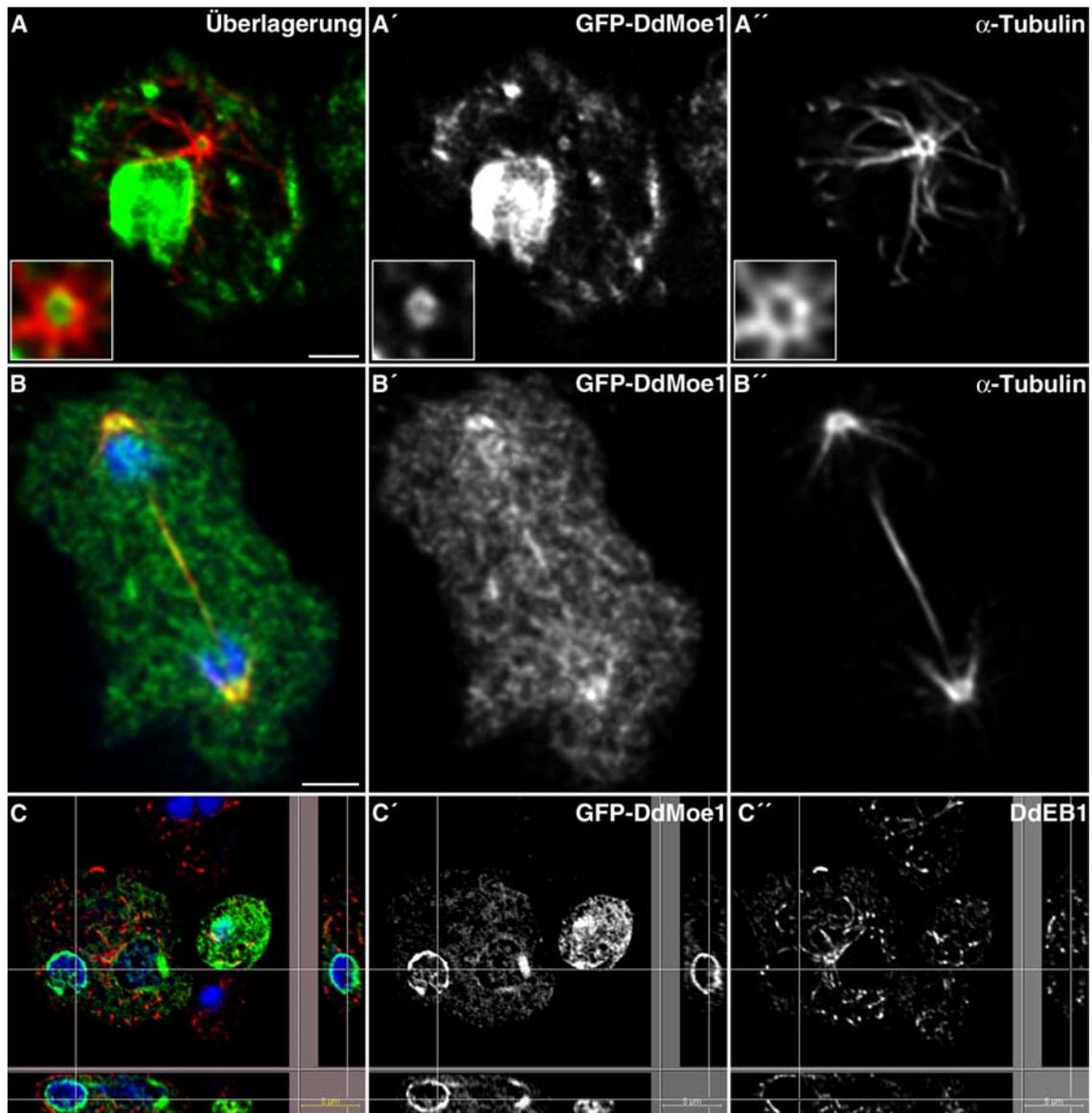


Abbildung 24: Lokalisation von GFP-DdMoe1. GFP-DdMoe1-Mutanten wurden mit dem monoklonalen anti- α -Tubulin Antikörper YL1/2 (A', B') oder mit dem anti-DdEB1 Serum (C') markiert. In der Überlagerung ist GFP-DdMoe1 grün, α -Tubulin bzw. DdEB1 rot und die DNA (TOPRO3-Färbung) blau dargestellt. Die Zellen in (A) und (C) befinden sich in der Interphase, die in (B) in der Telophase. (A, B) zeigen einzelne konfokale Ebenen, das Hauptbild in (C) eine einzelne Ebene eines konfokalen Bilderstapels (Zeiss 510Meta) darunter ist die Ansicht entlang der Z-Achse und rechts davon entlang der Y-Achse dargestellt. Dies zeigt deutlich, dass DdMoe1 an der Kernhülle lokalisiert. Die "Insets" zeigen die Ringform von Interphase-Centrosomen. Glutaraldehyd-Fixierung; Maßstab, 2 μ m.

3.2.2.4 Die Lokalisation von DdMoe1 an Mikrotubuli ist nicht von DdEB1 abhängig

Aufgrund des Einflusses von Moe1 auf die Mikrotubulidynamik und Struktur untersuchten Chen *et al.* (2000) die Mikrotubuli-Bindungsaktivität von Moe1. Dabei fanden sie, dass bakteriell exprimiertes *S. pombe* Moe1 in einem aus *mal3Δmoe1Δ*-Zellen präparierten Hefelysat zwar nicht direkt an präassemblierte Mikrotubuli bindet, aber bei Zugabe von rekombinantem Mal3 zusammen mit den Mikrotubuli pelletiert. Daraus zogen die Autoren die Schlussfolgerung, dass Moe1 über Mal3 an Mikrotubuli binden kann, obwohl eine Mikrotubuli-Lokalisation von Moe1 *in vivo* nicht gezeigt werden konnte (Chen *et al.*, 2000).

Bei *Dictyostelium* ist die *in situ* Lokalisation von DdMoe1 an Mikrotubuli nicht von DdEB1 abhängig. Dies wurde durch Immunfluoreszenzmikroskopie an DdEB1-Nullmutanten gezeigt, die mit dem anti-DdMoe1 Antikörper gefärbt wurden (Abbildung 25). Die Lokalisation von DdMoe1 ist durch die Abwesenheit von DdEB1 in keiner Weise verändert.

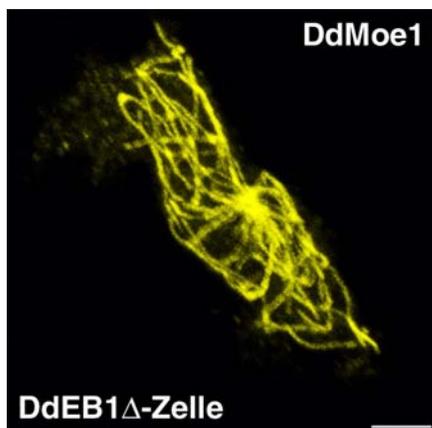


Abbildung 25: Die Mikrotubuli-Lokalisation von DdMoe1 ist nicht von DdEB1 abhängig. Fixierte DdEB1-Nullmutanten wurden mit dem anti-DdMoe1 Antikörper gefärbt. Die DdMoe1-Fluoreszenz ist gelb dargestellt. Glutaraldehyd-Fixierung; Maßstab, 2 µm.

3.2.3 Untersuchungen zur Funktion von DdMoe1

Um Aufschluss über die zelluläre Funktion von DdMoe1 zu gewinnen, wurden die GFP-DdMoe1-Überexpressionsmutanten näher analysiert. Diese zeigten zwar eine normale Entwicklung, die Generationszeit der GFP-DdMoe1-Mutanten war aber um etwa 30 % verlängert. Das Mikrotubuli-Cytoskelett dieser Zellen wies keine sichtbaren Veränderungen auf.

Auch war in den GFP-DdMoe1-Mutanten keine Veränderung der Mikrotubulistabilität bei Analysen mit den Mikrotubuli destabilisierenden Drogen Nocodazol bzw. Thiabendazol feststellbar. Der Versuch, analog der Vorgehensweise bei der DdEB1-Gen disruption, DdMoe1-Deletionsmutanten zu erzeugen, ergab keine lebensfähigen Transformanten. Somit kann keine Aussage über die zelluläre Funktion von DdMoe1 getroffen werden. Auch konnte trotz verschiedenster Ansätze keine Interaktion von DdMoe1 mit DdEB1 nachgewiesen werden.

humanen Homologen identisch. Es weist damit auch die typischen Strukturmerkmale von LIS1-Proteinen auf, eine N-terminale „coiled-coil“-Domäne und darauf folgend sieben WD40-Motive (Cardoso *et al.*, 2000; Pilz *et al.*, 1998).

3.3.2 Untersuchung der subzellulären Lokalisation von DdLIS1

3.3.2.1 Untersuchung der Lokalisation von DdLIS1 mit Hilfe polyklonaler Antikörper

Die subzelluläre Lokalisation von DdLIS1 wurde mit Hilfe spezifischer polyklonaler Antikörper analysiert. Diese wurden gegen ein bakteriell exprimiertes Fusionsprotein aus dem Maltosebindenden-Protein (MBP) und DdLIS1 hergestellt. Die polyklonalen anti-DdLIS1 Antikörper

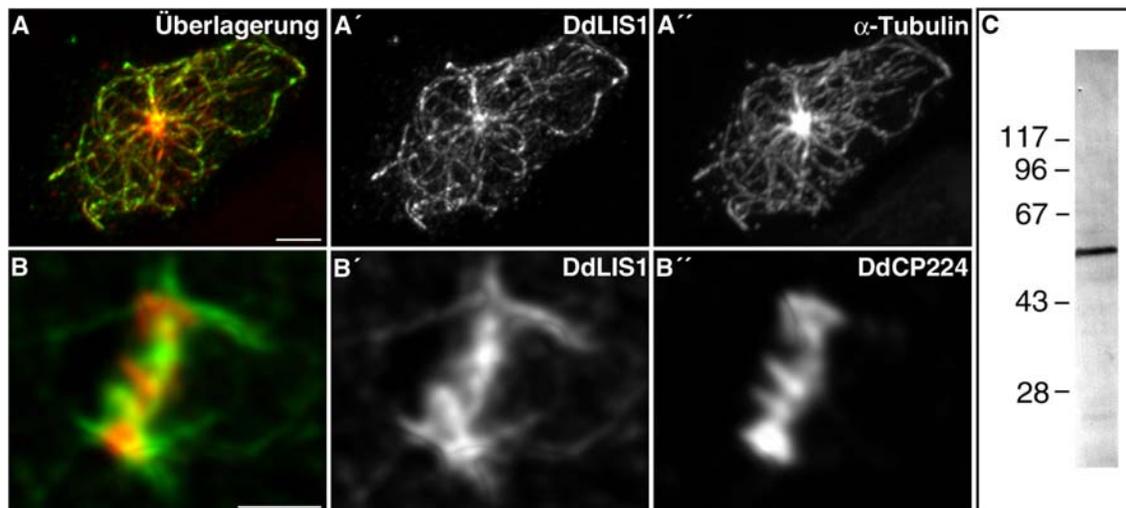


Abbildung 27: Zellzyklus-abhängige Lokalisation von DdLIS1. DdLIS1 (A') colokalisierte während aller Zellzyklusstadien mit α -Tubulin (A''), das mit dem monoklonalen anti- α -Tubulin Antikörper YL1/2 markiert wurde. Abgebildet ist eine Interphase-Zelle (A), in der Überlagerung ist DdLIS1 grün und α -Tubulin rot dargestellt. In (B) ist eine Metaphasespindel gezeigt. DdLIS1 (B') lokalisierte entlang der Spindel und an den Spindelpolen. Die Gegenfärbung (B'') wurde mit dem monoklonalen anti-DdCP224 Antikörper 4/148 (Gräf *et al.*, 1999) durchgeführt. In der Überlagerung (B) ist DdLIS1 grün und DdCP224 rot dargestellt. Alle Bilder sind Projektionen (max. Int. Modus) konfokaler Bilderstapel (Zeiss LSM 510Meta). Methanol-Fixierung; Maßstab, 2 μ m. (C) „Western Blot“-Färbung; Ein cytosolischer *Dictyostelium* Zellextrakt wurde aus AX2-Zellen präpariert und mit dem polyklonalen anti-DdLIS1 Serum gefärbt. Die Bande bei ca. 50 kDa repräsentiert DdLIS1. Die Zahlen entsprechen den relativen molekularen Massen in kDa.

Erkennen, wie erwartet, spezifisch eine Bande von ca. 50 kDa in „Blots“ von cytosolischen *Dictyostelium* Zellextrakten (Abbildung 27 C).

In der Immunfluoreszenzmikroskopie wurde die DdLIS1-Markierung der polyklonalen anti-DdLIS1 Antikörper in Interphase-Zellen entlang der Mikrotubuli und am Centrosom beobachtet (Abbildung 27 A, A'). In mitotischen Zellen lokalisierte DdLIS1 entlang der Spindel und an den Spindelpolen (Abbildung 27 B, B').

DdLIS1 lokalisiert also während des gesamten Zellzyklus entlang der Mikrotubuli und am Centrosom.

3.3.2.2 DdLIS1 und DHC sind integrale Bestandteile der centrosomalen Corona

Um nachzuweisen, ob DdLIS1 tatsächlich ein integraler Bestandteil des Centrosoms ist, wurde die in der konfokalen Immunfluoreszenzmikroskopie an Wildtypzellen (Abbildung 27 A') beobachtete ringförmige Markierung des Centrosoms an isolierten Centrosomen genauer untersucht. Tatsächlich colokalisiert DdLIS1 mit DdCP224, einem bekannten Bestandteil der centrosomalen Corona (Gräf *et al.*, 2000b), an isolierten Centrosomen (Abbildung 28 A, A', A''). Damit ist DdLIS1 ein Bestandteil des Centrosoms, dessen Lokalisation nicht von Mikrotubuli vermittelt wird (vgl. Abbildung 10 und 22). Die Analyse eines Fluoreszenz-Intensitätsprofils entlang einer Linie durch das Zentrum des Centrosoms ergab zwei Maxima, deren Abstand mit dem Durchmesser der centrosomalen Corona übereinstimmt. Die Position der Maxima zeigt, dass DdCP224 etwas weiter distal als DdLIS1 lokalisiert, DdLIS1 sich also näher an der centrosomalen Zentralstruktur befindet (Abbildung 28 A''').

Auch Dynein wurde an isolierten Centrosomen gefunden. Immunfärbungen mit dem anti-DHC Antikörper $\gamma 7$ (Koonce und Samsó, 1996) ergaben eine exakte Colokalisation mit DdCP224 in der centrosomalen Corona (Abbildung 28 B, B', B''). Die Positionen der Maxima der DHC und DdCP224-Markierungen im Fluoreszenzprofil waren identisch (Abbildung 28 B''').

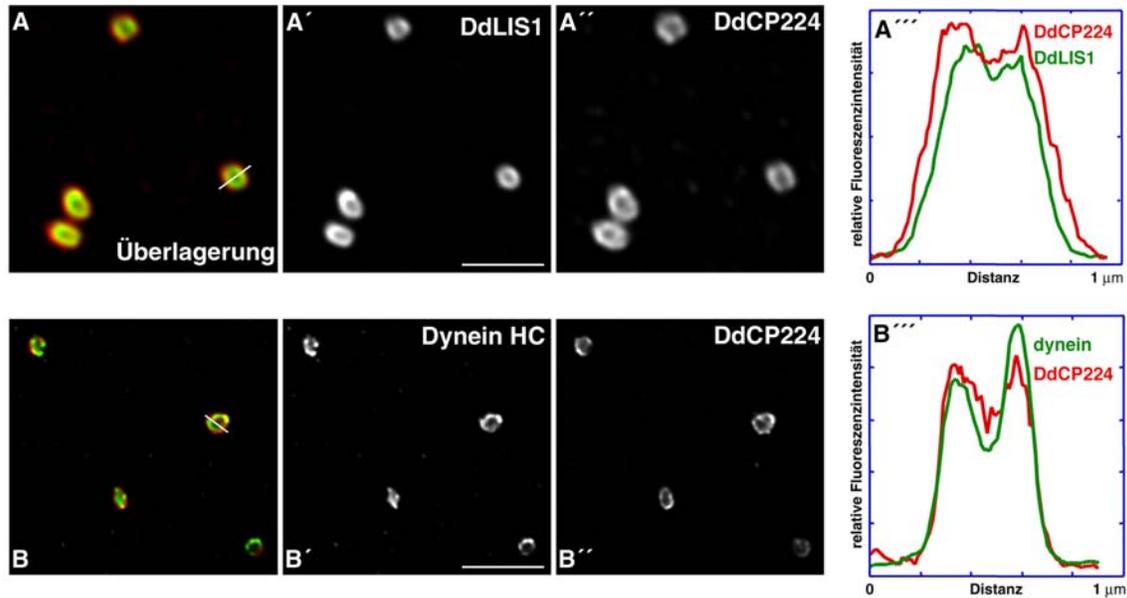


Abbildung 28: DdLIS1 und DHC sind Bestandteile der centrosomalen Corona. Konfokale Aufnahmen (Zeiss 510Meta) isolierter Centrosomen, die mit dem anti-DdLIS1 Antikörper (A'), dem anti-DHC Antikörper $\gamma 7$ (B') (Koonce und Samsø, 1996) und dem anti-DdCP224 Antikörper 4/148 (A'', B'') markiert wurden. In der Überlagerung sind DdLIS1 (A) und DHC (B) grün dargestellt; DdCP224 ist in rot gezeigt (A und B). (A''' und B''') Fluoreszenz-Intensitätsprofile entlang einer Linie durch das Zentrum des Centrosoms ergaben jeweils zwei Maxima mit einer Distanz, die dem Durchmesser der centrosomalen Corona entsprach. (A''') Der Plot zeigt, dass DdCP224 (rote Linie) etwas weiter distal von DdLIS1 (grüne Linie) lokalisiert. (B''') Die Positionen der Maxima von DdCP224 (rote Linie) und DHC (grüne Linie) sind identisch. Formaldehyd-Fixierung; Maßstab, 2 μm .

3.3.3 Für die Untersuchung von DdLIS1 erzeugte Mutanten

Zur weiteren Analyse der Lokalisation und Aufklärung der Funktion von DdLIS1 wurden Mutanten erzeugt, die ein GFP-DdLIS1 bzw. ein MBP-DdLIS1-Fusionsprotein exprimieren. Ebenfalls wurden Deletionsmutanten hergestellt, denen die N-terminale „coiled-coil“-Domäne fehlte (MBP-DdLIS1 ΔN) bzw. die C-terminal gelegenen WD40-Motive fehlten (MBP-DdLIS1 ΔC). Der Versuch einer Gendisruption (vgl. 3.1.5.1) ergab keine lebensfähigen Transformanten.

3.3.4 Analyse der Lokalisation von GFP-DdLIS1 vom Beginn bis zum Ende einer Mitose

Der Ablauf eines gesamten Zellzyklus einer GFP-DdLIS1 Mutante konnte durch konfokale 4D-Mikroskopie aufgenommen werden. Dieses Ereignis zu beobachten ist sehr schwierig, da die Auswahl der Zellen am Konfokalmikroskop ohne Phasenkontrast fast zufällig ist. Die Beobachtung eines gesamten Zellzyklus lieferte genaue Informationen über die Lokalisation von DdLIS1 und darüber hinaus über die Dynamik des Mikrotubuli-Cytoskeletts beim Übergang von der Interphase in die Mitose.

GFP-DdLIS1 lokalisierte wie das endogene Protein während des ganzen Zellzyklus entlang der Mikrotubuli und am Centrosom (Abbildung 29). Der Abbau der Interphase-Mikrotubuli geschieht durch Fragmentierung der Mikrotubuli vor und nach der Freisetzung vom Centrosom. Die Freisetzung der Mikrotubuli vom Centrosom ist ein sehr schneller Prozess, der innerhalb von 10 Sekunden vonstatten geht (Abbildung 29; geschlossene Pfeilspitzen). Die von ihrer centrosomalen Verankerung befreiten Mikrotubuli und Mikrotubulifragmente werden zum Zellcortex hin und daran entlang gezogen (Abbildung 29; offene Pfeilspitzen), dies geschieht wahrscheinlich durch die Aktivität eines zum Mikrotubuli-minus-Ende hin gerichteten Motorproteins, also z.B. cortikalem Dynein. Die centrosomale GFP-DdLIS1-Färbung ist auch nach Freisetzung der Mikrotubuli vom Centrosom (Abbildung 29; Bilder 110-140 sec) als Ring sichtbar. Mit Einsetzen der Prophase (Abbildung 29; Bilder ab 150 sec) wird mehr GFP-DdLIS1 an das Centrosom rekrutiert. Nach ca. 330 Sekunden ist die Centrosomenduplikation abgeschlossen (Abbildung 29; Bild 480 sec) und die Mitosespindel wird gebildet. Der Abbau der freigesetzten Mikrotubuli ist kurz nach Einsetzen der Prophase beendet (Abbildung 29; Bild 180 sec). Die Mitosespindel wird verlängert, die Zelle durchläuft Metaphase und Telophase, bis die Spindel reißt und das Interphase-Cytoskelett wieder aufgebaut wird (Abbildung 29; Bild sec 1120).

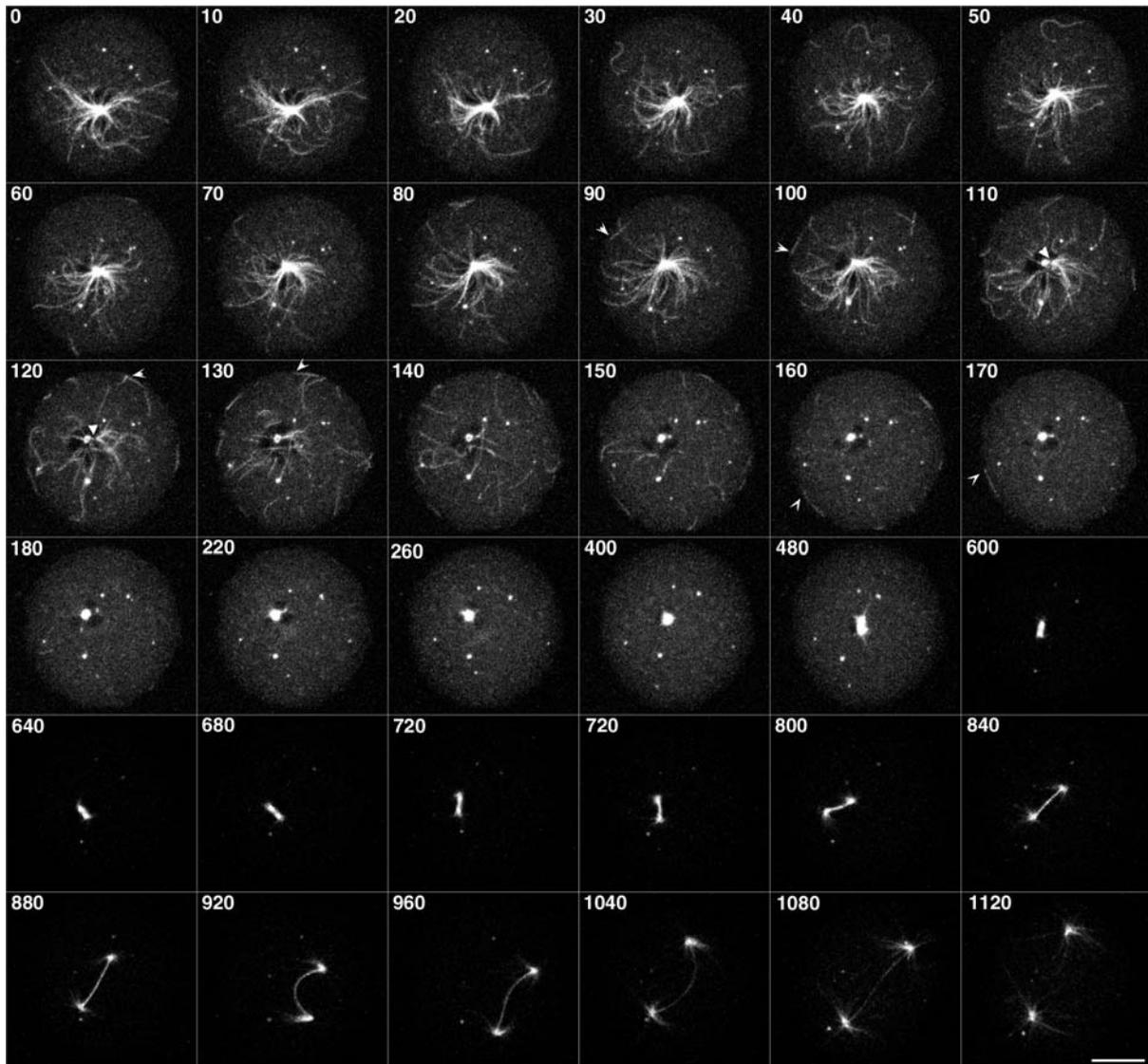


Abbildung 29 und Film_Abb29.mov: 4D-konfokalmikroskopische (Zeiss 510Meta) Lebendzellbeobachtung einer GFP-DdLIS1-Zelle unter Agaroverlay (Fukui, 1987) beim Durchlaufen einer Mitose von der Interphase bis zum Einsetzen der Cytokinese. Entlang des Zellcortex bewegte Mikrotubuli sind mit offenen Pfeilspitzen gekennzeichnet (90/100 sec, 120/130 sec, 160/170 sec). Die Freisetzung der Mikrotubuli vom Centrosom ist mit geschlossenen Pfeilspitzen markiert (110/120 sec). Die Zeitrafferaufnahmen sind Bilder von z-Stapeln, die aus fünf konfokalen Schnitten mit einem Abstand von je 1,6 μm projiziert worden sind. Am Zeitpunkt 600 sec wurde die Aufnahme-Empfindlichkeit reduziert, um die Details der Spindel besser erkennen zu können. Maßstab, 2 μm .

3.3.5 DdLIS1 spielt eine Rolle bei der Cytokinese und dem Spindelaufbau

GFP-DdLIS1 wurde - ebenso wie die MBP-DdLIS1 Konstrukte - kurz nach der Transformation etwa 8-10 fach überexprimiert. Dieser Überexpressionsgrad gilt für die ganze Zellpopulation und kann in den individuellen Zellen abweichend sein. In ca. 25 % der frisch transformierten GFP-DdLIS1-Überexpressions-Mutanten fanden sich multinukleäre Zellen mit überzähligen

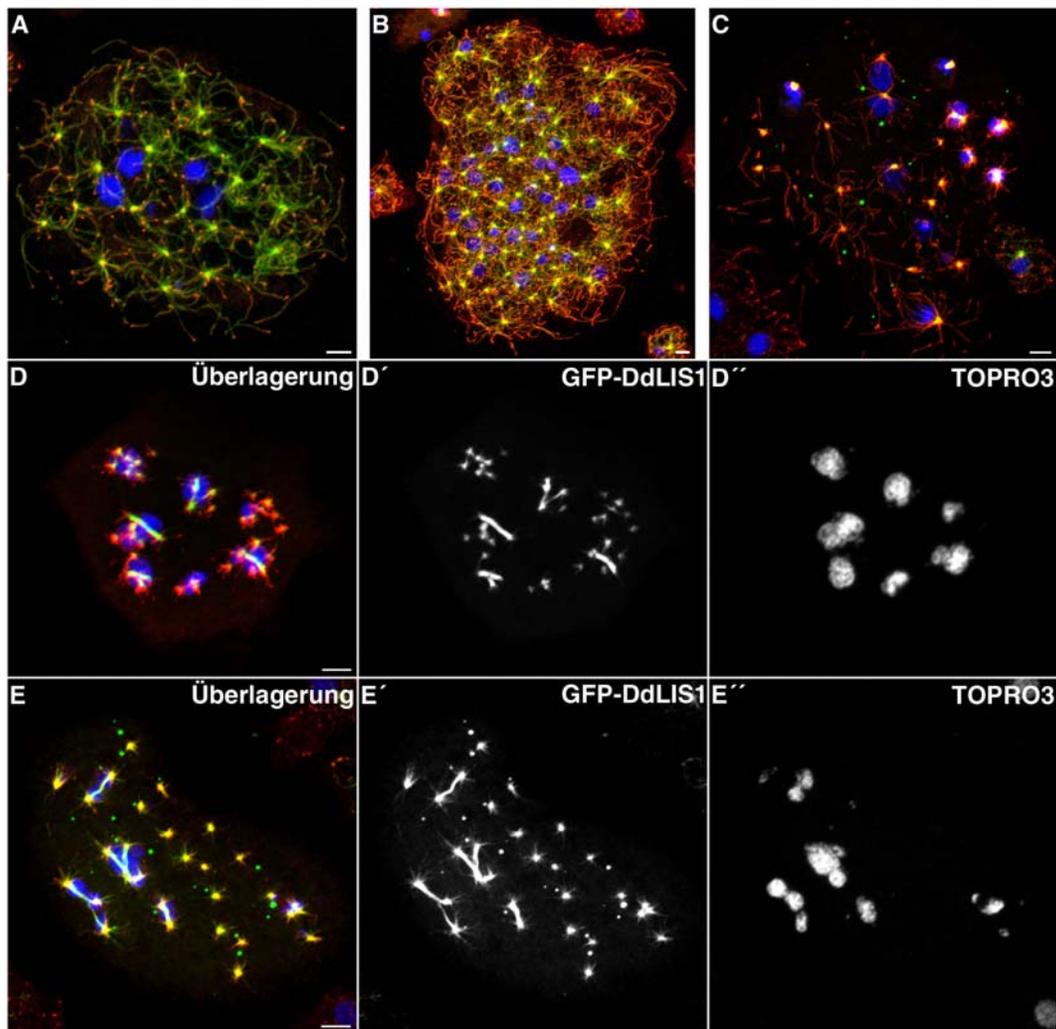


Abbildung 30: DdLIS1 spielt eine Rolle bei der Cytokinese und dem Spindelaufbau. (A) und (B) sind Bilder von multinukleären GFP-DdLIS1-Mutanten mit überzähligen Centrosomen in der Interphase; (C), (D) und (E) von mitotischen Zellen mit schweren Spindeldefekten. In der Überlagerung ist die GFP-Fluoreszenz grün dargestellt, die Gegenfärbung mit dem anti-DdEB1 Antikörper ist in rot; die DNA (TOPRO3) in blau dargestellt. Die Bilder sind Projektionen (max. Int. Modus) konfokaler Bilderstapel (Zeiss 510Meta). Formaldehyd-Aceton-Fixierung; Maßstab, 2 μ m.

Centrosomen (Abbildung 30). Etwa die Hälfte dieser Zellen zeigte eine extreme Häufung der Kern- und Centrosomenzahl. Die in Abbildung 30 B gezeigte Zelle besitzt 35 Kerne und 85 Centrosomen. Solche Zellen zeigten auch häufig schwere Mitosedefekte. So wurden neben regulären Mitosespindeln mit assoziierter DNA auch unduplizierte Centrosomen mit assoziierter DNA und Centrosomen mit Interphase-Cytoskelett beobachtet (Abbildung 30 C). In Abbildung 30 D und E sind mitotische Zellen abgebildet, deren Kerne mit mehr als einem Centrosom assoziiert sind und deformierte Mitosespindeln, teilweise mit drei Spindelpolen, aufweisen. Das Auftreten von zusätzlichen kleinen DNA-Massen ließ darauf schließen, dass die Mutanten zur korrekten Segregation der Chromosomen nicht in der Lage waren.

3.3.6 DdLIS1 spielt eine Rolle bei der Mikrotubuli/Zellcortex Verankerung

3.3.6.1 DdLIS1-Überexpression führt zu Disorganisation des Mikrotubuli-Cytoskeletts

Die Überexpression von DdLIS1, sowohl als GFP- und MBP-Fusionsprotein als auch in Form von N- bzw. C-terminal deletierten MBP-DdLIS1 Fragmenten (MBP-DdLIS1 Δ N und MBP-DdLIS1 Δ C; Daten nicht gezeigt), störte die Organisation des Interphase-Mikrotubuli-Cytoskeletts (Abbildung 31).

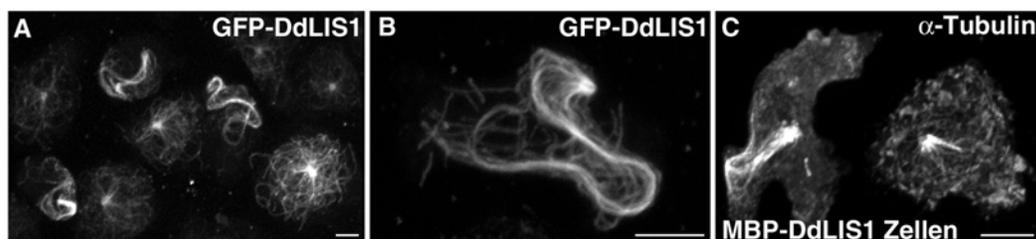


Abbildung 31: DdLIS1-Überexpression führt zu Mikrotubulibündelung und Elongation. (A) ist ein Übersichtsbild einer repräsentativen Population von GFP-DdLIS1-Mutanten; (B) zeigt ein typisches Bild der veränderten Mikrotubuliorganisation in einer GFP-DdLIS1-Mutante. (C) Auch Überexpression von MBP-DdLIS1 führt zu gestörter Organisation des Mikrotubuli-Cytoskeletts. Hier ist die Mikrotubulimarkierung mit dem monoklonalen anti- α -Tubulin Antikörper YL1/2 dargestellt. Die Bilder sind Projektionen (max. Intens. Modus) konfokaler Bilderstapel (Zeiss 510Meta). Glutaraldehyd-Fixierung; Maßstab 2 μ m.

Sowohl in AX2-Zellen als auch in GFP- α -Tubulin-Zellen gehen alle Interphase-Mikrotubuli radiär vom Centrosom aus, wobei sich die plus-Enden nahe am Zellcortex befinden. Im Gegensatz dazu war in DdLIS1-überexprimierenden Zellen das normale radiäre Interphase-Mikrotubulisystem häufig kollabiert. Die Mikrotubuli-plus-Enden schienen den Kontakt mit dem Zellcortex verloren zu haben. Die Mikrotubuli erschienen oft gebündelt, waren länger als üblich und wellten sich durch die Zelle.

Um die Dynamik des kollabierten Mikrotubulisystems in lebenden Zellen näher zu untersuchen, wurden GFP-DdLIS1-Zellen mittels vierdimensionaler Konfokalmikroskopie aufgenommen (Abbildung 32 A). Dabei erwiesen sich die kollabierten Mikrotubuli als außerordentlich motil. Die Mikrotubuli ähnelten oft einem mit dem Centrosom verbundenen Kometenschweif. Die gebündelten Mikrotubuli entfalteten sich von Zeit zu Zeit, um dann erneut zu einem dichten Bündel zu kollabieren. Das Centrosom selbst kreiste schnell und kontinuierlich, oft auch nahe am Zellcortex durch die Zelle und schien von den Mikrotubuli durch die Zelle geschoben zu werden. In Wildtypzellen bzw. in GFP- α -Tubulin-Zellen wird das Centrosom im Gegensatz dazu immer im Zellzentrum gehalten (Abbildung 32 B). Dieser Phänotyp der DdLIS1-Überexpression gleicht demjenigen, der durch die Überexpression der Motordomäne der schweren Dyneinkette (Koonce *et al.*, 1999) bzw. durch die Überexpression von entweder N-terminal oder C-terminal verkürzten Fragmenten der intermediären Dyneinkette (Ma *et al.*, 1999) verursacht wird. In letzterer Mutante ist der cortikale Dynein/Dynaktin Komplex disrumpiert. Dies scheint auch die Verankerung der Mikrotubuli-plus-Enden via Dynein/Dynaktin zu verhindern (Ma *et al.*, 1999). Auch DdCP224 spielt eine Rolle bei der Mikrotubuli/Zellcortex Interaktion. Überexpression eines N-terminalen Fragments von DdCP224 führt zum Kollaps der Interphase-Mikrotubuli (unpublizierte Arbeit von Andrea Hestermann).

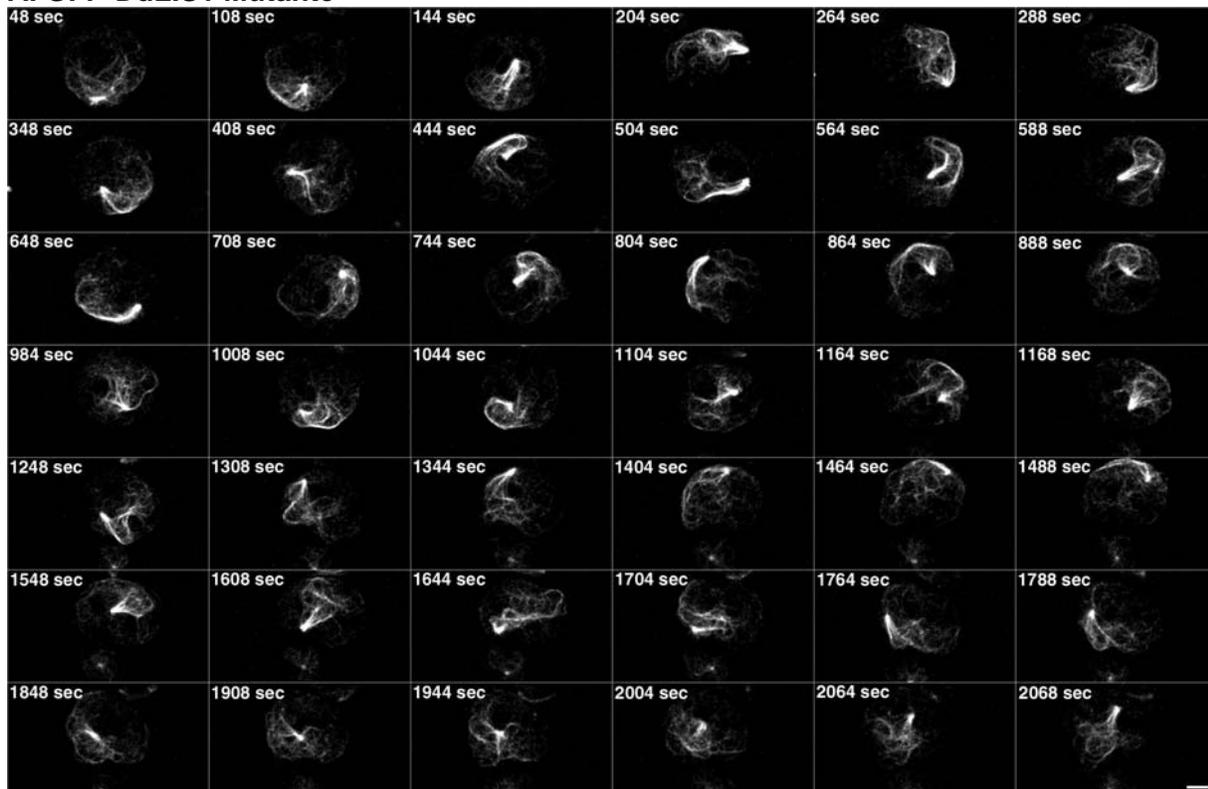
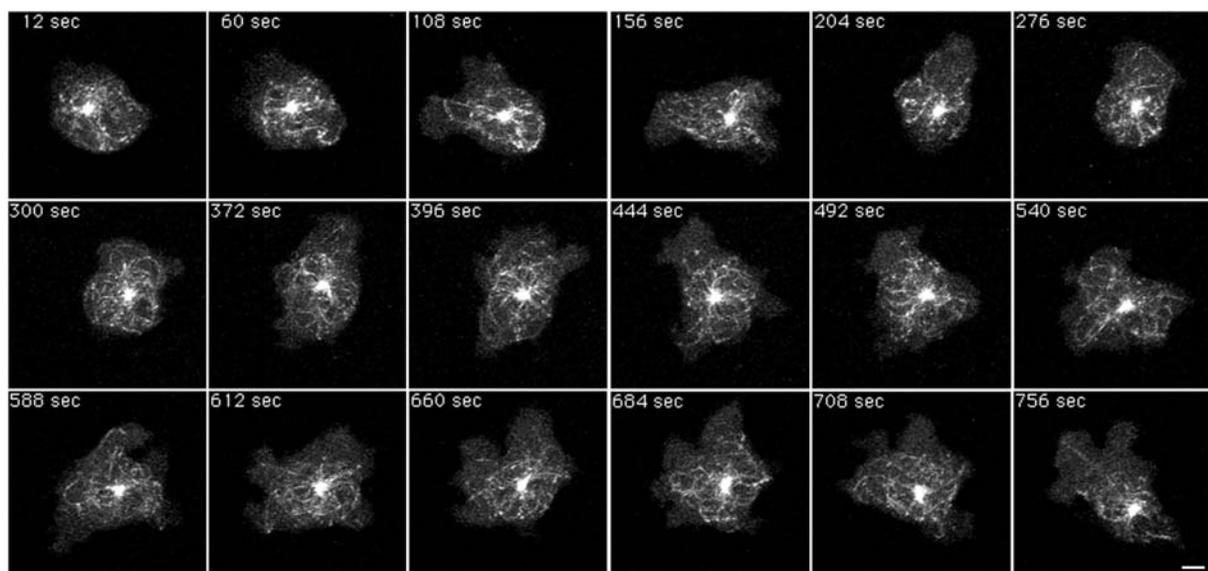
A. GFP-DdLIS1 Mutante**B. AX2 Kontrollzelle**

Abbildung 32 und Film_Abb32.mov: 4D-konfokalmikroskopische Lebendbeobachtung der Mikrotubuliorganisation und Centrosomenmotilität in einer typischen GFP-DdLIS1 Mutante (A) und der Wildtypsituation in einer GFP- α -Tubulin exprimierenden Zelle (B). Die Aufnahmen wurden unter Agaroverlay (Fukui, 1987) angefertigt (Zeiss 510Meta). Die Bilder wurden aus sechs konfokalen Schnitten des jeweiligen z-Stapels (Abstand von je 5,1 μm) projiziert. Maßstab 2 μm .

3.3.6.2 DdLIS1 interagiert mit DdCP224 und der schweren Dyneinkette

Da die Ähnlichkeit der Phänotypen der Dynein-, DdCP224- und DdLIS1-Mutanten ein Zusammenwirken dieser drei Proteine bei der Verankerung der Mikrotubuli am Zellcortex wahrscheinlich erscheinen lassen, wurde durch Coimmunpräzitationsexperimente untersucht, ob diese Proteine auch direkt interagieren. Tatsächlich konnte an DdLIS1 bzw. an die intermediäre Dyneinkette gebundenes DdCP224 mit anti-DdLIS1 Antikörpern bzw. dem anti-DHC Antikörper y7 (Koonce und Samso, 1996) spezifisch aus cytosolischen *Dictyostelium* Zellextrakten präzipitiert werden (Abbildung 33). Umgekehrt konnte auch MBP-DdLIS1 mit anti-DdCP224 Antikörpern aus Zellextrakten von MBP-DdLIS1-Mutanten präzipitiert werden (Abbildung 33). Die Verwendung der MBP-DdLIS1-Mutanten zum Nachweis der Coimmunpräzitation war notwendig, da die endogene DdLIS1 Bande im Western Blot durch die gleichgroße IgG-HC Bande überdeckt wird. Ebenso präzipitierte die schwere Dyneinkette aus Wildtyp-Zellextrakten mit an anti-DdLIS1 Antikörper gebundenem DdLIS1 (Abbildung 33). Somit liegen DdLIS1, DdCP224 und DHC in einem cytosolischen Komplex vor.



Abbildung 33: DdLIS1 interagiert mit DdCP224 und der schweren Dyneinkette (DHC).

Coimmunpräzitation von DdLIS1 mit DdCP224 und DHC aus cytosolischen *Dictyostelium* Zellextrakten (MBP-DdLIS1-Mutanten oder AX2-Wildtypzellen; wie zuoberst angegeben). Die Copräzipitate wurden auf 12.5 % Acrylamidgele geladen und nach Elektrophorese geblottet. Zur Präzipitation wurde Protein-G Sepharose als Matrix benutzt. Die zur Immunpräzitation verwendeten Antikörper, polyklonaler anti-DHC Antikörper y7 (Koonce und Samso, 1996), polyklonaler anti-DdCP224 Antikörper DdCP224HIND (Ralph Gräf), polyklonaler anti-MBP Antikörper (Gräf, 2001a) und polyklonaler anti-DdLIS1 Antikörper, sind oben angegeben; die für die „Western Blot“-Färbung verwendeten Antikörper sind unter der Abbildung angegeben. Als Kontroll-Antikörper wurden die DdLIS1 und DdCP224Hind Präimmunsereen und der polyklonale anti-GFP Antikörper (Faix *et al.*, 2001) verwendet.

3.3.6.3 Überexpression von DdLIS1 verursacht einen Zerfall des Golgi-Apparates

Mehrere Studien haben die Notwendigkeit eines intakten Dynein/Dynaktin Komplexes bei der korrekten Positionierung des Golgi-Apparates gezeigt (Burkhardt *et al.*, 1997; Corthesy Theulaz *et al.*, 1992; Ma *et al.*, 1999). Die Golgi-Vesikel werden mittels Dynein zum Centrosom hin transportiert und am Centrosom gehalten. Verlust der Motorfunktion oder Störung des „Verbindungskomplexes“ führt zu einer Dispersion des Golgi-Apparates. Somit ist die Lokalisation des Golgi-Apparates ein guter Indikator für die Funktion des Dynein/Dynaktin Komplexes *in vivo*.

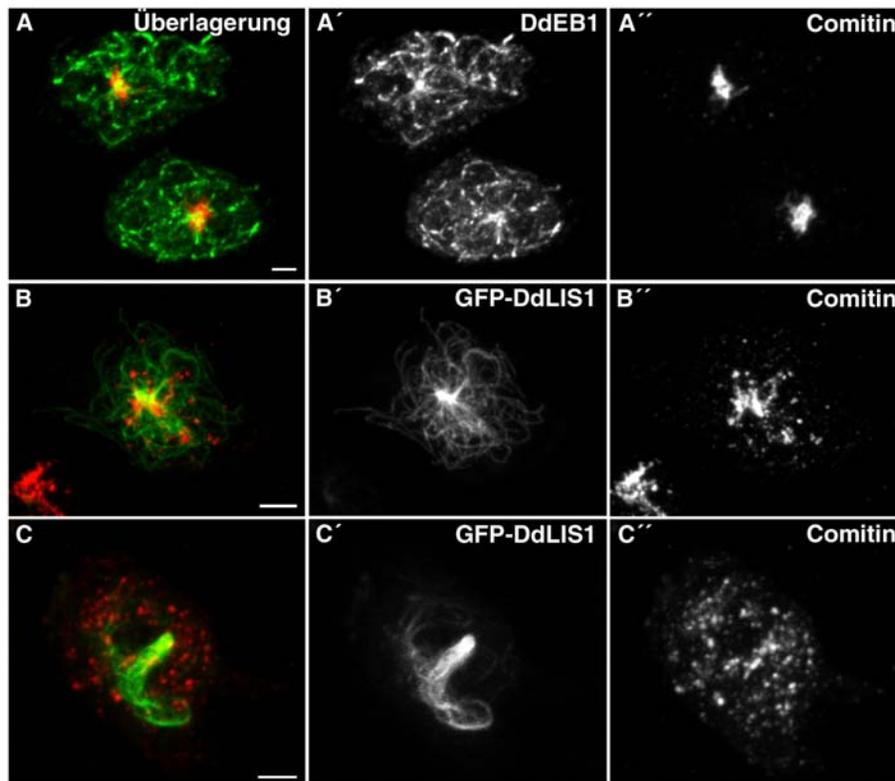


Abbildung 34: DdLIS1-Überexpression verursacht Golgi-Dispersion. AX2-Wildtypzellen (A) und GFP-DdLIS1-Mutanten (B und C) wurden mit dem anti-Comitin Antikörper (Weiner *et al.*, 1993) zur Darstellung des Golgi-Apparates gefärbt (A''; B''; C''). Die Mikrotubuli-Gegenfärbung erfolgte in (A) mit dem anti-DdEB1 Antikörper. In der Überlagerung ist die DdEB1-Färbung (A) bzw. die GFP-DdLIS1-Fluoreszenz grün (B und C) und die Comitin/Golgi-Färbung in rot dargestellt. In *Dictyostelium* Wildtypzellen liegt der Golgi-Komplex als kompaktes Aggregat am Centrosom vor (A), während die Überexpression von GFP-DdLIS1 zur Dispersion des Golgi-Apparates führte (B und C). Die Bilder sind Projektionen (max. Int. Modus) konfokaler Bilderstapel (Zeiss 510Meta).

Methanol-Fixierung; Maßstab 2 µm.

Die Lokalisation des Golgi-Apparates wurde durch Immunfluoreszenzmikroskopie unter Verwendung eines monoklonalen Antikörpers gegen Comitin (Weiner *et al.*, 1993) untersucht. In *Dictyostelium* Zellen liegt der Golgi-Komplex als kompaktes perinukleäres Aggregat am Centrosom vor (Abbildung 34 A). Im Gegensatz dazu sind die Golgi-Vesikel in den GFP-DdLIS1-Mutanten im ganzen Cytoplasma verteilt (Abbildung 34 B und C). Möglicherweise besteht auch ein Zusammenhang mit dem Grad der DdLIS1-Überexpression und der Funktionsfähigkeit des Dynein/Dynaktin Komplexes. So ist in GFP-DdLIS1-Zellen mit intaktem radiärem Mikrotubulisystem häufig dennoch eine partielle Störung der Golgiorganisation festzustellen (Abbildung 34 B), während bei Zellen mit gestörter Mikrotubuli/Cortex Interaktion eine vollständige Desorganisation des Golgi-Apparates vorliegt (Abbildung 34 C). Der klare Einfluss der DdLIS1-Überexpression auf die Organisation des Golgi-Apparates stützt die These, dass durch DdLIS1-Überexpression die Funktion des Dynein/Dynaktin Komplexes gestört wird.

3.3.7 DdLIS1-Überexpression verringert Zellmotilität und verändert die Aktindynamik

3.3.7.1 DdLIS1-Überexpression führt zu verringerter Zellmotilität

In Neuronen sind die schweren Zellmotilitätsdefekte aufgrund von Mutationen im LIS1-Gen die Ursache für die dramatische Störung der Gehirnentwicklung bei der Lissenzephalie (Lo Nigro *et al.*, 1997; Reiner *et al.*, 1993). In diesem Kontext lag es nahe, die Motilität der DdLIS1 überexprimierenden *Dictyostelium* Mutanten zu untersuchen. Dazu wurde die Motilität der GFP-DdLIS1-Zellen mit denen von GFP- α -Tubulin-Zellen verglichen. Um sicherzustellen, dass jede der beobachteten Zellen das GFP-DdLIS1-Fusionsprotein exprimierte, wurde der GFP-Kanal während der Zeitrafferaufnahme am Konfokalmikroskop parallel zum Hellfeldkanal aufgezeichnet (Abbildung 35). Die Beobachtung über einen Zeitraum von 40 Minuten zeigte eine dramatische Reduktion der Zellmotilität der GFP-DdLIS1-Mutanten (Abbildung 35). In Abbildung 35 A'' und B'' repräsentiert jede Linie das Wanderungsverhalten einer einzelnen Amöbe während 40 Minuten. Alle analysierten GFP-DdLIS1-Mutanten zeigten über den Beobachtungszeitraum Zellbewegungen, die aber bei den meisten Zellen nicht in Raumgewinn resultierten (Film_Abb35.mov). Auch die Überexpression von MBP-DdLIS1 führte zu einem

schweren Migrationsdefekt (Daten nicht gezeigt). Das Erscheinungsbild der Zellen im Hellfeld (Abbildung 35 B') - runde Zellen mit vielen lappig zerklüfteten Pseudopodien – unterschied sich deutlich von dem Erscheinungsbild der GFP- α -Tubulin-Kontrollzellen, welche lang gestreckter waren und deutlich weniger Pseudopodien aufwiesen (Abbildung 35 A').

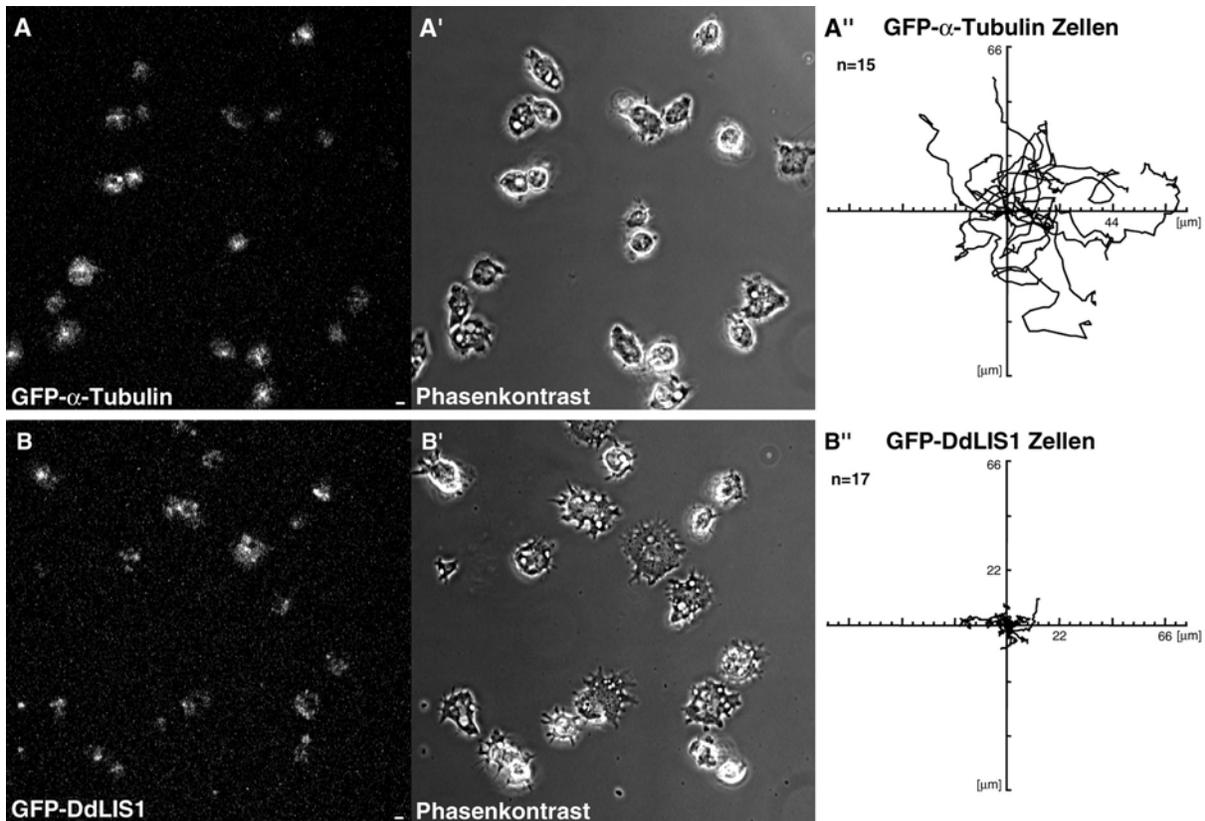


Abbildung 35 und Film_Abb35.mov: GFP-DdLIS1-Mutanten zeigen verringerte Zellmotilität. 4D-konfokalmikroskopische (Zeiss 510Meta) Lebendbeobachtung der Motilität von GFP- α -Tubulin-Kontrollzellen (A) und GFP-DdLIS1-Mutanten (B) in Medium. Gezeigt ist jeweils das Startbild der Lebendbeobachtung; der Fluoreszenzkanal (A und B) ist eine Projektion aus 5 konfokalen Schnitten des jeweiligen z-Stapels; der Phasenkontrast (A' und B') zeigt nur eine Schärfenebene. In A'' und B'' repräsentiert jede Linie das Wanderungsverhalten einer einzelnen Amöbe im Zeitraum von 40 Minuten. Die Daten wurden aus je drei unterschiedlichen Experimenten erhoben. Die Motilitätsspuren wurden zur besseren Vergleichbarkeit in einen gemeinsamen Startpunkt projiziert. Maßstab 2 μm .

3.3.7.2 *Dictyostelium* Zellmotilität benötigt kein intaktes Mikrotubuli-Cytoskelett

Um festzustellen, ob die Störung der Mikrotubuli/Zellcortex Interaktion die Ursache für die dramatisch reduzierte Zellmotilität der DdLIS1-Mutanten darstellt, wurden GFP- α -Tubulin-Kontrollzellen mit Nocodazol behandelt. Die daraus resultierende Depolymerisation des Mikrotubuli-Cytoskeletts, bei der die Mikrotubuli zu kurz sind um noch mit dem Zellcortex interagieren zu können, sollte die DdLIS1 induzierte Störung des Interphase-Mikrotubulsystems nachahmen. Verglichen mit unbehandelten Zellen (Abbildung 35 A''), führte diese Behandlung nur zu einer relativ geringen Einschränkung der Zellmotilität (Abbildung 36 A). Die durchschnittlich zurückgelegte Strecke von unbehandelten GFP- α -Tubulin-Zellen von $5,15 \pm 0,35 \mu\text{m}/\text{min}$ ($n=8$) sank nach Nocodazolbehandlung ($300\mu\text{M}$) nur leicht auf $4,23 \pm 0,68 \mu\text{m}/\text{min}$ ($n=12$). Die Persistenz der Zellbewegungen war allerdings deutlich beeinträchtigt (Abbildung 35 A'' und 35 A). Die für die Direktionalität der *Dictyostelium* Migration notwendige Centrosomenreorientierung (Ueda *et al.*, 1997) kann, wohl bedingt durch das fehlende Mikrotubuli-Cytoskelett, nicht erfolgen.

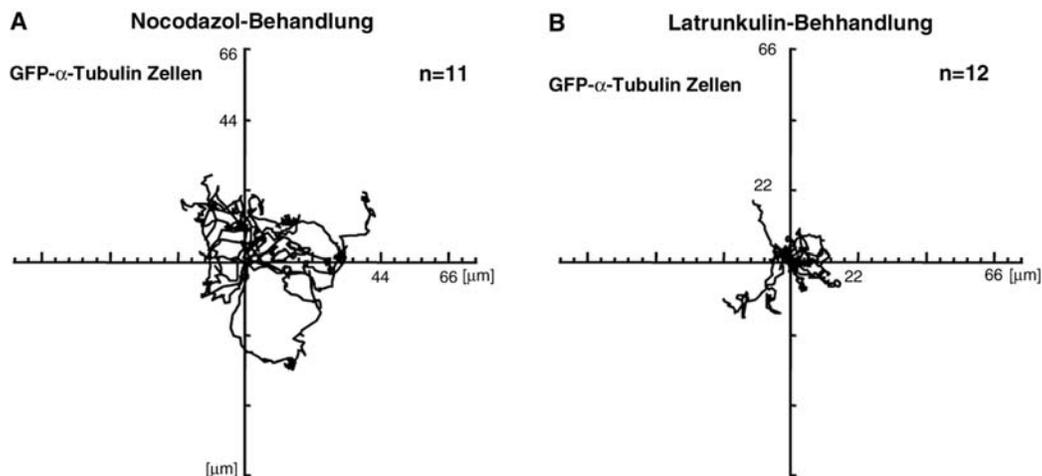


Abbildung 36: *Dictyostelium* Zellmotilität benötigt kein intaktes Mikrotubuli-Cytoskelett. Lebendbeobachtung der Motilität von GFP- α -Tubulin-Kontrollzellen in Medium, nach vorangegangener 1 stündiger und während des Beobachtungszeitraums (40 min) anhaltender Inkubation mit (A) 300 μM Nocodazol bzw. (B) mit 0,2 μM Latrunculin A. Die Aufnahme und Auswertung wurde wie unter Abbildung 35 beschrieben durchgeführt.

Da die Simulation der DdLIS1-bedingten Defekte der Interphase-Mikrotubuliorganisation durch die Nocodazolbehandlung den dramatischen Motilitätsdefekt der DdLIS1-Mutanten nicht zufrieden stellend erklärte, wurde die Notwendigkeit eines intakten Aktin-Cytoskeletts für die *Dictyostelium* Zellmotilität untersucht. Dazu wurde das F-Aktin Netzwerk in GFP- α -Tubulin-Kontrollzellen durch Behandlung mit geringen Konzentrationen von Latrunculin A (0,2 μ M) partiell depolymerisiert. Latrunculin A inhibiert die Aktin-Polymerisation durch die Bildung eines nicht polymerisationsfähigen Komplexes mit G-Aktin (Spector *et al.*, 1989). Daraus resultierte eine deutliche Verringerung der Motilität, die vergleichbar mit der in DdLIS1-Mutanten war (Abbildung 36 B und 34 B''). Die durchschnittlich zurückgelegte Strecke von Latrunculin A behandelten GFP- α -Tubulin-Zellen betrug nur noch 1,90 +/- 0,61 μ m/min (n=12). Dies ist aber noch etwas mehr als im Falle der GFP-DdLIS1-Mutanten, die nur 1,31 +/- 0,46 μ m/min (n=10) zurücklegten. *Dictyostelium* Amöben benötigen also zur Zellbewegung ein intaktes Aktin-Cytoskelettsystem, die Mikrotubuli scheinen dagegen nur für die Direktionalität der Bewegung notwendig zu sein.

3.3.7.3 DdLIS1 exprimierende GFP-Aktin-Zellen zeigen eine veränderte Aktindynamik

Die aus der Überexpression von DdLIS1 resultierenden Motilitätsdefekte sind also nicht durch die beobachtete Mikrotubulidisorganisation erklärbar. Gleichzeitig zeigten mit Latrunculin A behandelte Zellen eine dramatische Reduktion der Zellmotilität. Es lag daher nahe, dass die Überexpression von DdLIS1 die Aktindynamik verändert. Zur Analyse der Aktindynamik wurden GFP-Aktin-Zellen (Westphal *et al.*, 1997) mit dem MBP-DdLIS1 Expressionsvektor transformiert. Die Aktindynamik wurde durch 4D-Konfokalmikroskopie unmittelbar an der Zell/Glas-Kontaktfläche in den resultierenden GFP-Aktin/MBP-DdLIS1-Doppelmutanten visualisiert. Entsprechend der Wildtypsituation ist in den sich frei auf einer Glasoberfläche bewegenden GFP-Aktin-Kontrollzellen das GFP-Aktin an der Zellperipherie in Filopodien und Lamellipodien konzentriert (Westphal *et al.*, 1997) (Abbildung 37 A). Im Gegensatz dazu ist in den GFP-Aktin/MBP-DdLIS1-Mutanten eine veränderte Aktindynamik festzustellen (Abbildung 37 B). Wellen von F-Aktin ziehen über den gesamten Beobachtungszeitraum von 24 Minuten über die Zellunterseite. Diese dynamische Organisation von Aktin an den Stellen des

Zell/Substrat-Kontakts reflektiert die Änderungen in der Größe und Art dieser Kontaktstellen. Die Wellenmuster entstehen typischerweise aus punktförmigen Proteinaggregaten auf der Unterseite der Zellen, die im ersten Bild der Zeitserie (Abbildung 37 B) deutlich sichtbar sind. Sobald gebildet, können sich die Wellen ausdehnen, wieder abnehmen, zusammenziehen oder von neuem vergrößern. Die gleiche veränderte Aktindynamik wurde auch in GFP-Aktin-Mutanten beobachtet die ein N- bzw. C-terminal verkürztes MBP-DdLIS1-Fusionsprotein exprimierten (MBP-DdLIS1 Δ N und MBP-DdLIS1 Δ C; Daten nicht gezeigt).

In AX2-Zellen ist diese pulsartige Aktindynamik ein sehr seltenes Ereignis, das im Rahmen dieser Arbeit nie beobachtet werden konnte, obwohl dieses Phänomen in der Literatur auch an AX2-Zellen beschrieben wurde (Bretschneider *et al.*, 2002; Vicker, 2002b). Durch eine Verringerung des F-Aktin Gehalts der Zellen aufgrund der Behandlung mit geringen Mengen von Latrunculin A (0,2 μ M), die ausreichend war, um die Motilität von Kontrollzellen nahezu zum Erliegen zu bringen (Abbildung 36 B), konnte die wellenförmige Aktindynamik zuverlässig induziert werden (Abbildung 37 C). Die durch Latrunculin A Behandlung induzierte veränderte Aktindynamik war nicht von der in den GFP-Aktin/MBP-DdLIS1-Zellen beobachteten zu unterscheiden (Abbildung 37 B und C).

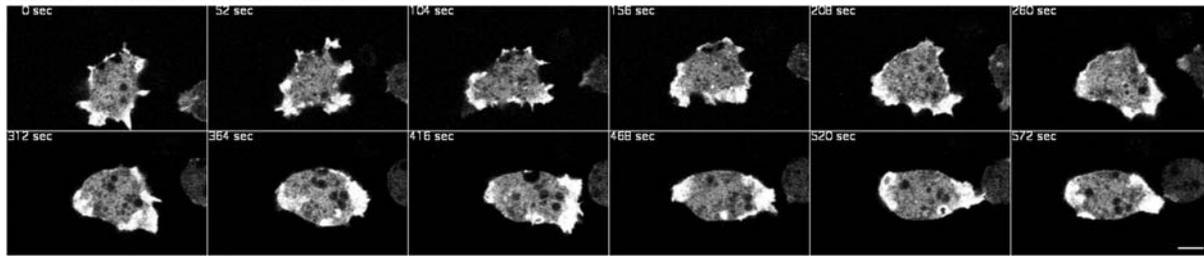
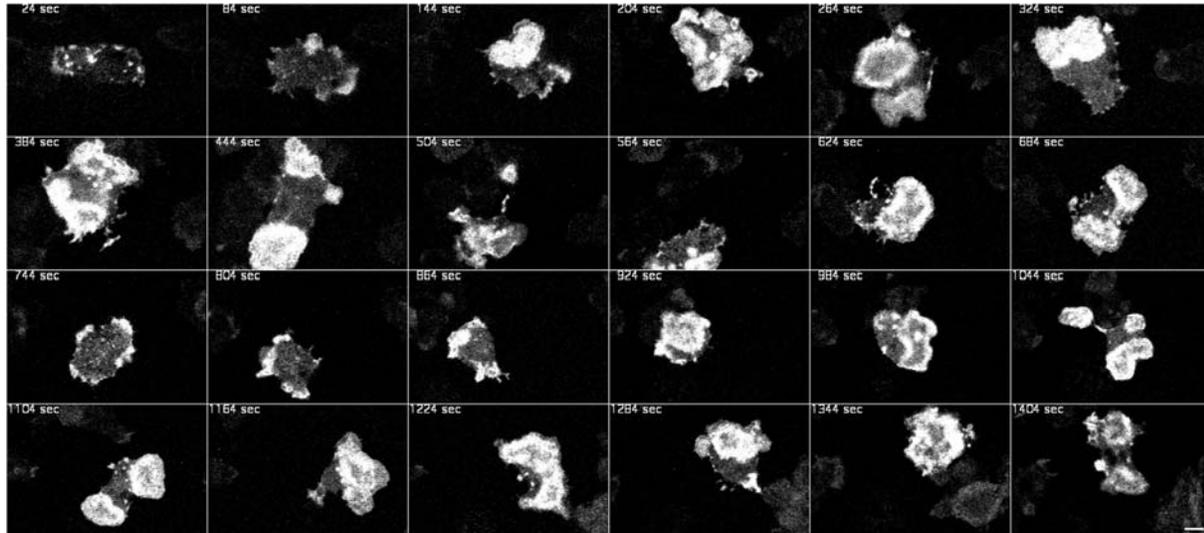
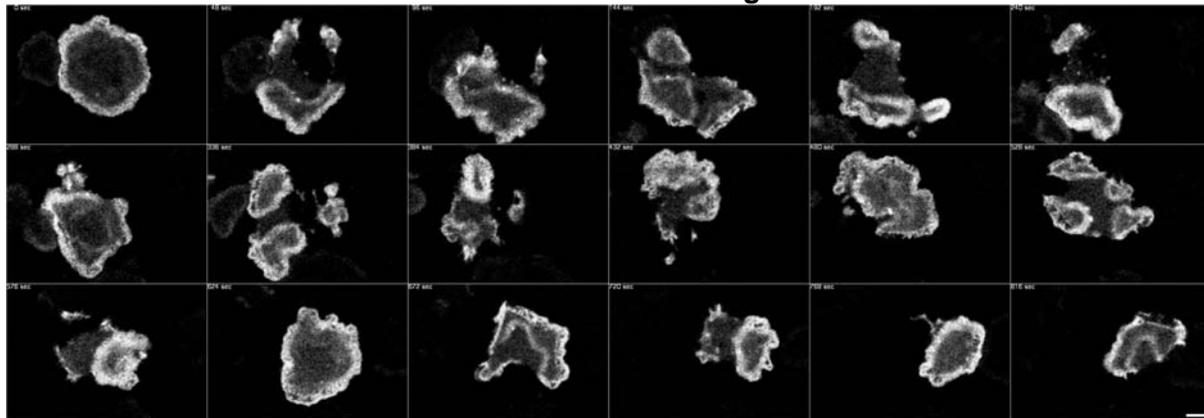
A. GFP-Aktin-Kontrollzelle**B. GFP-Aktin/MBP-DdLIS1-Mutante****C. GFP-Aktin-Kontrollzelle / Latrunculin A Behandlung**

Abbildung 37 und Film_Abb37: GFP-Aktin/MBP-DdLIS1-Mutanten zeigen eine veränderte, wellenförmige Aktindynamik. 4D-konfokalmikroskopische (Zeiss 510Meta) Lebendbeobachtung der Aktindynamik von (A) GFP-Aktin-Kontrollzellen, (B) GFP-Aktin/MBP-DdLIS1-Mutanten und (C) Latrunculin A (0,2 μ M) behandelten GFP-Aktin-Zellen, in Medium. Die Ebene der Konfokalaufnahme war unmittelbar oberhalb der Glasoberfläche, so dass in Zellarealen nahe der Glasoberfläche zweidimensionale Muster der Aktinorganisation erhalten wurden.

3.3.7.4 F-Aktin Verteilung und Gehalt sind in GFP-DdLIS1-Mutanten verändert

Zu einer genauen Analyse des F-Aktin Gehalts wurden GFP-DdLIS1-Mutanten mit TRITC-Phalloidin gefärbt und Fluoreszenz-Intensitätsprofile von konfokalmikroskopischen Aufnahmen der Zellen angefertigt.

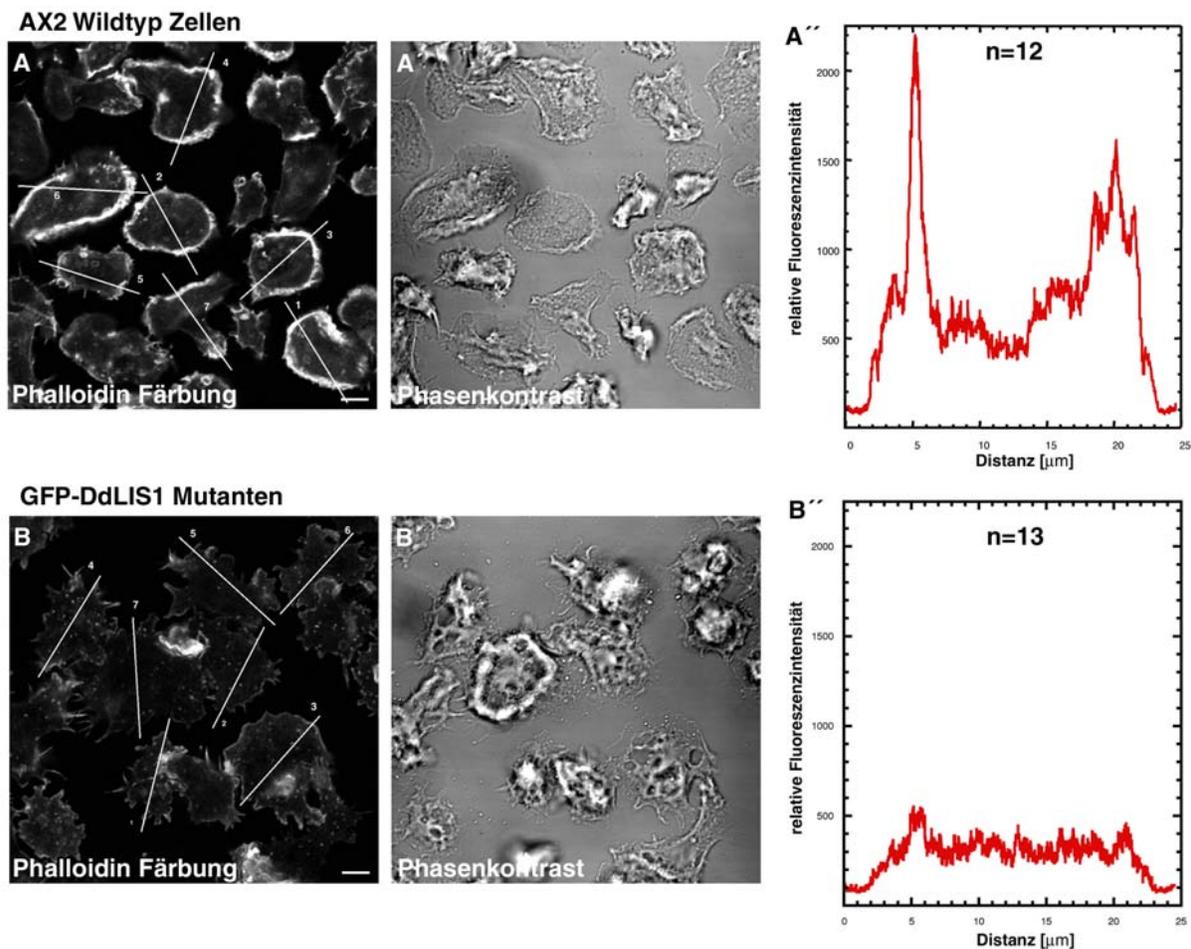


Abbildung 38: Die Verteilung und der Gehalt von F-Aktin sind in GFP-DdLIS1-Mutanten verändert. Gezeigt ist eine konfokale Aufnahme (Zeiss 510Meta) von TRITC-Phalloidin gefärbten AX2-Kontrollzellen (A) und GFP-DdLIS1-Mutanten (B). (A' und B') sind die korrespondierenden Hellfeldaufnahmen. Die Ebene der Konfokalaufnahme ist unmittelbar oberhalb der Glasoberfläche. Der Gehalt an F-Aktin wurde durch Fluoreszenz-Intensitätsprofile entlang einer Linie in 12 (A'') bzw. 13 (B'') Fällen in 2 unabhängigen Experimenten ermittelt (ImageJ Programm). Die erhaltenen Werte der jeweiligen Zellpopulation wurden gemittelt. In (A) und (B) sind beispielhaft sieben Zellen mit den Linien gezeigt, entlang derer die Fluoreszenz-Intensitätsprofile ermittelt wurden. Im Falle der AX2-Wildtypzellen (A'') ergibt dies zwei Maxima, die mit den Zellrändern übereinstimmen. In den GFP-DdLIS1-Mutanten (B'') ist das Fluoreszenzprofil flacher, mit sehr schwachen Maxima an den Zellrändern. Formaldehyd-Aceton-Fixierung; Maßstab, 2 µm.

Die Daten von mehreren Kurven wurden gemittelt und mit denen von AX2-Kontrollzellen verglichen (Abbildung 38). Dabei zeigten sich große Unterschiede im Gehalt und der Verteilung von F-Aktin. GFP-DdLIS1-Mutanten wiesen einen deutlich reduzierten F-Aktin Gehalt auf (Abbildung 38 B und B''). Zudem war das F-Aktin gleichmäßiger über die Zellen verteilt und nur schwach in der Zellperipherie angereichert, während F-Aktin bei AX2-Kontrollzellen deutlich in der Zellperipherie konzentriert war (Abbildung 38 A und A'').

3.3.7.5 DdLIS1 Expression verändert den F-Aktin/G-Aktin Gehalt ähnlich wie eine Behandlung mit Latrunculin A

Der Einfluss der DdLIS1-Überexpression auf die Aktinorganisation wurde biochemisch bestätigt. Dazu wurden adherente Zellen mit Triton-X-100 lysiert und die F-Aktin Menge in dem nach Ultrazentrifugation erhaltenen Triton-X-100-unlöslichen 100000 g-Pellet mit dem Gehalt an G-Aktin im Überstand verglichen. Aktin wurde auf einem Immunoblot mit dem monoklonalen anti-Aktin Antikörper 224-236-1 (Westphal *et al.*, 1997) nachgewiesen. Im Wildtypzustand lag der Großteil des Aktins als F-Aktin im Pellet vor, während sich nur wenig Aktin als G-Aktin oder kurze F-Aktin Filamente im Überstand befand (Abbildung 39). Eine Behandlung mit 2 μM Latrunculin A führte zu einer fast vollständigen Deassemblierung des F-Aktins (Abbildung 39). Die Inkubation der Zellen mit 0,2 μM Latrunculin A, derjenigen Konzentration, die auch die Motilität von AX2-Wildtypzellen nahezu zum Erliegen brachte (Abbildung 36) und die veränderte wellenförmige Aktindynamik in GFP-Aktin-Zellen induzierte (Abbildung 37 C), führte auch zu einer deutlichen Verschiebung des F-Aktin/G-Aktin Verhältnisses. F- und G-Aktin lagen hier in etwa gleichen Mengen vor (Abbildung 39). Ein vergleichbares F-Aktin/G-Aktin Verhältnis lag auch in den MBP-DdLIS1 ΔC - und MBP-DdLIS1-Zellen vor.

Die Überexpression von DdLIS1 oder von Fragmenten dieses Proteins führt also zu einer Verringerung des F-Aktin Gehalts, die ursächlich für die beobachtete Veränderung der Aktindynamik und den Zellmigrationsdefekt sein könnte.

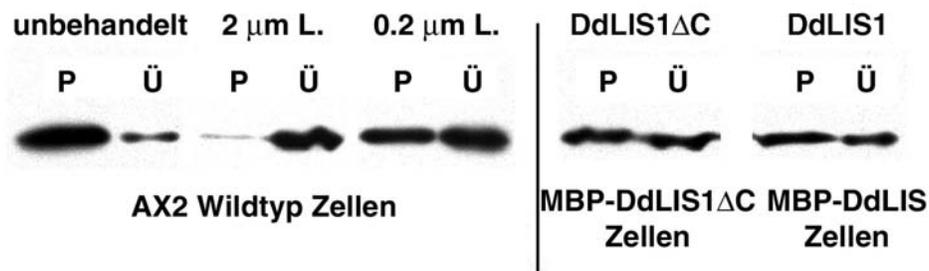


Abbildung 39: Überexpression von DdLIS1 führt zu einer Reduktion des F-Aktin Gehalts, ähnlich wie eine Behandlung mit Latrunculin A. Das Triton-X-100-unlösliche Cytoskelett wurde durch Ultrazentrifugation (50000 rpm, Beckman UZ, TLA100.3) aus adherenten Zellen präpariert. Dazu wurden unbehandelte AX2-Kontrollzellen, mit 2,0 μM bzw. 0,2 μM Latrunculin A behandelte AX2-Zellen und MBP-DdLIS1 ΔC bzw. MBP-DdLIS1-Mutanten verwendet. Pellet und Überstand wurden in gleichen Mengen auf ein 12.5 % Acrylamidgel geladen und nach Elektrophorese geblottet. Aktin wurde mit dem monoklonalen anti-Aktin Antikörper 224-236-1 (Westphal *et al.*, 1997) detektiert. Das so erhaltene Pellet (P) repräsentiert den F-Aktin Gehalt, der Überstand (Ü) den G-Aktin Gehalt der Zellpopulation.

3.3.8 Überexpression der intermediären Dyneinkette führt zu Störung der Mikrotubuli/Zellcortex Verankerung und einer Veränderung des Aktin-Cytoskelett

Die Ähnlichkeiten der Phänotypen der DdLIS1- und der Dynein-Überexpressionsmutanten (Koonce *et al.*, 1999; Ma *et al.*, 1999) führten zu der Frage, ob möglicherweise der Dynein/Dynaktin Komplex selbst nicht nur für die Mikrotubuli/Zellcortex Interaktion benötigt wird, sondern auch an der Regulation der Aktindynamik beteiligt ist. Dazu wurden Mutanten erzeugt, die den von Ma *et al.* (1999) beschriebenen entsprechen. So zeigen Zellen, die ein C-terminal deletiertes Fragment der intermediären Dyneinkette (DIC ΔC -myc) exprimieren, eine Disorganisation des Mikrotubuli-Cytoskeletts (Abbildung 40 A, A') und weisen zusätzlich ein verändertes Aktin-Cytoskelett auf (Abbildung 40 B, B'; C, C').

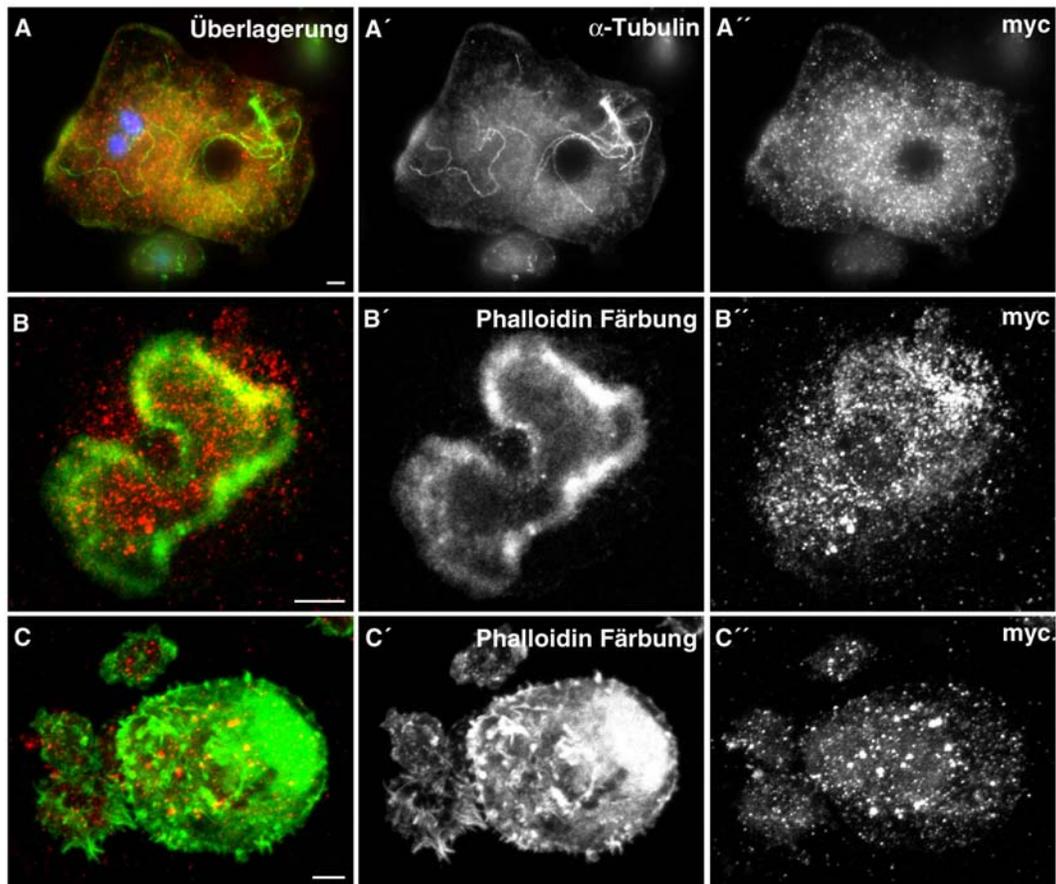


Abbildung 40: DIC Δ C-myc-Mutanten zeigen MT Disorganisation (A) und ein verändertes Aktin-Cytoskelett (B und C). In der Überlagerung ist die Mikrotubuli-Färbung (A) mit dem monoklonalen anti- α -Tubulin Antikörper YL1/2 und in (B) und (C) die F-Aktin-Färbung mit TRITC-Phalloidin grün dargestellt. Die Färbung mit dem monoklonalen anti-c-myc Antikörper 9E10 (Evan *et al.*, 1985) ist rot abgebildet. In (A) ist die DNA-Färbung (DAPI) in blau gezeigt. Bild (A) ist eine epifluoreszenzmikroskopische Aufnahme (Zeiss Axiovert). (B) und (C) sind Konfokalaufnahmen (Zeiss 510Meta). Formaldehyd-Aceton-Fixierung ; Maßstab 2 μ m.

4. Diskussion

4.1 Untersuchung von *D. discoideum* EB1

4.1.1 Domänenanalyse und Bindungspartner von DdEB1

Ähnlich wie die anderen Mitglieder der EB1-Proteinfamilie ist DdEB1 ein Mikrotubuli-assoziiertes Protein, das hauptsächlich an den Mikrotubuliden konzentriert ist. Seine, verglichen mit allen anderen EB1-Homologen nahezu doppelte Größe und seine Rolle als integraler Bestandteil des Centrosoms machen DdEB1 jedoch zu einer Ausnahme. Der Sequenzvergleich mit dem humanen EB1 zeigt, dass die ersten 122 Aminosäuren, inklusive der darin liegenden Mikrotubuli-Bindungsstelle (Hayashi und Ikura, 2003; Juwana *et al.*, 1999), hoch konserviert sind (Abbildung 6). Die folgende Sequenz ist weniger gut konserviert und enthält Sequenzinsertionen, denen jedoch keine Funktion zugeordnet werden konnte. Die C-terminale Sequenz enthält eine „coiled-coil“-Domäne, die für alle EB1-Proteine vorhergesagt wurde. Obwohl sowohl die Deletion der N-terminalen Mikrotubuli-Bindungsdomäne als auch die Deletion des C-terminalen Teils, einschließlich der „coiled-coil“-Domäne, die DdEB1 Bindung an Mikrotubuli verhinderte, waren die verkürzten Proteine immer noch am Centrosom lokalisiert (Abbildung 11). Somit scheint die centrosomale Bindung von DdEB1 unabhängig von der Homo-Oligomerisierung zu sein, die von der „coiled-coil“-Domäne vermittelt wird (Abbildung 12). Die für die centrosomale Lokalisation verantwortliche Domäne liegt höchstwahrscheinlich in dem Sequenzabschnitt, der sowohl in der C- als auch in der N-terminal verkürzten Mutante vorhanden ist (Aminosäure 129-281).

Die DdEB1-Deletionsmutanten zeigten klar, dass die N-terminale Mikrotubuli-Bindungsstelle nicht die einzige Determinante für die DdEB1-Mikrotubuli-Assoziation darstellt. Die zwei GFP-Deletionsmutanten GFP-DdEB1 Δ 328C und GFP-DdEB1 Δ 281C, die sich nur durch die Anwesenheit der „coiled-coil“-Domäne unterschieden, zeigten, dass der C-terminale Teil hinter der „coiled-coil“-Domäne für keine der beobachteten DdEB1-Lokalisationen benötigt wird. Dagegen ist die „coiled-coil“-Domäne essentiell für die Bindung an Mikrotubuli (Abbildung 11). Die Untersuchungen der bakteriell exprimierten MBP-DdEB1-Fusionsproteine ergab, dass die „coiled-coil“-Domäne die Bildung eines DdEB1-Homo-Oligomers, höchstwahrscheinlich eines

Tetramers, vermittelt (Abbildung 12). Diese Oligomerisierung scheint *in vivo* eine Voraussetzung für die Mikrotubulibindung zu sein. Die intermolekularen Wechselwirkungen zwischen den einzelnen DdEB1 Ketten könnten ähnlich ablaufen wie für andere homotetramere “coiled-coil”-Proteine, wie zum Beispiel für das „bcr protein“, das „cartilage matrix protein“ oder das virale NSP4-Protein (Beck *et al.*, 1997; McWhirter *et al.*, 1993; Taylor *et al.*, 1996) beschrieben. Die Anwesenheit der “coiled-coil”-Domäne in allen EB1-Proteinen spricht dafür, dass eine Homo-Oligomerisierung generell für die Bindung von EB1 an Mikrotubuli benötigt wird.

Trotz seiner Fähigkeit, direkt an Mikrotubuli zu binden (Juwana *et al.*, 1999), ist es möglich, dass andere Bindungspartner wie XMAP215-Proteine (Ohkura *et al.*, 2001) die Anwesenheit von EB1 an Mikrotubulienden, an den Kinetochoren und am Centrosom vermitteln. Das XMAP215-Homologe in *Dictyostelium*, DdCP224, wurde zunächst als centrosomales Protein beschrieben (Gräf *et al.*, 2000b). In der vorliegenden Arbeit konnte zum ersten Mal eine Colokalisation von XMAP215- und EB1-Proteinen an den Mikrotubulienden, dem Centrosom und den Kinetochoren gezeigt werden (Abbildung 7 und 14). Diese Colokalisation ist möglicherweise auf das Zusammenwirken beider Proteine in einem Proteinkomplex zurückzuführen. Tatsächlich wurde das Bäckerhefe EB1 (Bim1p) als Interaktionspartner von Stu2p (XMAP215 in Bäckerhefe) in einem “Two-hybrid-screen” gefunden (Chen *et al.*, 1998), aber bis zu dieser Arbeit konnte diese Interaktion nicht biochemisch bestätigt werden. Das Vorhandensein eines stabilen cytosolischen DdEB1/DdCP224 Komplexes (Abbildung 14 und 15) kann sowohl auf einer direkten Interaktion als auch auf einer indirekten Bindung beider Proteine beruhen. Es ist nicht auszuschließen, dass weitere Bindungspartner an einer indirekten DdEB1/DdCP224 Interaktion beteiligt sind. So interagierten beide Proteine nicht in einem Hefe “Two-hybrid”-Test (Daten nicht gezeigt). Auch zeigen die konfokalen Bilder, dass die Lokalisation der beiden Proteine nicht exakt übereinstimmt. DdCP224 lokalisiert an beiden Enden der Mikrotubuli etwas weiter distal von DdEB1, also an den Mikrotubulienden weiter außen und am Centrosom näher an der centrosomalen Zentralstruktur (Abbildung 14). Diese Daten lassen darauf schließen, dass DdCP224 und DdEB1 zumindest durch einen zusätzlichen Bindungspartner verbunden werden. Ein möglicher Kandidat wäre Dynein, da die schwere Dyneinkette (DHC) sowohl mit DdCP224 als auch mit DdEB1 interagiert (Abbildung 15 und 33). DdEB1 interagiert zusätzlich auch mit der intermediären Dyneinkette (Abbildung 15). Diese EB1 Interaktionen wurden im Säugersystem und in der Bäckerhefe bestätigt. So coimmunpräzipitieren Dynein- und Dynaktin-

Untereinheiten, wie p150glued, mit EB1 (Askham *et al.*, 2002; Berrueta *et al.*, 1999). Mutationen im *BIMI*-Gen waren zusammen mit Deletionen in bestimmten Dynein- (*DHCl*) und Dynaktin- (*ACT5*) Genen synthetisch lethal (Muhua *et al.*, 1998). Die Interaktionen von DdEB1 mit Dynein/Dynaktin könnten auch die Colokalisation mit Aktin in aktiven Pseudopodien erklären (Abbildung 7 und vgl. auch Abbildung 8), da Dynaktin-Untereinheiten mit dem cortikalen Aktin-Cytoskelett interagieren können. (Garces *et al.*, 1999; Goode *et al.*, 2000).

4.1.2 DdEB1 Funktion bei der Mitose

Der Phänotyp der *DdEB1Δ*-Mutanten wies darauf hin, dass DdEB1 seine Hauptfunktion während der Mitose ausübt. Das Fehlen von DdEB1 führte zu einer signifikanten Verzögerung der Promethaphase (Tabelle 2 und Abbildung 18). Bei *Dictyostelium* findet in der Prometaphase die Ausbildung der mitotischen Spindel statt, deren Elongation am Übergang zur Metaphase die beiden Spindelpole trennt (Ueda *et al.*, 1999). Die von der Abwesenheit von DdEB1 hervorgerufene Störung der Prometaphase ähnelt dem Phänotyp von *Dictyostelium* Zellen, die mit Mikrotubuli depolymerisierenden Chemikalien behandelt wurden. Diese Behandlung führt zu einer Blockade der Spindelbildung und dem Fortschreiten der Prometaphase. Die in der Prophase ablaufende Centrosomenverdopplung ist dagegen nicht gestört (Kitanishi *et al.*, 1984; Welker und Williams, 1980). Wegen des Fehlens eines Spindel-„checkpoints“ in *Dictyostelium* (Ma *et al.*, 1999; Welker und Williams, 1980) durchlaufen die Zellen auch die nächsten Zellzyklen, ohne dass es zu einer regulären Karyokinese und Cytokinese kommt. Daraus resultieren stark vergrößerte Zellen mit multiplen Zellkernen oder großen, irregulär geformten Kernen (Kitanishi *et al.*, 1984; Kitanishi-Yumura *et al.*, 1985). Da Mikrotubuli nur für die Spindelbildung und damit zur Trennung der duplizierten Centrosomen, nicht aber für die Centrosomenverdopplung selbst benötigt werden, sind die Kerne in solchen Zellen oft mit mehreren verdoppelten, aber nicht voneinander getrennten Centrosomen assoziiert. Dies ist auch in den *DdEB1Δ*-Mutanten der Fall (Abbildung 17). Der *DdEB1Δ*-Phänotyp war in denjenigen Zellen am schwerwiegendsten, die sobald als möglich nach der Transformation und Selektion der Transformanden betrachtet wurden (d.h. nach ca. 2 Wochen). In einer beträchtlichen Anzahl der Zellen schien die Spindelbildung vollständig blockiert zu sein. Bei zunehmender Kultivierungsdauer der Mutanten kam es zu einer teilweisen Kompensation dieses Phänotyps, wahrscheinlich aufgrund eines

starken Selektionsdrucks gegen diesen schweren Defekt. Vermutlich wurde in diesen Zellen die Expression von Proteinen verändert, die im selben Kontext agieren. Nach zwei Monaten war der *DdEB1A*-Phänotyp stabil. Aberrante Mitosen traten nur noch sehr selten auf und die Spindelbildung war nur noch selten blockiert, aber stets signifikant verlangsamt. Die Geschwindigkeit der Spindelelongation war jedoch normal (Abbildung 18). DdEB1 wird also zur Ausbildung der Mitosespindel, nicht aber für deren Elongation benötigt. Diese Rolle von DdEB1 wurde von Resultaten bei *Drosophila* und Bäckerhefe bestätigt. So führte die Reduzierung von *Drosophila* EB1 (DmEB1) durch RNAi-Behandlung von *Drosophila* S2 Zellen oder durch anti-DmEB1 Antikörperinjektion in Embryonen zu schweren Defekten bei der Spindelbildung (Rogers *et al.*, 2002). Die DmEB1-Depletion durch RNAi führte auch zu einer Verringerung der Mikrotubulidynamik in Interphase-Zellen. Bei Bäckerhefe war bei *bim1A*-Mutanten die Ausbildung der bipolaren Prä-Anaphase-Spindel verzögert, die Spindelelongation war jedoch nicht betroffen (Muhua *et al.*, 1998; Schwartz *et al.*, 1997). Die *bim1A*-Mutanten wiesen auch kürzere, weniger dynamische Mikrotubuli auf (Tirnauer *et al.*, 1999). Im Gegensatz dazu war das Interphase-Mikrotubuli-Cytoskelett in den *DdEB1A* und in den *DdEB1A*/GFP- α -Tubulin-Mutanten normal. Verglichen mit GFP- α -Tubulin-Zellen (Kimble *et al.*, 2000) traten keine offensichtlichen Unterschiede in der Länge, Verteilung und Dynamik der radialen Interphase-Mikrotubuli auf. Die Interphase-Mikrotubuli haben in *Dictyostelium* eine relativ konstante Länge (Kimble *et al.*, 2000) und zeigen kaum plus-End-Dynamik. Sie werden in der Prophase abgebaut und das spätere Interphase-Mikrotubuli-Cytoskelett der späteren Tochterzelle beginnt sich in der Metaphase neu auszubilden (Roos *et al.*, 1984; Ueda *et al.*, 1999), d.h. nach der Prometaphase Blockade der Spindelbildung bei den *DdEB1A*-Mutanten. Daher wurden keine offensichtlichen Defekte des Interphase-Mikrotubuli-Cytoskeletts erwartet. Obwohl DdEB1 an den Mikrotubulien lokalisiert, spricht die Ausbildung eines normalen Mikrotubuli-Cytoskeletts in den *DdEB1A*-Mutanten gegen eine essentielle Rolle von DdEB1 bei der Verankerung von Mikrotubuli-plus-Enden am Zellcortex.

Die starke centrosomale Präsenz von DdEB1 deutet auf eine zusätzliche Funktion am Centrosom hin. Die *DdEB1A*-Mutanten wiesen jedoch keine centrosomalen Defekte auf, die nicht allein durch den Defekt bei der Spindelbildung erklärt werden könnten. Somit könnte das Centrosom als DdEB1-Reservoir dienen, von dem aus die Verteilung des Proteins zu den auswachsenden plus-Enden erfolgt. Da GFP- α -Tubulin immer an den Prometaphase-Spindelpolen vorhanden war

(Abbildung 17 und 18), wirkt DdEB1 nach der Rekrutierung der ersten α/β -Tubulin Dimere an die neu gebildeten Spindelpole. Zusammengenommen weisen die Daten darauf hin, dass die Hauptfunktion von DdEB1 in der Initiierung des Mikrotubuliwachstums und nicht in deren Verlängerung liegt.

Um die Funktionsweise von DdEB1 besser verstehen zu können sollten weitere DdEB1 interagierende Proteine untersucht werden. Ein guter Kandidat dafür war DdMoe1.

4.2 Untersuchung von *D. discoideum* Moe1

Mit DdMoe1 wurde ein neues Mikrotubuli-assoziiertes und centrosomales Protein von *Dictyostelium* untersucht. Mit einer Aminosäure-Identität von ca. 40 % zu seinen Homologen aus *S. pombe*, Mensch und *C. elegans* ist es ein gut konserviertes Protein (Abbildung 19). Moe1 wurde bislang nur in *S. pombe* untersucht und es liegen bis dato keine Studien in höheren Eukaryonten vor.

Die in den Antikörperstudien festgestellte centrosomale Lokalisation von DdMoe1 konnte in der GFP-DdMoe1-Mutante bestätigt werden (Abbildung 22 und 24). Auch in mitotischen Zellen stimmt die GFP-DdMoe1-Lokalisation mit der Antikörper-Markierung überein (Abbildung 21 und 24). In Interphase-Zellen entspricht die DdMoe1-Lokalisation im Cytoplasma und an der Kernhülle weit gehend mit der von Chen *et al.* (1999) beschriebenen Lokalisation von GFP-Moe1 in *S. pombe* überein, wobei erwähnt werden muss, dass in *S. pombe* die Lokalisation von GFP-Moe1 wegen der schlechten Bildqualität nicht völlig klar wird. GFP-DdMoe1 findet sich bei *Dictyostelium* am Rand des Kerns in Strukturen, bei denen es sich höchstwahrscheinlich um die Nukleoli handelt (Sameshima, 1985) und außerhalb des Kerns, an der Kernhülle, wo das raue endoplasmatische Retikulum lokalisiert ist (Abbildung 24). Diese Lokalisation wird anscheinend erst durch die starke Überexpression sichtbar und reflektiert möglicherweise eine von (Bandyopadhyay *et al.*, 2002) beschriebene Rolle von Moe1 bei der Assemblierung von Untereinheiten des Translationsinitiationsfaktors eIF3. Die cytoplasmatische GFP-DdMoe1 Fraktion könnte somit zumindest teilweise an Ribosomen gebunden sein. Anders als das endogene DdMoe1 zeigt das GFP-Fusionsprotein, wie sein *S. pombe*-Homolog, keine Lokalisation an Mikrotubuli (Abbildung 21 und 24). Möglicherweise liegt hier eine sterische

Behinderung der Mikrotubulibindung durch das GFP-Protein vor. Die dazu im Widerspruch stehende Präsenz des Fusionproteins an der Mitosespindel (Abbildung 24 B) könnte dadurch erklärt werden, dass die Bindung an Interphase-Mikrotubuli bzw. Spindelmikrotubuli über andere Proteindomänen erfolgen könnte oder dass die Bindung an Interphase- und Spindelmikrotubuli über unterschiedliche Mikrotubuli-assoziierte-Proteine vermittelt wird und das GFP-„Tag“ nur im Falle der Interphase-Mikrotubuli interferiert. Die Überexpression von GFP-DdMoe1 hatte keinen Einfluss auf Stabilität oder Organisation der Mikrotubuli oder des Centrosoms. Über einen Überexpressionsphänotyp bei *S. pombe* gibt es keine Berichte. Es wurden jedoch schwere Mikrotubulidefekte für die entsprechende Nullmutante beschrieben (Chen *et al.*, 1999).

In Analogie zum *S. pombe* System wurde mit DdMoe1 ein potentieller Interaktionspartner von DdEB1 kloniert. Diese Interaktion konnte jedoch unter Benutzung aller sinnvollen Assays, einschließlich des Hefe-„Two-Hybrid“-Tests nicht bestätigt werden. Auch ist die DdMoe1-Lokalisation *in vivo* nicht vom Vorhandensein von DdEB1 abhängig (Abbildung 25). Chen *et al.* (1999) schlugen vor, dass Moe1 über Mal3 an die Mikrotubuli lokalisiert wird, um dort einen Einfluss auf die Mikrotubulistabilität ausüben zu können, obwohl eine Mikrotubuli-Lokalisation von Moe1 in *S. pombe* nicht gezeigt werden konnte. Unsere Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass DdEB1 und DdMoe1 nicht oder nur sehr transient interagieren. Bei *Dictyostelium* scheint DdMoe1 ein essentielles Protein zu sein, da trotz zahlreicher Versuche keine Nullmutanten erzeugt werden konnten. Dies könnte sowohl mit seinem möglichen Einfluss auf die Stabilität und Organisation der Mikrotubuli als auch mit seiner Rolle als Bestandteil des Translationsinitiationskomplexes (Bandyopadhyay *et al.*, 2002) erklärt werden. Auch eine kürzlich gefundene mögliche Rolle von Moe1 für die Funktion des Proteasoms (Yen *et al.*, 2003) bei der für das Durchlaufen des Zellzyklus notwendigen Degradierung mitotischer Regulatoren, würde eine essentielle Rolle von DdMoe1 erklären. Alle drei Funktionen könnten auch die beobachtete verlängerte Generationszeit der GFP-DdMoe1-Überexpressionsmutanten erklären.

4.3 Untersuchung von *D. discoideum* LIS1

4.3.1 DdLIS1 ist ein integraler Bestandteil des Centrosoms

Wie DdMoe1 und DdEB1 sind auch DdCP224, DdLIS1 und Dynein (DHC) echte centrosomale Proteine (Abbildung 28). Sowohl die Überexpression von DdCP224 und Dynein (Gräf *et al.*, 2000b; Ma *et al.*, 1999) als auch die von DdLIS1 führt zur Centrosomenamplifikation und zu centrosomalen Aberrationen (Abbildung 30). Diese Proteine haben also eine wichtige Funktion bei der Biogenese des Centrosoms inne. Dies wird in Abschnitt 4.3.3 genauer diskutiert.

Die bei der Lebendzellbeobachtung einer GFP-DdLIS1-Mutante gewonnenen Informationen über die centrosomale Lokalisation von DdLIS1 sind bemerkenswert (Abbildung 29). So legten Studien mit γ -Tubulin exprimierenden Zellen und elektronenmikroskopische Aufnahmen eine vollständige Dissoziation der centrosomalen Corona von der Zentralstruktur in der frühen Prophase, gleichzeitig mit der Freisetzung der Mikrotubuli, nahe (Euteneuer *et al.*, 1998; Ueda *et al.*, 1999) (vgl. Abschnitt 1.4). GFP-DdLIS1 ist jedoch auch während der Prophase als ringförmige Markierung am Centrosom sichtbar. Zusammen mit dem Resultat, dass sich DdLIS1 weiter innerhalb der centrosomalen Corona als DdCP224 und Dynein befindet (Abbildung 28), deutet dies auf eine Assoziation von DdLIS1 mit der centrosomalen Zentralstruktur hin. LIS1 wurde zwar in verschiedenen Zelltypen am Centrosom lokalisiert, bis jetzt wurde aber nicht gezeigt, dass LIS1 eine integrale centrosomale Komponente darstellt (Feng *et al.*, 2000; Niethammer *et al.*, 2000; Sasaki *et al.*, 2000).

4.3.2 DdLIS1 Funktion bei der Mikrotubuli/Zellcortex Verankerung

Der Phänotyp der DdLIS1 überexprimierenden Zellen (Abbildung 31 und 32 A) war nicht von *Dictyostelium* Mutanten zu unterscheiden, die die Motordomäne der schweren Dyneinkette überexprimieren (Koonce *et al.*, 1999; Koonce und Samsó, 1996). Diese Mutanten wiesen ebenfalls ein kollabiertes Interphase-Mikrotubuli-Cytoskelett auf und die Centrosomenbewegungen waren in exakt der gleichen Weise verändert. Derselbe Phänotyp wurde auch nach Überexpression von N- bzw. C-terminalen Fragmenten der intermediären Dyneinkette beobachtet (Ma *et al.*, 1999). Hierbei tritt, wie auch bei Überexpression von

DdLIS1, eine Dispersion des Golgi-Apparates auf (Abbildung 34), der für seine korrekte centrosomale Lokalisation einen funktionellen Dynein/Dynaktin Komplex benötigt (Burkhardt *et al.*, 1997; Corthesy Theulaz *et al.*, 1992; Ma *et al.*, 1999). Normalerweise verbindet die intermediäre Dyneinkette die schwere Dyneinkette mit der p150^{glued}-Dynaktin Untereinheit. Die Überexpression von DIC interferiert mit dieser Bindung (Ma *et al.*, 1999). Dynein, das vor kurzem in *Dictyostelium* Zellen am Zellcortex lokalisiert werden konnte (Koonce und Khodjakov, 2003), übt die zum Mikrotubuli-minus-Ende gerichteten Zugkräfte aus, die in Wildtypzellen zur Aufrechterhaltung des radialen Mikrotubuli-Netzwerks mit einem zentral positionierten Centrosom benötigt wird. Aufgrund der Gleichmäßigkeit der radialen, vom Cortex über die Mikrotubuli auf das Centrosom wirkenden Zugkräfte bewegt sich das Centrosom nur wenig aus seiner zentralen Position heraus. Der bei DdLIS1- bzw. Dynein- Überexpression beobachtete Phänotyp beruht vermutlich auf einer Störung der Wechselwirkung von cortikalem Dynein mit den Mikrotubuli, zum Beispiel durch Verlust der cortikalen Dynein-Assoziation aufgrund einer Störung der Dynein/Dynaktin Wechselwirkung (Ma *et al.*, 1999). Dies führt zu einem Kontaktverlust der Mikrotubuli am Zellcortex und verringerten bzw. ungleichmäßigen Zugkräften, die nur noch auf einzelne Mikrotubuli wirken. Dadurch wird das Centrosom schnell in eine Richtung zum Cortex hingezogen, während die übrigen nicht am Cortex verankerten Mikrotubuli wie ein Kometenschweif hinterher gezogen werden (Abbildung 32 A). Wenn in der Folge an anderen Stellen vorhandene, noch funktionelle cortikale Dyneinmoleküle zufällig Kontakt mit einzelnen Mikrotubuli herstellen, kommt es zu erneuter Centrosomenrepositionierung und in der Summe zu den beobachteten schnellen erratischen und kreisenden Bewegungen des Centrosoms. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass bei diesen Bewegungsvorgängen auch cortikale Schubkräfte von plus-End gerichteten Motoren beteiligt sind, auch wenn die dafür notwendigen cortikalen Kinesine bisher nicht nachgewiesen worden sind. Zusätzlich könnten Veränderungen der Polymerisationsdynamik zu längeren Mikrotubuli führen, woraus auch die augenscheinlich flexibleren „wellenförmigen“ Mikrotubuli der Mutanten resultieren könnten (Abbildung 31 und 32 A). So fanden Sapir *et al.* (1997), dass LIS1 *in vitro* die Anzahl der Mikrotubuli „catastrophe events“, d.h. das spontane Depolymerisieren von Mikrotubuli reduziert. Daraus resultierten verlängerte Mikrotubuli. Auch Faulkner *et al.* (2000) fanden *in vivo* nach Überexpression von LIS1 oft stark verlängerte astrale Mikrotubuli.

Die Überexpression von p50, einer weiteren Untereinheit des Dynaktin Komplexes, führt ebenfalls zu einer Disruption der Dynein/Dynaktin Funktion (Burkhardt *et al.*, 1997). Bei *Dictyostelium* Zellen führt dies, wie erwartet, ebenfalls zu einer Delokalisation des Golgi-Apparates und zu dem typisch kollabierten Interphase-Mikrotubuli-Cytoskelett (unpublizierte Arbeit von Julia Kleylein-Sohn und Ralph Gräf). DdLIS1 bindet neben DIC, DHC und DdCP224 (Abbildung 33) auch an p50 (unpublizierte Arbeit von Julia Kleylein-Sohn und Ralph Gräf). Da auch die Überexpression eines C-terminal deletierten DdCP224 Fragments (DdCP Δ C; unpublizierte Arbeit von Andrea Hestermann und Ralph Gräf) zu einem Verlust der Mikrotubuli/Zellcortex Interaktion führt, liegt es nahe, dass diese Proteine zusammen einen funktionellen Komplex bilden. Die beobachteten Phänotypen der DdLIS1-Überexpression, also der Verlust der Mikrotubuli/Zellcortex Interaktion und Golgi-Dispersion können befriedigend mit einer Störung des Dynein/Dynaktin Komplexes erklärt werden, dem zumindest temporär auch DdCP224 und DdLIS1 angehören. Über die Art der DdLIS1 bedingten Störung des Komplexes kann nur spekuliert werden. Möglich ist, dass die Überexpression von DdLIS1 einen dominant-negativen Phänotyp hervorruft. Dies würde jedoch voraussetzen, dass das GFP-Fusionsprotein nicht funktionell ist. Dagegen spricht die korrekte Lokalisation sowohl des GFP-DdLIS1 als auch des MBP-DdLIS1-Fusionsproteins. Möglicherweise werden durch die Überexpression auch andere, DdLIS1 bindende Proteine weg gefangen und stehen nicht mehr an ihrem Wirkungsort zur Verfügung. Alternativ könnte auch ein zu hoher Spiegel an DdLIS1 die Assemblierung des Dynein/Dynaktin Komplexes selbst stören. Möglicherweise interferiert die DdLIS1-Überexpression auch mit einer Rolle von DdLIS1 bei der Signalvermittlung über kleine GTPasen (vgl. Abschnitt 4.3.6) oder der Regulation der Motoraktivität von Dynein.

4.3.3 Spindelaberrationen und Cytokinesedefekte

Neben der gestörten Mikrotubuliorganisation wiesen frisch transformierte GFP-DdLIS1 auch überzählige Centrosomen und schwere Spindeldefekte auf (Abbildung 30). Das Auftreten von riesigen multinukleären Zellen ließ auch auf einen dramatischen Cytokinesedefekt schließen.

Für die beobachtete Centrosomenamplifikation bei DdLIS1-Überexpression gibt es mehrere Erklärungsmöglichkeiten. So könnte das Auftreten von zusätzlichen Centrosomen ein sekundärer Effekt der Störung der Chromosomensegregation sein. Wie auch das humane Protein lokalisiert

DdLIS1 an den Kinetochoren und spielt dort, wie in Säugerzellen gezeigt wurde, eine wichtige Rolle beim Einfangen der Mikrotubulienden an den Kinetochoren (Faulkner *et al.*, 2000). So könnte die DdLIS1-Überexpression eine funktionelle Verankerung der Mikrotubuli an den Kinetochoren, ähnlich wie am Zellcortex, verhindern. Da *Dictyostelium* Zellen keinen Spindel-„checkpoint“ aufweisen (Ma *et al.*, 1999), könnten Zellen ohne erfolgte Karyokinese, aber mit duplizierten Centrosomen wieder in die Interphase eintreten. Daraus sollte eine Erhöhung des DNA-Gehalts der Zellen über den normalen haploiden Chromosomensatz hinaus resultieren. In der Tat finden sich in den DdLIS1-Mutanten vermehrt vergrößerte Zellkerne sowie auch kleinere DNA-Massen (Abbildung 30). Dies spricht dafür, dass tatsächlich eine Störung der Chromosomensegregation vorliegt. Eine zweite Erklärungsmöglichkeit für das Auftreten von überzähligen Centrosomen besteht darin, dass überschüssiges DdLIS1 als Akkumulationspunkt für „vorgefertigte“ cytosolische Centrosomenbausteine, wie z.B. γ -Tubulin Komplexe dient (Gräf, 2001b). Für diese These könnte das Auftreten vieler kleinerer Centrosomen sprechen (Abbildung 30), deren Ultrastruktur jedoch nicht untersucht worden ist. Eine *de novo* Bildung von Centrosomen im Cytosol wurde bisher von keiner Gruppe beobachtet.

Des weiteren können überzählige Centrosomen auch bei der Spindelbildung selbst entstehen. So könnte die Überexpression von DdLIS1 die Spindelpole destabilisieren und ein Spindelpol-„Splitting“ induzieren. Wenn nur einer der beiden resultierenden Spindelpolteile an der Spindelbildung beteiligt war, könnte der zweite als überzähliges Centrosom ins Cytosol freigesetzt werden. Tatsächlich wurden in mitotischen GFP-DdLIS1-Mutanten sehr häufig multipolare Spindeln beobachtet (Abbildung 30). Meist schienen diese zusätzlichen Spindelpole durch eine normal dicke Spindel verbunden. Dies könnte auf einem Auseinanderbrechen der Mitosespindel entlang der Längsachse beruhen. Möglicherweise werden aber auch Mitosespindeln zwischen mehreren nahe beieinander liegenden bzw. aus einer Mehrfachteilung resultierenden Centrosomen ausgebildet. So ist DdLIS1 eventuell auch bei der Spindelbildung selbst beteiligt. Für diese These spricht die Lokalisation entlang der Mikrotubuli und der Einfluss von humanem LIS1 auf die Mikrotubulodynamik, die in stabileren Mikrotubuli resultiert (Sapir *et al.*, 1997). Zusätzlich könnte DdLIS1 die Mitosespindel durch einen Bündeleffekt stabilisieren. Zusammengenommen könnten diese beiden Effekte, vermehrte Spindelbildung und Stabilisation von zusätzlichen bzw. gespaltenen Spindeln, für das Auftreten von multipolaren Mitosespindeln sorgen. Auch in Säugerzellen führte LIS1-Überexpression bzw. Antisense Expression zu einer

Zunahme von multipolaren Spindeln und dem Auftreten von überzähligen Centrosomen (Faulkner *et al.*, 2000). Das Auftreten multipolarer Spindeln war auffällig häufig im Gegensatz zu den DdCP224-Mutanten, in denen multipolare Spindeln nur sehr vereinzelt beobachtet wurden (Gräf *et al.*, 2003). Dies spricht dafür, dass DdLIS1 eine von DdCP224 unterschiedliche bzw. zusätzliche Rolle bei der Centrosomen Biogenese spielt. Dafür kommt die Notwendigkeit von LIS1 für die richtige Funktionsweise des Dynein/Dynaktin Komplexes in Betracht. Bereits seit längerem ist bekannt, dass Dynein und Dynaktin bei der Centrosomenseparation beteiligt sind (Gaglio *et al.*, 1996). Auch bei *Dictyostelium* ist die richtige Funktion von cytoplasmatischem Dynein für die Centrosomenduplikation essentiell. Dies belegten die Deletionsmutanten der intermediären Dyneinkette von Ma *et al.* (1999), in denen Defekte in der Centrosomenreplikation und Separation gefunden worden sind. Eine essentielle Rolle von Dynein/Dynaktin für die Centrosomendynamik wurde auch kürzlich in einer Studie an *Drosophila* Eiern gefunden (Belec *et al.*, 2001).

Der dramatische Cytokinesedefekt, der in den GFP-DdLIS1-Mutanten beobachtet wurde, könnte ebenfalls aus einer aktiven Rolle von DdLIS1 bei der Interaktion von Mikrotubuli-plus-Enden mit cortikalen Verankerungspunkten resultieren. Astrale Mikrotubuli, die von den mitotischen Centrosomen aus organisiert werden, sind für die Spindelpositionierung und die Determination der Teilungsfurche essentiell (Rieder *et al.*, 2001). Dies wird durch die Interaktion der Mikrotubulien mit cortikalem Dynein/Dynaktin vermittelt (Busson *et al.*, 1998). In *Dictyostelium* Zellen ist die Stelle der Teilungsfurchen-Bildung während der Cytokinese durch die Interaktion der von den beiden Spindelpolen ausgehenden astralen Mikrotubuli und deren Interaktion mit dem Zellcortex vorbestimmt (Neujahr *et al.*, 1998). Daher kann das Auftreten großer multinukleärer GFP-DdLIS1-Mutanten durch den nachgewiesenen Defekt in der Mikrotubuli-plus-End/Cortex Wechselwirkung erklärt werden. Zusätzlich könnte die unter DdLIS1-Überexpression veränderte Organisation des Aktin-Cytosketts (Abschnitt 3.3.7) einen weiteren Beitrag zu diesem Cytokinesedefekt leisten.

4.3.4 Das Mikrotubuli-Cytoskelett ermöglicht gerichtete Zellbewegung

Die Störung der Aktin Organisation scheint auch die Ursache für den Motilitätsdefekt der DdLIS1 überexprimierenden Mutanten zu sein (Abbildung 35 B und 36 B). Das Mikrotubuli-

Cytoskelett ist hingegen für die Direktionalität der Zellbewegung wichtig (Abbildung 36 A). Zur Einhaltung der eingeschlagenen Bewegungsrichtung muss in *Dictyostelium* Amöben eine Repositionierung des Centrosoms vor den Kern erfolgen (Ueda *et al.*, 1997). Auch die Centrosomenrepositionierung während der Wundheilung in Epithelzellschichten *in vitro* benötigt Mikrotubuli (Euteneuer und Schliwa, 1992). Die Repositionierung der Centrosomen und die neu einwachsenden Mikrotubuli werden für die Stabilisierung neu gebildeter Pseudopodien benötigt. Dazu existieren mehrere Hypothesen (Zusammenfassung bei Small *et al.* (2002)). So hängt die Bildung von Lamellipodien nicht nur von der Aktin-Polymerisation ab, sondern es wird auch neues Membranmaterial benötigt, das vom trans-Golgi-Netzwerk her entlang der Mikrotubuli transportiert und eingefügt wird. Eine zweite Hypothese besteht darin, dass Mikrotubuli die Aktin-Assemblierung in den Lamellipodien durch das Liefern, oder die lokale Aktivierung von regulatorischen Komponenten beeinflussen (Waterman-Storer *et al.*, 1999) (vgl. Abschnitt 4.3.6).

4.3.5 DdLIS1-Überexpression beeinflusst die Aktindynamik

Ein funktionelles Aktin-Cytoskelett ist bei verschiedenen zellulären Prozessen, wie der Zellmotilität, der Phagozytose, der Makropinozytose und der Cytokinese von grundlegender Bedeutung (Bretschneider *et al.*, 2002). Um diese Funktionen erfüllen zu können, muss einerseits die mechanische Stabilität der Zellen aufrechterhalten werden und andererseits müssen schnelle lokale Veränderungen ermöglicht werden, die zu komplexen Veränderungen der Zellmorphologie führen. Um diese mechanischen Notwendigkeiten zu erfüllen, wird monomeres Aktin reversibel polymerisiert und die resultierenden Aktin-Filamente zusammen mit Proteinen, welche die Dynamik des Netzwerks regulieren bzw. strukturieren, an Membranen, vor allem an der Plasmamembran, verankert. Dabei unterliegt das Aktin-Netzwerk Kontrollmechanismen, die dessen schnelle Assemblierung und Deassemblierung erlauben, während die mechanische Integrität erhalten bleibt. Diese Dynamik wird von verschiedenen regulatorischen Proteinen, wie zum Beispiel einer großen Anzahl von kleinen GTPasen des Rac Typs kontrolliert (Rivero *et al.*, 2001). Des Weiteren sind Proteine beteiligt, die die Aktin-Polymerisation und Depolymerisation direkt beeinflussen, oder die Verzweigung, Quervernetzung und Bündelung von Aktin-Filamenten vermitteln (de Hostos *et al.*, 1993; Faix *et al.*, 1996; Machesky *et al.*, 1994).

Sowohl die Überexpression von DdLIS1 als auch die Inkubation mit geringen Konzentrationen der Aktin-depolymerisierenden Droge Latrunculin A (Spector *et al.*, 1989) führen zum Auftreten veränderter, wellenförmiger Aktindynamik (Abbildung 37). Wie von Vicker *et al.* (1997) und Vicker (2002a und 2002b) beschrieben, kann filamentöses Aktin spontan wellenförmige, oszillierende Strukturen bilden, die sich physikalisch wie selbst organisierte Aktin-Filament-Assemblierungs- und Deassemblierungswellen ausbreiten und die Bildung der Pseudopodien beeinflussen.

In diesen Aktinstrukturen sind auch Aktin-bindende Proteine, wie Arp3 (GFP-Arp3) und Coronin (Coronin-GFP) enthalten, wie von Bretschneider *et al.* (2002) gezeigt werden konnte. Diese Wellenbewegungen sind unabhängig von der Interaktion von Aktin mit Myosin II, da diese auch in Myosin II-Nullmutanten beobachtet werden konnten. Bei diesen Untersuchungen wurden die Aktinwellen ebenfalls durch Latrunculin A Behandlung induziert (Günther Gerisch, persönliche Mitteilung). Die beobachteten Muster zeigen klar die Schnelligkeit der F-Aktin Assemblierung und Deassemblierung, als mögliches Resultat interner Kontrollmechanismen bzw. durch die Veränderung des G-/F-Aktin Gleichgewichts nach Behandlung mit Latrunculin A.

4.3.6 DdLIS1 ist bei der Kontrolle der Aktindynamik durch kleine GTPasen beteiligt

Die Aktindynamik, zum Beispiel während der Cytokinese, wird in eukaryotischen Organismen von kleinen GTP-bindenden Proteinen der Ras und Rho Familien kontrolliert. (Zusammenfassungen bei Field *et al.* (1999), Glotzer (1997) und Prokopenko *et al.* (2000)). Wie andere GTPasen fungieren diese Proteine als molekulare Schalter, die vom inaktiven GDP-gebundenen in den aktiven GTP-gebundenen Zustand wechseln können (Boguski und McCormick, 1993). Die Aktivierung erfolgt durch GEFs („guanine nucleotide exchange factors“), die Inaktivierung wird durch die Aktivität von GAPs („GTPase activating proteins“) vermittelt. RhoGTPasen sind die Hauptregulatoren von F-Aktin, abhängig von extrazellulären Stimuli (Bishop und Hall, 2000). Die GTPasen Rac1 und Cdc42 fördern die Aktin-Polymerisation am vorderen, aktiven Ende der Zellen („leading edge“), wobei RhoA als Antagonist fungiert und das Zurückziehen des „leading edge“ sowie die Assemblierung von Stressfasern fördert (Schmitz *et al.*, 2000). Diese GTPasen sind in einer linearen Reaktionskaskade angeordnet (Chant und Stowers, 1995). Aktivierung von Cdc42 führt zu einer

Stimulation der Rac-Aktivität, die wiederum die Aktivierung von Rho fördert (Nobes und Hall, 1995). Die „upstream“ Ereignisse, die zu einer Aktivierung der GTPasen führen, sind gut verstanden. Weniger ist jedoch über die molekularen Ereignisse bekannt, die zur tatsächlichen Modulation des Aktin-Cytoskeletts führen.

Bei *Dictyostelium* wurden bisher keine Cdc42- oder Rho-Homologen identifiziert, dafür finden sich eine große Anzahl Rac-ähnlicher Proteine (Bush *et al.*, 1993; Laroche *et al.*, 1996; Rivero *et al.*, 1999). Die Rac1-GTPasen bei *Dictyostelium* sind zu mehr als 90 % miteinander identisch und weisen zum menschlichen Rac1 die größte Ähnlichkeit auf (Bush *et al.*, 1993).

Vor kurzem wurde von Jan Faix (Adolf-Butenandt-Institut/Zellbiologie, LMU München) ein neues RacGEF gefunden. RacGEF-Nullmutanten zeigen wie die DdLIS1-Mutanten schwere Cytokinesedefekte (Faix, 2002) und das Auftreten von dynamischen Aktinwellen (persönliche Mitteilung Jan Faix). Dies war, neben der offensichtlichen Deregulation der Aktindynamik in den DdLIS1-Mutanten, Anlass für uns, nach Abschluss des experimentellen Teils dieser Arbeit in Zusammenarbeit mit Jan Faix eine Beteiligung von DdLIS1 an einem Signaltransduktionsweg zu untersuchen. Dabei konnte tatsächlich eine starke direkte Interaktion von DdLIS1 mit Rac1A gezeigt werden (Gräf, Rehberg und Faix, unpublizierte Daten).

Zeitgleich zur vorliegenden Arbeit wurde in neuronalen Zellkulturen gezeigt, dass der Migrationsdefekt von LIS1-haploinsuffizienten Neuronen ebenfalls auf einer Störung der Aktin-Polymerisation beruht (Kholmanskikh *et al.*, 2003). In diesen Neuronen ist der F-Aktin Gehalt an den wachsenden Enden bei einer gleichzeitig reduzierten GTP-Rac1 und GTP-Cdc42 Aktivität und einer erhöhten RhoA Aktivität vermindert. Der Zellmigrationsdefekt, der reduzierte F-Aktin Gehalt am „leading edge“ und ein Defekt im Auswachsen des Axons konnten durch pharmakologische Hemmung der RhoA-Aktivität und daraus resultierenden erhöhten Rac1 und Cdc42 Aktivitäten aufgehoben werden. Es wurde aber bisher kein direkter Nachweis geführt, dass LIS1 direkte Bindungspartner in einer GTPase abhängigen Signaltransduktionskaskade hat. Kholmanskikh *et al.* (2003) folgern, dass LIS1 die Aktin-Polymerisation normalerweise dadurch fördert, indem es aktivierend in den Signalweg eingreift, welcher die RhoA Aktivität suprimiert. Generell führten Über- bzw. Unterexpression von LIS1 zu ähnlichen Phänotypen (Faulkner *et al.*, 2000). Unsere Ergebnisse lassen die Hypothese zu, dass die Rac1A vermittelte F-Aktin Polymerisation durch DdLIS1-Überexpression gestört wird. Möglicherweise ist DdLIS1 bei der Lokalisation von Rac1A beteiligt, dies muss jedoch noch experimentell überprüft werden.

Anders als das regulatorische Aktin-Bindeprotein Coronin, das - wie DdLIS1 - ein Protein der WD40-Familie ist (de Hostos *et al.*, 1991), bindet rekombinantes DdLIS1 nicht direkt an Aktin (Daten nicht gezeigt). Es ist aber möglich, dass DdLIS1 im Zusammenspiel mit cortikalem Dynein/Rac1A am Zellcortex lokalisiert und dort seine Aktivierung unterstützt, da die DIC Δ C-myc-Mutanten ebenfalls ein disorganisiertes Aktin-Cytoskelett zeigten (Abbildung 40). Dieser Komplex kann möglicherweise auch durch den Kontakt mit Mikrotubuli-plus-Enden modifiziert werden. Natürlich könnte auch DdLIS1 durch seine Lokalisation entlang der Mikrotubuli am Transport bestimmter Komponenten der Signalmaschinerie beteiligt sein. Gegen eine ausschließlich Mikrotubuli-vermittelte DdLIS1 Funktion bei der Aktin-Polymerisation spricht jedoch, dass in Nocodazol behandelten Zellen keine veränderte Aktindynamik beobachtet werden konnte (Daten nicht gezeigt).

Somit scheint DdLIS1 in einem dynamischen Komplex am Zellcortex bzw. an den Mikrotubuli-plus-Enden eine Rolle bei der Mikrotubuli Verankerung und bei der Regulation der Aktindynamik zu spielen. Möglicherweise vermittelt dieser Komplex, zu dem auch DdCP224, Dynein und Dynaktin (u.a. p50) gehören, zwischen dem Mikrotubuli- und dem Aktin-Cytoskelettsystem. Offensichtlich spielt DdEB1 im Gegensatz zu DdLIS1, DdCP224 und Dynein keine Rolle bei der Verankerung der Mikrotubuli am Zellcortex, obwohl Interaktionen zu all diesen Proteinen bestehen. Diese Interaktionen sind möglicherweise bei den mitotischen Funktionen dieser Proteine wichtig. DdEB1 konnte z.B. klar eine wesentliche Funktion bei der Spindelbildung zugewiesen werden. Dabei könnte die Interaktion mit Dynein und DdLIS1 eine wichtige Rolle spielen, da auch Mutanten dieser beiden Proteine Spindeldefekte aufweisen (diese Arbeit und Ma *et al.* (1999)). Für DdCP224 liegen zwar keine Daten für eine Beteiligung bei der Spindelbildung vor, da bei DdCP224-Unterexpressionsmutanten aufgrund einer Interphase-Arretierung keine mitotischen Zellen beobachtet werden konnten (Gräf *et al.*, 2003). Da DdCP224 in diesen Zellen aber für das Auswachsen von Interphase-Mikrotubuli benötigt wird, liegt eine Beteiligung von DdCP224 am Auswachsen mitotischer Mikrotubuli, also der Spindelbildung, dennoch nahe (Gräf *et al.*, 2003).

Die unterschiedlichen Funktionen von DdEB1, DdLIS1, DdCP224 und Dynein/Dynaktin an Mikrotubuli-plus- und minus-Enden sind ohne die Interaktion mit weiteren plus- und minus-Endspezifischen Proteinen nur schwer vorstellbar. Die Identifizierung dieser bisher unbekannt Proteinkomponenten werden Gegenstand der zukünftigen Forschung sein.

Literaturverzeichnis

- Adachi, H., Hasebe, T., Yoshinaga, K., Ohta, T. and Sutoh, K.** (1994). Isolation of Dictyostelium discoideum cytokinesis mutants by restriction enzyme-mediated integration of the blasticidin S resistance marker. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **205**, 1808-1814.
- Ahn, C. and Morris, N. R.** (2001). Nudf, a fungal homolog of the human LIS1 protein, functions as a dimer in vivo. *J. Biol. Chem.* **276**, 9903-9.
- Akhmanova, A., Hoogenraad, C. C., Drabek, K., Stepanova, T., Dortland, B., Verkerk, T., Vermeulen, W., Burgering, B. M., De Zeeuw, C. I., Grosveld, F. et al.** (2001). Clasps are CLIP-115 and -170 associating proteins involved in the regional regulation of microtubule dynamics in motile fibroblasts. *Cell* **104**, 923-35.
- Allan, V. and Näthke, I. S.** (2001). Catch and pull a microtubule: getting a grasp on the cortex. *Nat. Cell Biol.* **3**, E226-8.
- Askham, J. M., Vaughan, K. T., Goodson, H. V. and Morrison, E. E.** (2002). Evidence That an Interaction between EB1 and p150(Glued) Is Required for the Formation and Maintenance of a Radial Microtubule Array Anchored at the Centrosome. *Mol Biol Cell* **13**, 3627-45.
- Baldauf, S. L. and Doolittle, W. F.** (1997). Origin and evolution of the slime molds (Mycetozoa). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 12007-12012.
- Bandyopadhyay, A., Lakshmanan, V., Matsumoto, T., Chang, E. C. and Maitra, U.** (2002). Moe1 and spInt6, the fission yeast homologues of mammalian translation initiation factor 3 subunits p66 (eIF3d) and p48 (eIF3e), respectively, are required for stable association of eIF3 subunits. *J Biol Chem* **277**, 2360-7.
- Beach, D. and Bloom, K. S.** (2001). The dynein intermediate chain, Pac11p, localizes to the microtubule plus ends. *Mol. Biol. Cell* **12S**, 165a.
- Beck, K., Gambee, J. E., Kamawal, A. and Bachinger, H. P.** (1997). A single amino acid can switch the oligomerization state of the alpha- helical coiled-coil domain of cartilage matrix protein. *EMBO J.* **16**, 3767-77.
- Beinhauer, J. D., Hagan, I. M., Hegemann, J. H. and Fleig, U.** (1997). Mal3, the fission yeast homologue of the human APC-interacting protein EB-1 is required for microtubule integrity and the maintenance of cell form. *J. Cell Biol.* **139**, 717-28.
- Belec, I. I., Gonzalez, C., Puro, J. and Szabad, J.** (2001). Dominant-negative mutant dynein allows spontaneous centrosome assembly, uncouples chromosome and centrosome cycles. *Curr. Biol.* **11**, 136-140.
- Berrueta, L., Tirnauer, J. S., Schuyler, S. C., Pellman, D. and Bierer, B. E.** (1999). The APC-associated protein EB1 associates with components of the dynactin complex and cytoplasmic dynein intermediate chain. *Curr. Biol.* **9**, 425-8.

- Bishop, A. L. and Hall, A.** (2000). Rho GTPases and their effector proteins. *Biochem J* **348 Pt 2**, 241-55.
- Boguski, M. S. and McCormick, F.** (1993). Proteins regulating Ras and its relatives. *Nature* **366**, 643-54.
- Bollag, D. M., Rozycki, M. D. and Edelman, S. J.** (1996). Protein Methods. New York: Wiley-Liss, Inc.
- Boveri, T.** (1887). Über Differenzierung der Zellkerne während der Furchung des Eies von *Ascaris megacephala*. *Anat. Anz.* **2**, 688-693.
- Bradford, M. M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-54.
- Bretschneider, T., Jonkman, J., Kohler, J., Medalia, O., Barisic, K., Weber, I., Stelzer, E. H., Baumeister, W. and Gerisch, G.** (2002). Dynamic organization of the actin system in the motile cells of *Dictyostelium*. *J Muscle Res Cell Motil* **23**, 639-49.
- Burkhardt, J. K., Echeverri, C. J., Nilsson, T. and Vallee, R. B.** (1997). Overexpression of the dynamitin (p50) subunit of the dynactin complex disrupts dynein-dependent maintenance of membrane organelle distribution. *J Cell Biol* **139**, 469-84.
- Bush, J., Franek, K. and Cardelli, J.** (1993). Cloning and characterization of seven novel *Dictyostelium discoideum* Rac-related genes belonging to the Rho family of GTPases. *Gene* **136**, 61-68.
- Busson, S., Dujardin, D., Moreau, A., Dompierre, J. and DeMey, J. R.** (1998). Dynein and dynactin are localized to astral microtubules and at cortical sites in mitotic epithelial cells. *Curr. Biol.* **8**, 541-544.
- Cardoso, C., Leventer, R. J., Matsumoto, N., Kuc, J. A., Ramocki, M. B., Mewborn, S. K., Dudliceck, L. L., May, L. F., Mills, P. L., Das, S. et al.** (2000). The location and type of mutation predict malformation severity in isolated lissencephaly caused by abnormalities within the LIS1 gene. *Hum Mol Genet* **9**, 3019-28.
- Cassimeris, L., Gard, D., Tran, P. T. and Erickson, H. P.** (2001). XMAP215 is a long thin molecule that does not increase microtubule stiffness. *J. Cell Sci.* **114**, 3025-33.
- Chan, J., Calder, G. M., Doonan, J. H. and Lloyd, C. W.** (2003). EB1 reveals mobile microtubule nucleation sites in *Arabidopsis*. *Nat Cell Biol* **5**, 967-71.
- Chant, J. and Stowers, L.** (1995). GTPase cascades choreographing cellular behavior: movement, morphogenesis, and more. *Cell* **81**, 1-4.
- Chen, C. R., Chen, J. and Chang, E. C.** (2000). A conserved interaction between moe1 and mal3 is important for proper spindle formation in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol. Biol. Cell* **11**, 4067-77.
- Chen, C. R., Li, Y. C., Chen, J., Hou, M. C., Papadaki, P. and Chang, E. C.** (1999). Moe1, a conserved protein in *Schizosaccharomyces pombe*, interacts with a Ras effector, Scd1, to affect proper spindle formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **96**, 517-22.

- Chen, X. P., Yin, H. and Huffaker, T. C.** (1998). The yeast spindle pole body component Spc72p interacts with Stu2p and is required for proper microtubule assembly. *J. Cell Biol.* **141**, 1169-1179.
- Claviez, M., Pagh, K., Maruta, H., Baltes, W., Fisher, P. and Gerisch, G.** (1982). Electron microscopic mapping of monoclonal antibodies on the tail region of Dictyostelium myosin. *EMBO J.* **1**, 1017-1022.
- Coquelle, F. M., Caspi, M., Cordelieres, F. P., Dompierre, J. P., Dujardin, D. L., Koifman, C., Martin, P., Hoogenraad, C. C., Akhmanova, A., Galjart, N. et al.** (2002). LIS1, CLIP-170's key to the dynein/dynactin pathway. *Mol Cell Biol* **22**, 3089-102.
- Corthesy Theulaz, I., Pauloin, A. and Rfeffer, S. R.** (1992). Cytoplasmic dynein participates in the centrosomal localization of the Golgi complex. *J. Cell Biol.* **118**, 1333-45.
- Dauderer, C. and Gräf, R.** (2002). Molecular analysis of the cytosolic Dictyostelium gamma-tubulin complex. *Eur. J. Cell Biol.* **81**, 175-184.
- Dauderer, C., Schliwa, M. and Gräf, R.** (1999). Dictyostelium discoideum: a promising centrosome model system. *Biol. Cell* **91**, 313-320.
- de Hostos, E. L., Bradtke, B., Lottspeich, F., Guggenheim, R. and Gerisch, G.** (1991). Coronin, an actin binding protein of Dictyostelium discoideum localized to cell surface projections, has sequence similarities to G protein beta subunits. *Embo J* **10**, 4097-104.
- de Hostos, E. L., Rehfuss, C., Bradtke, B., Waddell, D. R., Albrecht, R., Murphy, J. and Gerisch, G.** (1993). Dictyostelium mutants lacking the cytoskeletal protein coronin are defective in cytokinesis and cell motility. *J Cell Biol* **120**, 163-73.
- Desai, A. and Mitchison, T. J.** (1997). Microtubule polymerization dynamics. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **13**, 83-117.
- Dumontier, M., Hocht, P., Mintert, U. and Faix, J.** (2000). Rac1 GTPases control filopodia formation, cell motility, endocytosis, cytokinesis and development in Dictyostelium. *J. Cell Sci.* **113**, 2253-2265.
- Euteneuer, U., Gräf, R., Kube-Grandenath, E. and Schliwa, M.** (1998). Dictyostelium gamma-tubulin: molecular characterization and ultrastructural localization. *J. Cell Sci.* **111**, 405-412.
- Euteneuer, U. and Schliwa, M.** (1992). Mechanism of centrosome positioning during the wound response in BSC-1 cells. *J Cell Biol* **116**, 1157-66.
- Evan, G. I., Lewis, G. K., Ramsay, G. and Bishop, J. M.** (1985). Isolation of monoclonal antibodies specific for human c-myc proto- oncogene product. *Mol. Cell Biol.* **5**, 3610-3616.
- Faix, J.** (2002). The actin-bundling protein cortexillin is the downstream target of a Rac1-signaling pathway required for cytokinesis. *J Muscle Res Cell Motil* **23**, 765-72.
- Faix, J., Steinmetz, M., Boves, H., Kammerer, R. A., Lottspeich, F., Mintert, U., Murphy, J., Stock, A., Aebi, U. and Gerisch, G.** (1996). Cortexillins, major determinants of cell shape and size, are actin-bundling proteins with a parallel coiled-coil tail. *Cell* **86**, 631-642.

- Faix, J., Weber, I., Mintert, U., Kohler, J., Lottspeich, F. and Marriott, G.** (2001). Recruitment of cortexillin into the cleavage furrow is controlled by Rac1 and IQGAP-related proteins. *Embo J* **20**, 3705-15.
- Faulkner, N. E., Dujardin, D. L., Tai, C. Y., Vaughan, K. T., O'Connell, C. B., Wang, Y. and Vallee, R. B.** (2000). A role for the lissencephaly gene LIS1 in mitosis and cytoplasmic dynein function. *Nat Cell Biol* **2**, 784-91.
- Felsenstein, J.** (1993). PHYLIP - Phylogeny interference package (Version 3.2). *Cladistics* **5**, 164-166.
- Feng, Y., Olson, E. C., Stukenberg, P. T., Flanagan, L. A., Kirschner, M. W. and Walsh, C. A.** (2000). LIS1 Regulates CNS Lamination by Interacting with mNudE, a Central Component of the Centrosome. *Neuron* **28**, 665-679.
- Field, C., Li, R. and Oegema, K.** (1999). Cytokinesis in eukaryotes: a mechanistic comparison. *Curr Opin Cell Biol* **11**, 68-80.
- Fodde, R., Kuipers, J., Rosenberg, C., Smits, R., Kielman, M., Gaspar, C., van Es, J. H., Breukel, C., Wiegant, J., Giles, R. H. et al.** (2001). Mutations in the APC tumour suppressor gene cause chromosomal instability. *Nat. Cell Biol.* **3**, 433-8.
- Fukui, Y., Yumura, S. and Yumura, T. K.** (1987). Agar-overlay immunofluorescence: high resolution studies of cytoskeletal components and their changes during chemotaxis. *Methods Cell Biol.* **28**, 347 - 356.
- Gaglio, T., Saredi, A., Bingham, J. B., Hasbani, M. J., Gill, S. R., Schroer, T. A. and Compton, D. A.** (1996). Opposing motor activities are required for the organization of the mammalian mitotic spindle pole. *J. Cell Biol.* **135**, 399-414.
- Garces, J. A., Clark, I. B., Meyer, D. I. and Vallee, R. B.** (1999). Interaction of the p62 subunit of dynactin with Arp1 and the cortical actin cytoskeleton. *Curr. Biol.* **9**, 1497-500.
- Garcia-Higuera, I., Fenoglio, J., Li, Y., Lewis, C., Panchenko, M. P., Reiner, O., Smith, T. F. and Neer, E. J.** (1996). Folding of proteins with WD-repeats: comparison of six members of the WD-repeat superfamily to the G protein beta subunit. *Biochemistry* **35**, 13985-94.
- Gard, D. L. and Kirschner, M. W.** (1987). A microtubule-associated protein from *Xenopus* eggs that specifically promotes assembly at the plus-end. *J. Cell Biol.* **105**, 2203-2215.
- Glotzer, M.** (1997). The mechanism and control of cytokinesis. *Curr Opin Cell Biol* **9**, 815-23.
- Goode, B. L., Drubin, D. G. and Barnes, G.** (2000). Functional cooperation between the microtubule and actin cytoskeletons. *Curr. Opin. Cell Biol.* **12**, 63-71.
- Gräf, R.** (2001a). Maltose-binding protein as a fusion tag for the localization and purification of cloned proteins in *Dictyostelium*. *Anal. Biochem.* **289**, 297-300.
- Gräf, R.** (2001b). Molecular analysis of Dd-Nek2, the first non-vertebrate homologue of the human centrosomal NIMA-related kinase Nek2. *Cell Biol. Int.* **25**, A15.

Gräf, R., Brusis, N., Dauderer, C., Euteneuer, U., Hestermann, A., Schliwa, M. and Ueda, M. (2000a). Comparative structural, molecular and functional aspects of the Dictyostelium discoideum centrosome. *Curr. Top. Dev. Biol.* **49**, 161 - 185.

Gräf, R., Dauderer, C. and Schliwa, M. (1999). Cell cycle-dependent localization of monoclonal antibodies raised against isolated Dictyostelium centrosomes. *Biol. Cell* **91**, 471-477.

Gräf, R., Dauderer, C. and Schliwa, M. (2000b). Dictyostelium DdCP224 is a microtubule-associated protein and a permanent centrosomal resident involved in centrosome duplication. *J. Cell Sci.* **113**, 1747-1758.

Gräf, R., Euteneuer, U., Ho, T. H. and 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**, 4067-74.

Gräf, R., Euteneuer, U., Ueda, M. and Schliwa, M. (1998). Isolation of nucleation-competent centrosomes from Dictyostelium discoideum. *Eur. J. Cell Biol.* **76**, 167-175.

Habermann, A., Schroer, T. A., Griffiths, G. and Burkhardt, J. K. (2001). Immunolocalization of cytoplasmic dynein and dynactin subunits in cultured macrophages: enrichment on early endocytic organelles. *J. Cell Sci.* **114**, 229-240.

Hattori, M., Adachi, H., Tsujimoto, M., Arai, H. and Inoue, K. (1994). Miller-Dieker lissencephaly gene encodes a subunit of brain platelet-activating factor acetylhydrolase [corrected]. *Nature* **370**, 216-8.

Hayashi, I. and Ikura, M. (2003). Crystal structure of the amino-terminal microtubule-binding domain of end-binding protein 1 (EB1). *J Biol Chem* **278**, 36430-4.

Hestermann, A., Rehberg, M. and Gräf, R. (2003). Centrosomal microtubule plus end tracking proteins and their role in Dictyostelium cell dynamics. *J. Muscle Res. Cell Motil.* **23**, in press.

Hinchcliffe, E. H., Miller, F. J., Cham, M., Khodjakov, A. and Sluder, G. (2001). Requirement of a centrosomal activity for cell cycle progression through G1 into S phase. *Science* **291**, 1547-50.

Hoogenraad, C. C., Akhmanova, A., Grosveld, F., De Zeeuw, C. I. and Galjart, N. (2000). Functional analysis of CLIP-115 and its binding to microtubules. *J Cell Sci* **113**, 2285-97.

Juwana, J. P., Henderikx, P., Mischo, A., Wadle, A., Fadle, N., Gerlach, K., Arends, J. W., Hoogenboom, H., Pfreundschuh, M. and Renner, C. (1999). EB/RP gene family encodes tubulin binding proteins. *Int. J. Cancer* **81**, 275-84.

Karki, S. and Holzbaaur, E. L. (1999). Cytoplasmic dynein and dynactin in cell division and intracellular transport. *Curr. Opin. Cell Biol.* **11**, 45-53.

Kay, R. R. and Williams, J. G. (1999). The Dictyostelium genome project: an invitation to species hopping. *Trends Genet.* **15**, 294-297.

Kessin, R. H. (2001). Dictyostelium: evolution, cell biology, and the development of multicellularity. Cambridge: Cambridge University Press.

- Khodjakov, A. and Rieder, C. L.** (2001). Centrosomes enhance the fidelity of cytokinesis in vertebrates and are required for cell cycle progression. *J. Cell Biol.* **153**, 237-42.
- Kholmanskikh, S. S., Dobrin, J. S., Wynshaw-Boris, A., Letourneau, P. C. and Ross, M. E.** (2003). Disregulated RhoGTPases and actin cytoskeleton contribute to the migration defect in Lis1-deficient neurons. *J Neurosci* **23**, 8673-81.
- Kimble, M., Kuzmiak, C., McGovern, K. N. and de Hostos, E. L.** (2000). Microtubule organization and the effects of GFP-tubulin expression in dictyostelium discoideum. *Cell Motil. Cytoskeleton* **47**, 48-62.
- Kitanishi, T., Shibaoka, H. and Fukui, Y.** (1984). Disruption of microtubules and retardation of development of Dictyostelium with Ethyl N-phenylcarbamate and Thiabendazole. *Protoplasma* **120**, 185-196.
- Kitanishi-Yumura, T., Blose, S. H. and Fukui, Y.** (1985). Role of the MT-MTOC complex in determination of the cellular locomotory unit in Dictyostelium. *Protoplasma* **127**, 133-146.
- Kitanishi-Yumura, T. and Fukui, Y.** (1987). Reorganization of microtubules during mitosis in Dictyostelium: dissociation from MTOC and selective assembly/disassembly in situ. *Cell Motil. Cytoskel.* **8**, 106-117.
- Koonce, M. P. and Khodjakov, A.** (2003). Dynamic microtubules in Dictyostelium. *J. Muscle Res. Cell Motil.* **23**, in press.
- Koonce, M. P., Kohler, J., Neujahr, R., Schwartz, J. M., Tikhonenko, I. and Gerisch, G.** (1999). Dynein motor regulation stabilizes interphase microtubule arrays and determines centrosome position. *EMBO J.* **18**, 6786-92.
- Koonce, M. P. and Samso, M.** (1996). Overexpression of cytoplasmic dynein's globular head causes a collapse of the interphase microtubule network in Dictyostelium. *Mol. Biol. Cell* **7**, 935-948.
- Kosco, K. A., Adams, I. R. and Huffacker, T.** (1999). Stu2 interacts with Bik1 and Bim1 to modulate microtubule assembly in *S. cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell* **10 Suppl.**, 256a.
- Kyhse-Anderson, J.** (1984). Electroblotting of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J. Biochem. Biophys. Meth.* **10**, 203-209.
- Larochelle, D. A., Vithalani, K. K. and De Lozanne, A.** (1996). A novel member of the rho family of small GTP-binding proteins is specifically required for cytokinesis. *J Cell Biol* **133**, 1321-9.
- Lee, M. J., Gergely, F., Jeffers, K., Peak-Chew, S. Y. and Raff, J. W.** (2001). Msps/XMAP215 interacts with the centrosomal protein D-TACC to regulate microtubule behavior. *Nat. Cell. Biol.* **3**, 643-649.
- Ligon, L. A., Karki, S., Tokito, M. and Holzbaur, E. L.** (2001). Dynein binds to beta-catenin and may tether microtubules at adherens junctions. *Nat Cell Biol* **3**, 913-7.
- Lingle, W. L., Barrett, S. L., Negron, V. C., D'Assoro, A. B., Boeneman, K., Liu, W., Whitehead, C. M., Reynolds, C. and Salisbury, J. L.** (2002). Centrosome amplification drives chromosomal instability in breast tumor development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **99**, 1978-1983.

Lo Nigro, C., Chong, C. S., Smith, A. C., Dobyns, W. B., Carrozzo, R. and Ledbetter, D. H. (1997). Point mutations and an intragenic deletion in LIS1, the lissencephaly causative gene in isolated lissencephaly sequence and Miller-Dieker syndrome. *Hum Mol Genet* **6**, 157-64.

Loomis, W. F. (1982). The development of Dictyostelium discoideum. New York: Ac. Press.

Lowy, D. R. and Willumsen, B. M. (1993). Function and regulation of ras. *Annu Rev Biochem* **62**, 851-91.

Lu, B., Roegiers, F., Jan, L. Y. and Jan, Y. N. (2001). Adherens junctions inhibit asymmetric division in the Drosophila epithelium. *Nature* **409**, 522-5.

Lupas, A., VanDyke, M. and Stock, J. (1991). Predicting coiled coils from protein sequences. *Science* **252**, 1162-1164.

Ma, S. and Chisholm, R. L. (2002). Cytoplasmic dynein-associated structures move bidirectionally in vivo. *J Cell Sci* **115**, 1453-60.

Ma, S., Fey, P. and Chisholm, R. L. (2001). Molecular motors and membrane traffic in Dictyostelium. *Biochim. Biophys. Acta* **1525**, 234-44.

Ma, S., Trivinos Lagos, L., Gräf, R. and 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**, 1261-74.

Machesky, L. M., Atkinson, S. J., Ampe, C., Vandekerckhove, J. and Pollard, T. D. (1994). Purification of a cortical complex containing two unconventional actins from Acanthamoeba by affinity chromatography on profilin-agarose. *J Cell Biol* **127**, 107-15.

Malchow, D., Nagele, B., Schwartz, H. and Gerisch, G. (1972). Membrane-bound cyclic AMP phosphodiesterase in chemotactically responding cells of Dictyostelium discoideum. *Eur. J. Biochem.* **28**, 136-142.

McIntosh, J. R., Roos, U. P., Neighbors, B. and McDonald, K. L. (1985). Architecture of the microtubule component of mitotic spindles from Dictyostelium discoideum. *J. Cell Sci.* **75**, 93-129.

McWhirter, J. R., Galasso, D. L. and Wang, J. Y. (1993). A coiled-coil oligomerization domain of Bcr is essential for the transforming function of Bcr-Abl oncoproteins. *Mol. Cell Biol.* **13**, 7587-95.

Mimori-Kiyosue, Y., Shiina, N. and Tsukita, S. (2000a). Adenomatous polyposis coli (APC) protein moves along microtubules and concentrates at their growing ends in epithelial cells. *J Cell Biol* **148**, 505-18.

Mimori-Kiyosue, Y., Shiina, N. and Tsukita, S. (2000b). The dynamic behavior of the APC-binding protein EB1 on the distal ends of microtubules. *Curr. Biol.* **10**, 865-8.

Moens, P. B. (1976). Spindle and kinetochore morphology of Dictyostelium discoideum. *J. Cell Biol.* **68**, 113-122.

Muhua, L., Adames, N. R., Murphy, M. D., Shields, C. R. and Cooper, J. A. (1998). A cytokinesis checkpoint requiring the yeast homologue of an APC-binding protein. *Nature* **393**, 487-91.

- Neujahr, R., Albrecht, R., Kohler, J., Matzner, M., Schwartz, J. M., Westphal, M. and Gerisch, G.** (1998). Microtubule-mediated centrosome motility and the positioning of cleavage furrows in multinucleate myosin II-null cells. *J. Cell Sci.* **111**, 1227-1240.
- Niethammer, M., Smith, D. S., Ayala, R., Peng, J., Ko, J., Lee, M. S., Morabito, M. and Tsai, L. H.** (2000). NUDEL is a novel Cdk5 substrate that associates with LIS1 and cytoplasmic dynein. *Neuron* **28**, 697-711.
- Nigg, E. A.** (2002). Centrosome aberrations: cause or consequence of cancer progression? *Nat. Rev. Cancer* **2**, 815-25.
- Nobes, C. D. and Hall, A.** (1995). Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell* **81**, 53-62.
- Ohkura, H., Garcia, M. A. and Toda, T.** (2001). Dis1/TOG universal microtubule adaptors - one MAP for all? *J. Cell Sci.* **114**, 3805-12.
- Pellman, D.** (2001). Cancer. A CINtillating new job for the APC tumor suppressor. *Science* **291**, 2555-6.
- Perez, F., Diamantopoulos, G. S., Stalder, R. and Kreis, T. E.** (1999). CLIP-170 highlights growing microtubule ends in vivo. *Cell* **96**, 517-27.
- Piel, M., Nordberg, J., Euteneuer, U. and Bornens, M.** (2001). Centrosome-dependent exit of cytokinesis in animal cells. *Science* **291**, 1550-3.
- Pilz, D. T., Matsumoto, N., Minnerath, S., Mills, P., Gleeson, J. G., Allen, K. M., Walsh, C. A., Barkovich, A. J., Dobyns, W. B., Ledbetter, D. H. et al.** (1998). LIS1 and XLIS (DCX) mutations cause most classical lissencephaly, but different patterns of malformation. *Hum Mol Genet* **7**, 2029-37.
- Popov, A., Severin, F. and Karsenti, E.** (2002). XMAP215 Is Required for the Microtubule-Nucleating Activity of Centrosomes. *Curr. Biol.* **12**, 1326.
- Prokopenko, S. N., Saint, R. and Bellen, H. J.** (2000). Untying the Gordian knot of cytokinesis. Role of small G proteins and their regulators. *J Cell Biol* **148**, 843-8.
- Raper, K. B.** (1935). Dictyostelium discoideum, a new species of slime mold from decaying forest leaves. *J. Agr. Res.* **50**, 135-147.
- Reiner, O., Carrozzo, R., Shen, Y., Wehnert, M., Faustinella, F., Dobyns, W. B., Caskey, C. T. and Ledbetter, D. H.** (1993). Isolation of a Miller-Dieker lissencephaly gene containing G protein beta-subunit-like repeats. *Nature* **364**, 717-21.
- Rieder, C. L., Faruki, S. and Khodjakov, A.** (2001). The centrosome in vertebrates: more than a microtubule-organizing center. *Trends Cell Biol* **11**, 413-9.
- Rivero, F., Albrecht, R., Dislich, H., Bracco, E., Graciotti, L., Bozzaro, S. and Noegel, A. A.** (1999). RacF1, a novel member of the Rho protein family in Dictyostelium discoideum, associates transiently with cell contact areas, macropinosomes, and phagosomes. *Mol Biol Cell* **10**, 1205-19.
- Rivero, F., Dislich, H., Glockner, G. and Noegel, A. A.** (2001). The Dictyostelium discoideum family of Rho-related proteins. *Nucleic Acids Res* **29**, 1068-79.

Rogers, S. L., Rogers, G. C., Sharp, D. J. and Vale, R. D. (2002). Drosophila EB1 is important for proper assembly, dynamics, and positioning of the mitotic spindle. *J. Cell Biol.* **158**, 873-84.

Roos, U. P., De Brabander, M. and De Mey, J. (1984). Indirect immunofluorescence of microtubules in Dictyostelium discoideum. A study with polyclonal and monoclonal antibodies to tubulins. *Exp. Cell Res.* **151**, 183-193.

Roos, U. P., de Brabander, M. and Nuydens, R. (1987). Movements of intracellular particles in undifferentiated amoebae of Dictyostelium discoideum. *Cell Motil. Cytoskel.* **7**, 258-271.

Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: A laboratory manual, 2nd Ed.: Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Sameshima, M. (1985). The Orientation of Nucleus, Nucleus-associated Body and Protruding Nucleolus in Aggregating Dictyostelium discoideum. *Exp. Cell Res.* **156**, 341-350.

Sapir, T., Elbaum, M. and Reiner, O. (1997). Reduction of microtubule catastrophe events by LIS1, platelet-activating factor acetylhydrolase subunit. *EMBO J.* **16**, 6977-84.

Sasaki, S., Shionoya, A., Ishida, M., Gambello, M. J., Yingling, J., Wynshaw-Boris, A. and Hirotsune, S. (2000). A LIS1/NUDEL/cytoplasmic dynein heavy chain complex in the developing and adult nervous system. *Neuron* **28**, 681-96.

Schliwa, M., van Blerkom, J. and Pryzwansky, K. B. (1982). Structural organization of the cytoplasm. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **46**, 51-67.

Schmitz, A. A., Govek, E. E., Bottner, B. and Van Aelst, L. (2000). Rho GTPases: signaling, migration, and invasion. *Exp Cell Res* **261**, 1-12.

Schroer, T. A. (2001). Microtubules don and doff their caps: dynamic attachments at plus and minus ends. *Curr. Opin. Cell Biol.* **13**, 92-6.

Schuyler, S. C. and Pellman, D. (2001). Microtubule "plus-end-tracking proteins": The end is just the beginning. *Cell* **105**, 421-4.

Schwartz, K., Richards, K. and Botstein, D. (1997). BIM1 encodes a microtubule-binding protein in yeast. *Mol. Biol. Cell* **8**, 2677-91.

Short, J. M., Fernandez, J. M., Sorge, J. A. and Huse, W. D. (1988). Lambda ZAP: a bacteriophage lambda expression vector with in vivo excision properties. *Nucleic Acids Res* **16**, 7583-600.

Simpson, P. A., Spudich, J. A. and Parham, P. (1984). Monoclonal antibodies prepared against Dictyostelium actin: Characterization and interactions with actin. *J. Cell Biol.* **99**, 287-295.

Small, J. V., Geiger, B., Kaverina, I. and Bershadsky, A. (2002). How do microtubules guide migrating cells? *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**, 957-64.

Spector, I., Shochet, N. R., Blasberger, D. and Kashman, Y. (1989). Latrunculins--novel marine macrolides that disrupt microfilament organization and affect cell growth: I. Comparison with cytochalasin D. *Cell Motil Cytoskeleton* **13**, 127-44.

Su, L. K., Burrell, M., Hill, D. E., Gyuris, J., Brent, R., Wiltshire, R., Trent, J., Vogelstein, B. and Kinzler, K. W. (1995). APC binds to the novel protein EB1. *Cancer Res.* **55**, 2972-7.

- Swan, A., Nguyen, T. and Suter, B.** (1999). Drosophila Lissencephaly-1 functions with Bic-D and dynein in oocyte determination and nuclear positioning. *Nat. Cell Biol.* **1**, 444-9.
- Tai, C. Y., Dujardin, D. L., Faulkner, N. E. and Vallee, R. B.** (2002). Role of dynein, dynactin, and CLIP-170 interactions in LIS1 kinetochore function. *J. Cell Biol.* **11**, 11.
- Taylor, J. A., O'Brien, J. A. and Yeager, M.** (1996). The cytoplasmic tail of NSP4, the endoplasmic reticulum-localized non- structural glycoprotein of rotavirus, contains distinct virus binding and coiled coil domains. *EMBO J.* **15**, 4469-76.
- Tirnauer, J. S. and Bierer, B. E.** (2000). EB1 proteins regulate microtubule dynamics, cell polarity, and chromosome stability. *J. Cell Biol.* **149**, 761-6.
- Tirnauer, J. S., Grego, S., Salmon, E. D. and Mitchison, T. J.** (2002). EB1-Microtubule Interactions in Xenopus Egg Extracts: Role of EB1 in Microtubule Stabilization and Mechanisms of Targeting to Microtubules. *Mol. Biol. Cell* **13**, 3614-26.
- Tirnauer, J. S., O'Toole, E., Berrueta, L., Bierer, B. E. and Pellman, D.** (1999). Yeast Bim1p promotes the G1-specific dynamics of microtubules. *J. Cell Biol.* **145**, 993-1007.
- Tournebize, R., Popov, A., Kinoshita, K., Ashford, A. J., Rybina, S., Pozniakovsky, A., Mayer, T. U., Walczak, C. E., Karsenti, E. and Hyman, A. A.** (2000). Control of microtubule dynamics by the antagonistic activities of XMAP215 and XKCM1 in Xenopus egg extracts. *Nat. Cell Biol.* **2**, 13-19.
- Ueda, M., Gräf, R., MacWilliams, H. K., Schliwa, M. and Euteneuer, U.** (1997). Centrosome positioning and directionality of cell movements. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 9674-9678.
- Ueda, M., Schliwa, M. and 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. and Schroer, T. A.** (1999). Role of dynactin in endocytic traffic: effects of dynamitin overexpression and colocalization with CLIP-170. *Mol. Biol. Cell* **10**, 4107-20.
- Vasquez, R. J., Gard, D. L. and Cassimeris, L.** (1994). XMAP from Xenopus eggs promotes rapid plus end assembly of microtubules and rapid microtubule polymer turnover. *J. Cell Biol.* **127**, 985-93.
- Vaughan, K. T., Tynan, S. H., Faulkner, N. E., Echeverri, C. J. and Vallee, R. B.** (1999). Colocalization of cytoplasmic dynein with dynactin and CLIP-170 at microtubule distal ends. *J. Cell Sci.* **112**, 1437-47.
- Vicker, M. G.** (2002a). Eukaryotic cell locomotion depends on the propagation of self-organized reaction-diffusion waves and oscillations of actin filament assembly. *Exp Cell Res* **275**, 54-66.
- Vicker, M. G.** (2002b). F-actin assembly in Dictyostelium cell locomotion and shape oscillations propagates as a self-organized reaction-diffusion wave. *FEBS Lett* **510**, 5-9.
- Vicker, M. G., Xiang, W., Plath, P. J. and Wosniok, W.** (1997). Pseudopodium extension and amoeboid locomotion in *Dictyostelium discoideum*: possible autowave behaviour of F-actin. *Physica D* **101**, 317-332.

- Waterman-Storer, C. M., Worthylake, R. A., Liu, B. P., Burridge, K. and Salmon, E. D.** (1999). Microtubule growth activates Rac1 to promote lamellipodial protrusion in fibroblasts. *Nat Cell Biol* **1**, 45-50.
- Weber, I., Gerisch, G., Heizer, C., Murphy, J., Badelt, K., Stock, A., Schwartz, J. M. and Faix, J.** (1999). Cytokinesis mediated through the recruitment of cortexillins into the cleavage furrow. *EMBO J.* **18**, 586-94.
- Weiner, O. H., Murphy, J., Griffiths, G., Schleicher, M. and Noegel, A. A.** (1993). The actin-binding protein comitin (p24) is a component of the golgi apparatus. *J. Cell Biol.* **123**, 23-34.
- Welker, D. L. and Williams, K. L.** (1980). Mitotic arrest and chromosome doubling using thiabendazole, cambendazole, nocodazole, and ben late in the slime mould *Dictyostelium discoideum*. *J. Gen. Microbiol.* **116**, 397-407.
- Wessel, D. and Flügge, U. I.** (1984). A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. *Anal. Biochem.* **138**, 141-143.
- Westphal, M., Jungbluth, A., Heidecker, M., Muhlbauer, B., Heizer, C., Schwartz, J. M., Marriott, G. and Gerisch, G.** (1997). Microfilament dynamics during cell movement and chemotaxis monitored using a GFP-actin fusion protein. *Current Biology* **7**, 176-183.
- Williams, K. L. and Newell, P. C.** (1976). A genetic study of aggregation in the cellular slime mould *Dictyostelium discoideum* using complementation analysis. *Genetics* **82**, 287-307.
- Yen, H. C., Gordon, C. and Chang, E. C.** (2003). *Schizosaccharomyces pombe* Int6 and Ras homologs regulate cell division and mitotic fidelity via the proteasome. *Cell* **112**, 207-17.

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Markus Rehberg

geboren am 1 Juni 1974 in Prien am Chiemsee

Schulbildung:

September 1980 – Juli 1984

Franziska-Hager-Grundschule, Prien

September 1984 – Juni 1993

Ludwig-Thoma-Gymnasium, Prien

Juni 1993

Allgemeine Hochschulreife

Dienstpflicht:

August 1993 – Oktober 1994

Zivildienst im Kreiskrankenhaus Prien

Hochschulbildung:

November 1994 – Februar 2000

Studium der Biologie an der Ludwig-Maximilians-Universität München

November 1996

Vordiplom

April 1999

Diplomprüfung

Mai 1999 – Februar 2000

Diplomarbeit am Institut für Genetik bei PD Dr. Christian Koch im Labor von Prof. Dr. Regine Kahmann. Thema: Genetische Identifizierung negativer Regulatoren der G1-S Transition in *Saccharomyces cerevisiae*

Mai 2000 - September 2004

Promotionsstudium am Adolf-Butenandt Institut für Zellbiologie in der Gruppe von PD Dr. Ralph Gräf (Abt. Prof. Dr. Manfred Schliwa), Forschungstätigkeit zur vorliegenden Arbeit. Betreuung durch Prof. Dr. Harry MacWilliams, Zoologisches Institut der LMU-München.

Stipendium:

November 1994-Februar 2000

Studienstiftung des Deutschen Volkes

Danksagung

Als erstes möchte ich Ralph Gräf Danke sagen, für die schöne Zeit, unsere feine Forschung, für die Berg-, Bike- und Tagungstouren und für die wahrhaft meisterliche Betreuung!

Herrn Prof. Dr. Manfred Schliwa für sein stetes Interesse an und seiner Unterstützung für diese Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Harry MacWilliams für die Vertretung dieser Arbeit vor der Fakultät für Biologie.

Herrn Prof. Dr. Michael Schleicher für seine stete Hilfsbereitschaft und Rat in allen Dicti-Fragen. Auch allen „Schleicher’s“ (Daniela Rieger, Lars Israel, Marc Borath, Anette Vogel, Anika Gloss, Rene Rost, Jibi Jacob, Rajesh Arasada, Hyun-Ju Son, Thomas Giebing) ein herzlicher Dank für die gute Nachbarschaft und zahlreiche Hilfen.

Herzlich Danken möchte ich Hans Faix sagen: für die vielen Antikörper, Hilfe und Unterstützung, den Spaß im Labor und auf Tagungen!

Meine größte Hilfe nach Ralph war Thi-Hieu Ho und deshalb ein besonderer Dank! Wie sind wir früher ohne dich zurecht gekommen?

Besonders Danken möchte ich meinen Laborkolleginnen Andrea Hestermann, Katrin Koch, Irene Schulz, Julia Kleylein-Sohn und Christine Zoglmeier für die schöne Zeit, die tatkräftige Unterstützung und die nötige Nachsicht.

Danken möchte ich den „Schliwas“: Andreas Schneider und Christian Horn vor allem für die vielen Computerhilfen; Ursula Schliwa, Günther Woehlke, Lucia Driller und Renate Dombi; den „neuen“ Sarah Adio und Judith Mergler und besonders Friederike Bathe, Katrin Halen und Athina Kallipolitou!

Danken möchte ich auch Maria Beer, Eva-Maria Praetorius, Franz Schwarz, Rita Lorenz, Nici Brusis und Andrea Kirschner.

Danke sagen will ich zu Beate Morbach und besonders und vor allem zu meinen Eltern, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre! Danke!