

**Molekulare Charakterisierung  
neuer centrosomaler und  
centrosomassoziierter Proteine in  
*Dictyostelium discoideum***

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

vorgelegt von  
**Irene Schulz**  
aus München  
August 2006

## **Ehrenwörtliche Versicherung**

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

Irene Schulz

München, August 2006

Dissertation eingereicht: 16.08.2006

Tag der mündlichen Prüfung: 28.11.2006

Erstgutachter: Prof. Dr. Manfred Schliwa

Zweitgutachter: Dr. Angelika Böttger

Sondergutachter: PD Dr. Ralph Gräf

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

### **Originalarbeiten:**

Markus Rehberg, Julia Kleylein-Sohn, Jan Faix, Thi-Hieu Ho, Irene Schulz und Ralph Gräf (2005). *Dictyostelium* LIS1 is a centrosomal protein required for microtubule/cell cortex interactions, nucleus/centrosome linkage, and actin dynamics. *Mol. Biol. Cell* 16, 2759-2771.

Yvonne Reinders, Irene Schulz, Ralph Gräf und Albert Sickmann (2005). Identification of novel centrosomal proteins in *D. discoideum* by comparative proteomic approaches. *Journal of Proteome Research* 5(3), 589-598.

Irene Schulz, Yvonne Reinders, Albert Sickmann und Ralph Gräf (2006). An improved method for *Dictyostelium* centrosome isolation. *Methods in molecular biology*, im Druck.

### **Übersichtsartikel**

Ralph Gräf, Christine Daunderer und Irene Schulz (2004). Molecular and functional analysis of the *Dictyostelium* centrosome. *Int. Rev. Cytol.* 241, 155-202.

### **Tagungsbeiträge:**

Vortrag auf der "Annual International Dictyostelium Conference 2005" (Autrans/Frankreich)

Irene Schulz, Jan Faix, Thi-Hieu Ho, Markus Rehberg und Ralph Gräf

Functional Characterization of DdLIS1 and DdDCX, two Microtubule-associated Proteins involved in Lissencephaly.

Die vorliegende Arbeit wurde von Juni 2001 bis Januar 2006 im Labor von Prof. Dr. Manfred Schliwa angefertigt und von PD. Dr. Ralph Gräf betreut. Gefördert wurde die Arbeit durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft.

## **CD-Supplement:**

Ergänzend liegt dieser Arbeit eine CD bei.

Enthalten sind die Filmsequenzen folgender Versuche:

### Chemotaxisexperimente mit folgenden Stämmen:

- 1 Wildtypstamm AX2
- 2 DdDCX KO-Stamm DdDCX $\Delta$
- 3 LIS1-Punktmutante DdLIS1-D327H
- 4 Doppelmutante DdLIS1-D327H/DdDCX $\Delta$

### Entwicklungsbeobachtung im Vergleich zum Wildtyp AX2:

(Der Wildtyp befindet sich immer links, die Mutante rechts.)

- 5 DdDCX KO-Stamm DdDCX $\Delta$
- 6 LIS1-Punktmutante DdLIS1-D327H
- 7 Doppelmutante DdLIS1-D327H/DdDCX $\Delta$  (hohe Zelldichte)
- 8 Doppelmutante DdLIS1-D327H/DdDCX $\Delta$  (geringe Zelldichte)

### Tropfversuch:

- 9 Auf einen Rasen mit der Doppelmutante wurden Wildtypzellen (links) und Zellen der Doppelmutante (rechts) getropft.

### Chemotaxisversuche mit Nocodazol

- 10 Kontrolle mit DMSO
- 11 Behandlung mit Nocodazol

## Inhaltsverzeichnis

	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>IV</b>
	<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>V</b>
<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1	<i>Dictyostelium discoideum</i> als Modellorganismus .....	1
1.2	Funktion und Aufbau von Centrosomen .....	3
1.3	Das Centrosom von <i>Dictyostelium discoideum</i> .....	5
1.4	Erforschung des Centrosoms von <i>Dictyostelium discoideum</i> .....	5
1.5	Lissenzephalie, LIS1 und Doublecortin (DCX) .....	7
1.6	LIS1 in <i>Dictyostelium discoideum</i> .....	9
1.7	Die Rolle von Mikrotubuli in <i>Dictyostelium discoideum</i> .....	11
1.8	Ziele der Arbeit .....	12
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	<b>13</b>
2.1	Material .....	13
2.1.1	Reagenzien .....	13
2.1.2	Antikörper .....	13
2.1.3	Enzyme .....	14
2.1.4	Antibiotika .....	14
2.1.5	Medien .....	14
2.1.6	Puffer und Lösungen .....	15
2.1.7	Puffer und Lösungen für die Präparation von Centrosomen (Schulz <i>et al.</i> , 2006) .....	16
2.1.8	Vektoren .....	16
2.1.9	Bakterien und <i>Dictyostelium discoideum</i> -Stämme .....	17
2.1.10	Computerprogramme .....	17
2.1.11	Andere Materialien .....	17
2.2	Molekularbiologische Methoden .....	17
2.2.1	Agarose-Gelelektrophorese (Sambrook <i>et al.</i> , 1989) .....	17
2.2.2	DNA Extraktion aus Agarosegelen .....	18
2.2.3	Bestimmung der DNA-Konzentration .....	18
2.2.4	Präparation von Plasmid-DNA .....	18
2.2.5	Polymerase-Kettenreaktion (PCR) .....	18
2.2.6	Reverse-Transkriptions-PCR (RT-PCR) .....	18
2.2.7	DNA-Spaltung mit Restriktionsenzymen .....	19
2.2.8	Phosphatase Behandlung (Sambrook <i>et al.</i> , 1989) .....	19
2.2.9	Überführung überstehender Enden in glatte Enden (Sambrook <i>et al.</i> , 1989) .....	19
2.2.10	DNA-Ligase Reaktion .....	19
2.2.11	Phenol/ Chloroform-Extraktion und Ethanol-fällung .....	19
2.2.12	Herstellung elektrokompetenter <i>E. coli</i> -Zellen .....	20
2.2.13	Elektrotransformation von <i>E. coli</i> -Zellen .....	20
2.2.14	Identifikation transformierter Klone in <i>E. coli</i> .....	20
2.2.15	Präparation chromosomaler DNA aus <i>Dictyostelium discoideum</i> .....	20
2.2.16	Transformation und Klonierung von <i>Dictyostelium discoideum</i> .....	21
2.2.17	Transformation von <i>Dictyostelium discoideum</i> mit pDEX-NLS-cre .....	22
2.2.18	Isolierung polyadenylierter RNA aus <i>Dictyostelium discoideum</i> .....	22
2.2.19	Southernblot-Analyse .....	22
2.2.20	Digoxygenin-Markierung von DNA-Sonden, Hybridisierung und Detektion .....	23
2.2.21	Behandlung von Lösungen und Geräten für die Northernblot-Analyse .....	23
2.2.22	Northernblot-Analyse .....	23
2.2.23	Herstellung und Hybridisierung von radioaktiv markierten Sonden .....	23
2.2.24	Oligonukleotide .....	24

2.2.25	Vektorkonstruktionen .....	24
2.3	Biochemische Methoden .....	26
2.3.1	Gewinnung von Gesamtzellextrakten und cytosolischen Extrakten .....	26
2.3.2	Methanol/Chloroform-Proteinpräzipitation .....	26
2.3.3	Bestimmung der Proteinkonzentration .....	27
2.3.4	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	27
2.3.5	Coomassie-Blau-Färbung von SDS-Gelen .....	28
2.3.6	Silberfärbung von SDS-Gelen .....	28
2.3.7	Westernblot-Analyse .....	28
2.3.8	Aufreinigung von bakteriell exprimierten MBP-Fusionsproteinen .....	28
2.3.9	Herstellung von polyklonalen Antisera aus Kaninchen .....	29
2.3.10	Aufreinigung von bakteriell exprimierten GST-Fusionsproteinen .....	29
2.3.11	Aktin-Sedimentationsexperiment .....	29
2.3.12	GST-Pulldown mit <i>Dictyostelium</i> -Zellextrakt .....	30
2.3.13	Centrosomenpräparation für die Verwendung in der Massenspektrometrie (Schulz <i>et al.</i> , 2006) .....	30
2.3.14	Verkürzte Centrosomenpräparation aus GFP exprimierenden Stämmen .....	31
2.3.15	2D-Gelelektrophorese .....	31
2.3.16	Proteinauftrennung für Massenspektrometrie .....	32
2.3.17	Massenspektrometrie .....	32
2.4	Zellbiologische Methoden .....	32
2.4.1	Kultivierung und Konservierung von <i>E. coli</i> .....	32
2.4.2	Kultivierung und Konservierung von <i>Dictyostelium discoideum</i> .....	33
2.4.3	Entwicklungsreihen für Westernblot- und Northernblot-Analyse .....	33
2.4.4	Indirekte Immunfluoreszenz-Mikroskopie von <i>Dictyostelium discoideum</i> und isolierten Centrosomen .....	33
2.4.5	Indirekte Immunfluoreszenz-Mikroskopie von Zellströmen .....	34
2.4.6	Chemotaxisexperimente .....	34
2.4.7	Phototaxisexperimente .....	35
2.4.8	Langzeitbeobachtung der Entwicklung von <i>Dictyostelium</i> .....	35
2.4.9	Konfokale Mikroskopie .....	35
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>36</b>
3.1	Suche nach bekannten centrosomalen Proteinen im Genom von <i>Dictyostelium discoideum</i> .....	36
3.2	Identifizierung neuer centrosomaler Proteine durch Massenspektrometrie .....	39
3.2.1	2D-Gelelektrophorese .....	39
3.2.2	Erste Versuche mit der Massenspektrometrie .....	41
3.2.3	Optimierung der Centrosomenpräparation .....	42
3.2.4	Optimierung der Auftrennung .....	45
3.2.5	Auswertung der Rohdaten .....	46
3.2.6	Zusammenfassung der identifizierten Proteine .....	47
3.2.7	Überprüfung der centrosomalen Lokalisation einzelner Kandidaten .....	48
3.3	Untersuchung von DCX in <i>Dictyostelium discoideum</i> .....	50
3.3.1	Sequenzvergleich und Klonierung von DdDCX .....	50
3.3.2	DdDCX ist entwicklungsreguliert .....	51
3.3.3	Endogenes DdDCX und DdDCX-Fusionsproteine lokalisieren entlang von Mikrotubuli .....	52
3.3.4	DdDCX ist kein fester Bestandteil des Centrosoms .....	54
3.3.5	DdDCX bindet direkt an Aktin .....	55
3.3.6	Generierung und Untersuchung einer DdDCX-Nullmutante .....	57
3.4	Die Rolle von DdLIS1 in der Entwicklung von <i>Dictyostelium discoideum</i> .....	61
3.4.1	LIS1 ist nicht entwicklungsreguliert .....	61
3.4.2	Untersuchungen zur Funktion von DdLIS1 in der Entwicklung .....	61
3.5	Zusammenspiel von DdDCX und DdLIS1 .....	64
3.5.1	DdDCX interagiert mit DdLIS1 .....	64
3.5.2	Überexpression von GFP-DdDCX kompensiert den Phänotyp von DdLIS1-D327H nicht .....	65
3.5.3	DdLIS1 wird in DdDCX $\Delta$ nicht verstärkt exprimiert .....	66
3.5.4	Herstellung einer Doppelmutante .....	66
3.5.5	Charakterisierung des Phänotyps der Doppelmutante .....	66

3.5.6	Reaktion der Doppelmutante auf externe Signale .....	69
3.6	Die Rolle von Mikrotubuli in der Entwicklung von <i>Dictyostelium discoideum</i> .....	71
3.6.1	Einfluss von Nocodazol auf Chemotaxis .....	71
3.6.2	Einfluss von Nocodazol auf die Bildung von Aggregationsströmen .....	73
<b>4</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>75</b>
4.1	Suche nach bekannten centrosomalen Proteinen im Genom von <i>Dictyostelium discoideum</i> .....	75
4.2	Identifizierung neuer centrosomaler Proteine durch Massenspektrometrie.....	76
4.2.1	Aufreinigung der Centrosomen.....	76
4.2.2	Auftrennung und Massenspektrometrie der centrosomalen Probe.....	77
4.2.3	Mögliche Fehlerquellen bei der Klassifizierung.....	79
4.2.4	Identifizierte Proteine .....	80
4.3	Untersuchung von DdDCX .....	81
4.3.1	Aufbau und Lokalisation von DdDCX.....	81
4.3.2	Funktion von DdDCX .....	82
4.4	Die Rolle von DdLIS1 in der Entwicklung und das Zusammenspiel mit DdDCX.....	83
4.5	Die Rolle von Mikrotubuli in der Entwicklung von <i>Dictyostelium</i> .....	84
4.6	Suche nach einem von Mikrotubuli unabhängigen Grund für den Phänotyp der Doppelmutante .....	85
<b>5</b>	<b>Literatur</b> .....	<b>87</b>
	<b>Anhang</b> .....	<b>95</b>
	<b>Lebenslauf</b> .....	<b>102</b>
	<b>Danksagung</b> .....	<b>103</b>

## Zusammenfassung

Auf der Suche nach bislang unbekanntem Proteinen des Centrosoms von *Dictyostelium* wurde zunächst auf der Ebene des *Dictyostelium*-Genomprojekts, basierend auf Ähnlichkeiten zu bekannten centrosomalen Proteinen anderer Spezies, nach möglichen Kandidaten gesucht. Zu den ca. 120 wahrscheinlich centrosomalen Proteinen in Tieren konnten hier nur 38 Homologe gefunden werden. Allerdings besteht das *Dictyostelium*-Centrosom wahrscheinlich aus ähnlich vielen verschiedenen Proteinen, sodass mit dieser Methode ein Großteil unentdeckt blieb. In einem Proteomics-Ansatz mit verschiedenen Auftrennungsmethoden wurde das *Dictyostelium*-Centrosom systematisch untersucht. Hierfür wurde zunächst ein Verfahren erarbeitet, Centrosomen in hinreichender Reinheit für massenspektrometrische Analysen zu präparieren. Am Ende der Bemühungen wurden 33 neue mögliche centrosomale Proteine gefunden, von denen bereits drei bestätigt werden konnten.

Parallel wurde im *Dictyostelium*-System die Krankheit Lissenzephalie untersucht, eine Migrationsstörung von Neuronen bei der Gehirnentwicklung, bei der Centrosom-assoziierte Proteine eine wichtige Rolle spielen. Zellmotilität und Entwicklung sind in *Dictyostelium* besonders gut zu beobachten, außerdem existieren hier Homologe zu den miteinander interagierenden Proteinen LIS1 und DCX, deren Mutationen beim Menschen Lissenzephalie auslösen. Mit DdDCX wurde ein Homologes (29 % Identität) zum humanen DCX gefunden und unter Einsatz von Fusionsproteinen und eines Antikörpers umfangreich charakterisiert. DdDCX bindet an Mikrotubuli und wird hauptsächlich in der Aggregationsphase exprimiert. Die generierte Nullmutante zeigte jedoch keinen Phänotyp. Das centrosomale Protein DdLIS1 hat zahlreiche wichtige Dynein-assoziierte Funktionen in vegetativ wachsenden Zellen. Hier konnte in durch gezielte Mutationen gezeigt werden, dass DdLIS1 eine Rolle bei der Entwicklung spielt, auch wenn es selbst nicht entwicklungsreguliert ist.

Eine klare Aussage wurde erst durch die Generierung einer Doppelmutante möglich: Bei dieser ist die Aggregation in der Entwicklung gestört, also die Phase, in der wie bei Neuronen Zellbewegung und die Kommunikation zwischen den Zellen besonders wichtig sind. Da gezeigt werden konnte, dass Mikrotubuli dafür nicht essentiell sind, sind Spekulationen über gestörte Mikrotubuli-Dynamik als Ursache für die Migrationsstörung in *Dictyostelium* nicht haltbar. Mögliche Erklärungen bieten dagegen die nachgewiesene Interaktion mit Aktin oder die Beteiligung von LIS1 an der Regulation von PAF, einem intrazellulären Botenstoff, der auch in Neuronen eine Rolle spielt.

## Abkürzungsverzeichnis

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
ESI	„electro spray ionization“
<i>et al.</i>	und weitere
FITC	Fluoreszein-Isothiocyanat
g	Gravitation, Gramm
GFP	Grün-fluoreszierendes-Protein
gr	griechisch
h	Stunde
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-Ethansulfonsäure
H <sub>2</sub> O	destilliertes Wasser
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalaktopyranosid
IgG	Immunglobulin G
k	Kilo
kDa	Kilo-Daltons
KO	„knock out“, Nullmutante
l	Liter
M	Mol/l
m	Milli-

---

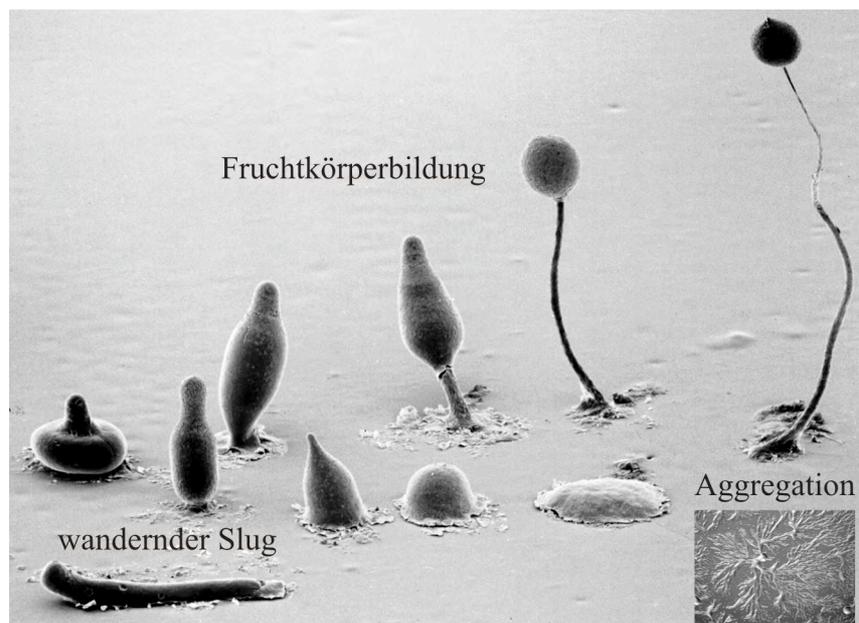
μ	Mikro-
MALDI	„matrix assisted laser desorption Ionization“
MBP	Maltose-bindendes-Protein
min	Minute
MRT	Magnetresonanztomographie
MS	Massenspektrometrie
MT	Mikrotubuli
MW	Molekulargewicht
N-	Aminoterminal
NBT	Nitroblautetrazoliumchlorid
OD	Optische Dichte
PAF	Plättchen-aktivierender Faktor
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat gepufferte isotonische Salzlösung
PCR	Polymerase Kettenreaktion („polymerase chain reaction“)
PIPES	1,4-Piperazindiethan-Sulfonsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT-PCR	Reverse-Transkriptions-Polymerase Kettenreaktion
s	Sekunde
SDS	Sodium (Natrium)-dodecylsulfat
TBS	N, N, N, N'-Tetramethylenediamin
ToF	„time of flight“
Tris	Tris-hydroxymethyl-ammoniummethan
Triton-X-100	t-Octylphenoxypropylpolyoxyethanol
Tween 20	Polyoxyethylen-sorbitanmonolaureat
U	Unit(s), Einheit der Enzymaktivität
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* ist im vegetativen Zustand ein amöboider Einzeller, der im Erdboden vorkommt. Die taxonomische Einordnung von *Dictyostelium* ist bis heute kontrovers. Einige seiner Merkmale wie Chemotaxis, Phagozytose oder die Produktion von Glycogen als Speicherform für Kohlenhydrate gleichen denen der Tiere, während die Produktion von Zellulose eigentlich charakteristisch für Pflanzen ist. Die neuesten Untersuchungen, die auf einem Vergleich ganzer Genome beruhen, zeigen eine Abzweigung vom eukaryotischen Stammbaum nach den Pflanzen, aber noch vor der Auseinanderentwicklung der Tiere und der Pilze (Eichinger *et al.*, 2005).

In der vegetativen, einzelligen Form ernähren sich die Amöben durch Phagozytose von Mikroorganismen und vermehren sich durch Teilung der Zellen. Bei Nahrungsmangel werden DNA-Synthese und Zellteilung eingestellt und cyclisches Adenosinmonophosphat (cAMP) pulsartig sezerniert. Durch die cAMP-Ausschüttung einer Einzelzelle beginnen Nachbarzellen chemotaktisch auf diese Zelle zuzuwandern und ebenfalls cAMP auszuschütten; es entstehen Aggregationszentren aus etwa  $10^5$  Zellen. Etwa nach 14 Stunden kann sich eine vertikale konusförmige Struktur bilden, der so genannte „Slug“, welcher phototaktisch zu wandern



**Abbildung 1: Der Entwicklungszyklus von *Dictyostelium discoideum*.** REM-Aufnahmen von M. J. Grimson und R. L. Blanton (Biological Sciences Electron Microscopy Laboratory, Texas Tech University).

vermag. Nun setzt die Differenzierung der Zellen zu Stiel- und Sporenzellen ein. Der Entwicklungsprozess endet etwa nach 24 Stunden mit Bildung des Fruchtkörpers. Bei günstigen Umweltbedingungen und ausreichendem Nahrungsangebot keimen die Sporen aus (Kessin, 2001).

*Dictyostelium* verfügt als Modellorganismus über spezielle Vorteile gegenüber anderen eukaryotischen Zellsystemen. *Dictyostelium* besitzt nur sechs Chromosomen, das Genom ist mit  $3,5 \times 10^7$  bp etwa hundertmal kleiner und enthält weniger und kleinere Introns als das von Säugerzellen. Im parasexuellen Zyklus liegt das Genom im haploiden Zustand vor, so dass sich jede Mutation direkt auf den Phänotyp des Organismus auswirkt. Dadurch wird die Isolation von Mutanten im Vergleich zu anderen gentechnisch manipulierbaren, eukaryotischen Systemen sehr erleichtert. Eine weitere Möglichkeit stellt die gezielte Unterbrechung und Deletion von Genen durch homologe Rekombination dar, die in *Dictyostelium* mit relativ hoher Effizienz durchgeführt werden kann (Kuspa *et al.*, 1995). Außerdem eignet sich der Einzeller auch gut für biochemische Ansätze, da er einfach und billig in großen Mengen kultiviert werden kann. Ein weiterer Pluspunkt für *Dictyostelium* als Modellorganismus ist die Fertigstellung des Genomprojektes (Eichinger *et al.*, 2005). Die Anzahl der vorhergesagten Gene beträgt ca. 12.500 und viele davon weisen eine hohe Sequenzübereinstimmung mit Homologen von Vertebraten auf.

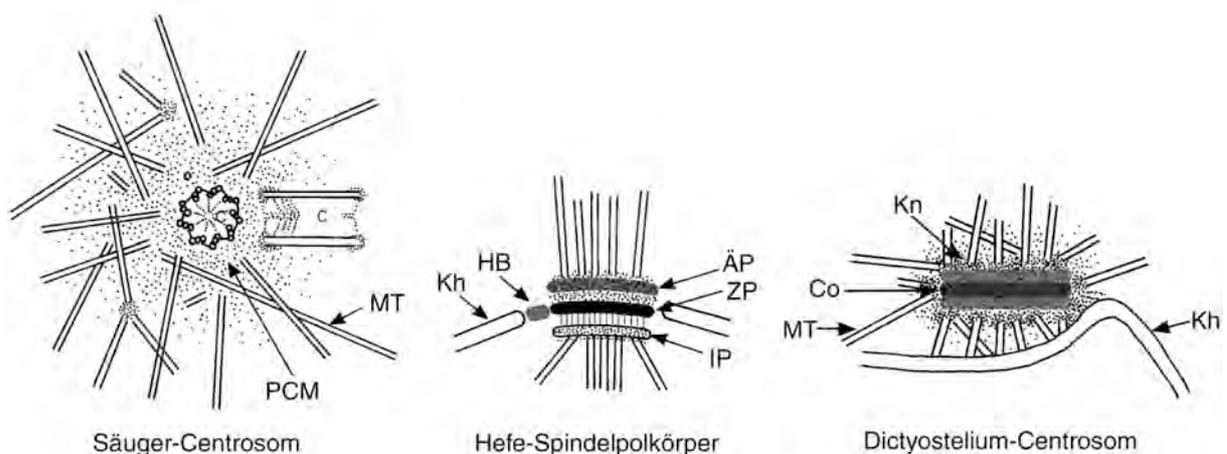
*Dictyostelium* wurde in den letzten Jahrzehnten als Modellsystem für die Untersuchung vieler verschiedener Gebiete der Zellbiologie herangezogen. Einen besonderen Vorteil bietet *Dictyostelium* für das Studium von Entwicklungsprozessen, da hier, im Gegensatz zu den meisten vielzelligen Organismen, das Wachstum unabhängig von der Differenzierung ist (Devreotes, 1989). Im Vergleich zu *S. cerevisiae*, dem länger genutzten und weiter verbreiteten Modellorganismus, hebt sich *Dictyostelium* gerade durch seine Ähnlichkeit zu phagozytischen Zellen von Säugern bezüglich Morphologie, Beweglichkeit, phagozytotischer und chemotaktischer Fähigkeiten ab und wird deshalb auch oft als „Mini-Makrophage“ bezeichnet. Aufgrund seines äußerst dynamischen Cytoskeletts ist *Dictyostelium* zum Studium der Zellmotilität besonders geeignet (Noegel und Luna, 1995). Außerdem ist *Dictyostelium* sehr zugänglich für zellbiologische Methoden, vor allem die Mikroskopie ist gut etabliert.

Auch als Modell für die Erforschung von Krankheiten eignet sich *Dictyostelium* durch seine Gemeinsamkeiten mit menschlichen Zellen hervorragend. Es wurden bereits mindestens 33 Gene identifiziert, deren Homologe im Menschen mit Krankheiten in Verbindung gebracht werden und im komplexen Säugersystem häufig schwer zugänglich sind (Williams *et al.*, 2006). Ein gutes Beispiel für den Nutzen, den *Dictyostelium* bringen kann, ist die Erforschung der Resistenz von Tumorzellen gegen Chemotherapeutika, die ein schwerwiegendes

Problem in der Krebsbekämpfung darstellt. Durch Mutageneseexperimente konnten in *Dictyostelium* sechs Gene identifiziert werden, die an der Resistenz gegen Cisplatin beteiligt sind (Li *et al.*, 2000).

## 1.2 Funktion und Aufbau von Centrosomen

Das Centrosom ist das Mikrotubuli-organisierende Zentrum (MTOC) und wird benötigt, um die instabileren Minus-Enden der Filamente zu nukleieren und zu stabilisieren. Es ist damit in der Zelle für alle Mikrotubuli-abhängigen Prozesse wie den Organelltransport, die Erhaltung der Zellstruktur sowie die Kontrolle der Zellmigration von grundlegender Bedeutung (Bornens und Moudjou, 1999; Doxsey, 2001; Kellogg *et al.*, 1994; Rieder *et al.*, 2001). Seit dem späten 19. Jahrhundert wird dem Centrosom eine wichtige Funktion in der Mitose und bei der Organisation der mitotischen Spindel zugesprochen (Boveri, 1887). Allerdings ist inzwischen gezeigt worden, dass unter bestimmten Umständen auch ohne Centrosomen eine Spindel gebildet werden kann (Rieder *et al.*, 2001). Entfernt man z. B. vor der Mitose eines der zwei Centrosomen, so kann eine normale, bipolare Spindel entstehen und die Chromosomen werden korrekt auf die beiden Tochterzellen aufgeteilt. Die Tochterzelle ohne Centrosom bleibt dann allerdings in der G1-Phase des Zellzyklus stehen (Hinchcliffe *et al.*, 2001; Khodjakov und Rieder, 2001). Dies besagt, dass das Centrosom neben seinen Aufgaben als MTOC auch eine wichtige Rolle bei der Regulation des Zellzyklus spielt.



**Abbildung 2: Centrosomentypen verschiedener 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". Modifiziert nach Dauderer *et al.* (1999).

In der Interphase ist jeder Zellkern der meisten Tier- oder Pilzzellen mit einem Centrosom assoziiert (Mazia, 1987). Pflanzenzellen hingegen besitzen kein Centrosom, die Mikrotubuli sind parallel am Cortex entlang angeordnet und werden von einzelnen Mikrotubuli-assoziierten Proteinen stabilisiert und organisiert (Murata *et al.*, 2005; Wasteneys, 2002). Centrosomen von tierischen Zellen enthalten ein Paar rechtwinklig zueinander angeordneter, aus Tubulin aufgebauter Hohlzylinder, die Centriolen (Abbildung 2). Diese sind von pericentriolarem Material umgeben, das Mikrotubuli-nukleierende Komplexe enthält (Raff und Glover, 1989).

Das MTOC in Hefe und generell in Pilzen wird als Spindelpolkörper bezeichnet (Snyder, 1994). Es erfüllt zwar ähnliche Aufgaben wie das Centrosom der Säugerzellen, unterscheidet sich von diesem aber sehr deutlich im Aufbau. Der Hefe-Spindelpolkörper enthält keine Centriolen, sondern besteht aus einer dreilagigen Struktur, die in die Kernhülle eingebaut ist (Abbildung 2). Die äußere und die innere Schicht enthalten die Proteine  $\gamma$ -Tubulin, Spc97 und Spc98, welche für die Nukleation der Mikrotubuli verantwortlich sind.

Auch in der Duplikation des Centrosoms gibt es deutliche Unterschiede zwischen den verschiedenen Organismen. Während in Säugerzellen die Centriolen am Ende der G1-Phase voneinander getrennt werden, und im Laufe der S-Phase je ein zweites Centriol dazugebaut wird, wird bei der Hefe in der G1-Phase ein zweiter Spindelpolkörper vollständig neu synthetisiert (Stearns, 2001; Winsor und Schiebel, 1997).

Die Regulation der Centrososomenduplikation ist erstaunlicherweise unabhängig vom Stadium des Zellkerns. Wird die DNA-Replikation inhibiert oder sogar der gesamte Zellkern entfernt, verdoppelt sich dennoch das Centrosom über mehrere Zyklen weiter (Gard *et al.*, 1990; Sluder *et al.*, 1986). Eine Hauptrolle bei der Regulation des Centrosomenzyklus spielen Mitglieder der Familie der Polo-Kinasen, welche auch an vielen anderen Prozessen des Zellzyklus beteiligt sind (Barr *et al.*, 2004). Wie wichtig die korrekte Verdopplung des Centrosoms ist, zeigt sich in den schwerwiegenden Konsequenzen, zu denen Störungen führen können. In Anwesenheit von überzähligen Centrosomen steigt die Wahrscheinlichkeit, dass es zur Bildung von multipolaren Spindeln kommt, was zur fehlerhaften Aufteilung der Chromosomen führt (Brinkley, 2001). In vielen humanen Tumoren wurden Abnormitäten bezüglich Anzahl, Größe und Morphologie der Centrosomen entdeckt (Fukasawa *et al.*, 1996; Nigg, 2004; Pihan *et al.*, 1998). Vor allem das Phänomen der überzähligen Centrosomen in einer Zelle ist daher Gegenstand vieler Forschungsarbeiten (Gräf *et al.*, 2000; Hinchcliffe und Sluder, 2001).

### 1.3 Das Centrosom von *Dictyostelium discoideum*

Wie der Spindelpolkkörper von Hefe enthält auch das Centrosom von *Dictyostelium* keine Centriolen, sondern eine ebenfalls dreilagige Zentralstruktur (Abbildung 2). Diese ist von einer  $\gamma$ -Tubulin-haltigen, Mikrotubuli-nukleierenden Matrix umgeben, die in *Dictyostelium* als Corona bezeichnet wird. Das Organell ist nicht wie bei Hefezellen in die Kernhülle eingebettet, sondern auf bisher unbekannte Weise außen am Zellkern angeheftet. Diese Verbindung ist sehr stark und machte es schwierig, Centrosomen bei einer Aufreinigung vom Zellkern abzutrennen, ohne sie dabei zu zerstören. Mechanische Einwirkungen und die Behandlung mit KI, welches Proteinkomplexe auflösen kann, zeigten kaum Wirkung (Omura und Fukui, 1985). Erst durch die Entdeckung, dass Pyrophosphat diese Verbindung auflösen kann, war es möglich geworden, kernfreie Centrosomen aus *Dictyostelium* zu präparieren (Gräf *et al.*, 1998).

Ein weiterer Unterschied zum Spindelpolkkörper der Hefe zeigt sich bei der Verdopplung des Organells. In *Dictyostelium* findet ähnlich wie bei Säugercentrosomen eine semikonservative Duplikation statt. Nach der Auflösung der Corona werden die beiden äußeren Schichten voneinander getrennt. Diese klappen dann zusammen, akkumulieren eine Zwischenschicht und eine Corona, so dass erneut eine mehrlagige Struktur entsteht (Ueda *et al.*, 1999). Der Prozess läuft nicht wie bei Säugern und Hefe bereits in der Interphase ab, sondern beginnt erst während der Mitose.

Auf molekularer Ebene gibt es derzeit noch wenige Erkenntnisse: Für das menschliche Centrosom sind in einer Massenspektrometrie-Analyse 111 wahrscheinliche centrosomale Proteine identifiziert worden (Andersen *et al.*, 2003). Zusammen mit weiteren bekannten centrosomalen Proteinen wäre das Säugercentrosom damit aus über 120 verschiedenen Proteinen aufgebaut. Bisher sind in *Dictyostelium* allerdings nur 10 Proteine bekannt (Gräf *et al.*, 2004). Es ist daher wichtig, weitere centrosomale Proteine zu identifizieren, um unser Verständnis für die Funktionsweise dieser in der Zelle so wichtigen Struktur zu verbessern.

### 1.4 Erforschung des Centrosoms von *Dictyostelium discoideum*

Ein generelles Problem bei der Erforschung des Centrosoms ist, dass es keine klaren Grenzen aufweist. Dadurch ist der Übergang zwischen Centrosom und Cytoplasma fließend. Es ist daher wichtig, das Centrosom zu definieren. Die häufigste und allgemein akzeptierte Definition besagt, dass echte Bestandteile des Centrosoms keine Mikrotubuli für ihre Lokalisation am Centrosom benötigen. Das bedeutet, dass alle Proteine, die an isolierten, Mikrotubuli-freien

Centrosomen nachweisbar sind, als centrosomale Proteine bezeichnet werden. Proteine, die mit Mikrotubuli am Centrosom lokalisieren, aber bei der Präparation verloren gehen, sind demnach Centrosom-assoziiert.

Zur Erforschung eines Organells wie des Centrosoms in *Dictyostelium* können unterschiedliche genetische oder biochemische Herangehensweisen gewählt werden. Eine wegen der guten Transformierbarkeit von *Dictyostelium* sehr beliebte Methode ist eine Mutagenese mittels REMI (restriction enzyme mediated integration) (Adachi *et al.*, 1994). Hierbei wird unter Anwesenheit eines Restriktionsenzymes ein Plasmid in das Genom eingebaut, was zum Ausfall von beliebigen Genen führen kann. Vorteil dieser Methode ist, dass man nach der Rückgewinnung des Plasmids sehr schnell an die Sequenz von flankierenden Genen gelangen kann. Allerdings ist diese Methode für die Untersuchung des Centrosoms nicht gut geeignet, da die meisten centrosomalen Proteine essentiell sein dürften, und man dadurch wegen des haploiden Genoms keine interessanten Mutanten erhalten würde.

Ein großer Fortschritt für die Erforschung von *Dictyostelium* war die Fertigstellung des Genomprojektes, wodurch nun das gesamte Erbgut zugänglich ist (Eichinger *et al.*, 2005). Mit Hilfe dieser Daten kann man nun leicht an Sequenzen von Proteinen gelangen, welche entweder interessante Domänen oder Ähnlichkeiten zu bekannten Proteinen aufweisen. Auf diese Weise wurden in *Dictyostelium* bereits mehrere centrosomale Proteine gefunden, z. B. die ursprünglich in Hefe identifizierten Spindelpolkomponenten DdSpc97 und DdSpc98 (Dauderer und Gräf, 2002),  $\gamma$ -Tubulin (Euteneuer *et al.*, 1998), das Centrin-Homologe CenA (Dauderer *et al.*, 2001), oder das Mikrotubuli-bindende Protein DdEB1 (Rehberg und Gräf, 2002).

Für biochemische Analysen des Centrosoms war es notwendig, ein Isolationsprotokoll zu entwickeln (Gräf *et al.*, 1999). Hierbei wird in den ersten Schritten ausgenutzt, dass das Centrosom fest am Kern verankert ist. Nach einer Anreicherung der Kerne werden die Centrosomen mit Hilfe von Pyrophosphat und Scherkräften abgelöst und anschließend durch Dichtegradientenzentrifugation aufgereinigt. So konnten Centrosomen gewonnen werden, die voll funktionsfähig und damit in der Lage waren, als Nukleationskern für Mikrotubuli zu dienen (Gräf *et al.*, 1998). Diese Centrosomen wurden für die Immunisierung von Mäusen und somit zur Erzeugung von monoklonalen Antikörpern verwendet. Mit diesen Antikörpern wiederum war es möglich, weitere centrosomale Proteine zu finden, wie z.B. das Mikrotubuli-assoziierte Protein DdCP224 (Gräf *et al.*, 1999).

Die Sequenzdaten des Genomprojektes bieten die Möglichkeit, die aufgereinigten Centrosomen für einen noch umfangreicheren Ansatz zu nutzen. Die Kombination von hoch entwickelten Auftrennungsmethoden mit Techniken der Massenspektrometrie macht es

theoretisch möglich, alle Proteine eines Organells zu ermitteln. Dieser Ansatz ist bei anderen Organismen bereits mehrfach angewendet worden, um neue Proteine des Centrosoms/Centriols bzw. Spindelpolkkörpers zu identifizieren (Andersen *et al.*, 2003; Keller *et al.*, 2005; Lange *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2004; Pazour *et al.*, 2005; Wigge *et al.*, 1998). Für das menschliche Centrosom konnten so 23 neue centrosomale Proteine sowie 41 weitere Kandidaten gefunden werden (Andersen *et al.*, 2003).

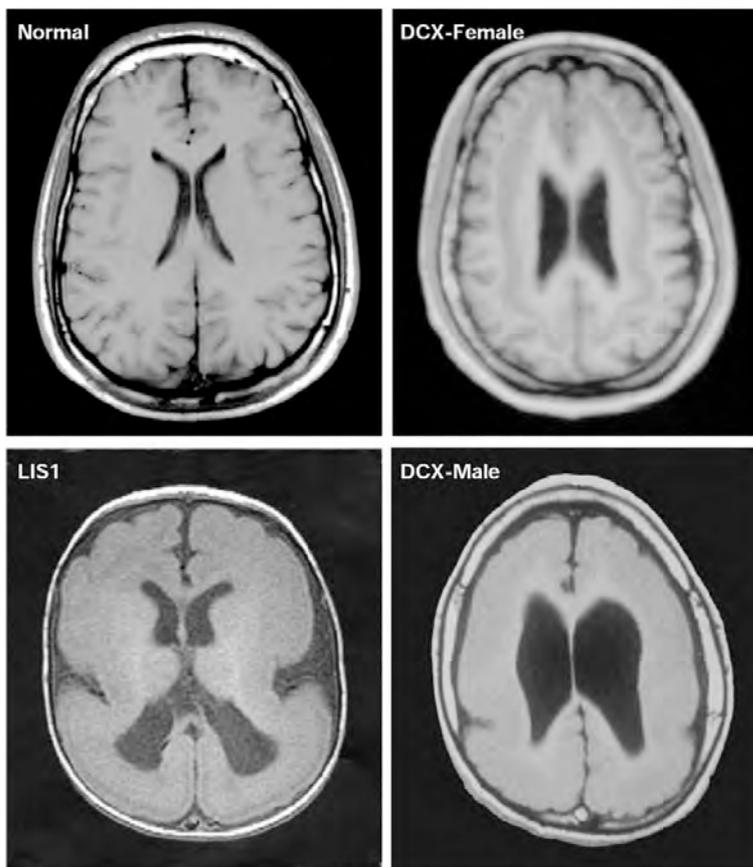
Um ein umfassenderes Wissen über das Centrosom und seine Funktion zu sammeln, ist es aber nicht nur interessant, Proteine zu kennen, die direkt am Aufbau des Centrosoms beteiligt sind, sondern auch Interaktionspartner von centrosomalen Proteinen zu identifizieren. Mit Hilfe der „Tandemaffinitätsaufreinigung“ (TAP-Methode) wurde bereits nach Interaktoren von DdEB1 und DdCP224 gesucht und so z. B. das ebenfalls centrosomale Protein DdTACC gefunden (Koch *et al.*, 2006). Aber auch hier kann auf bekanntes Wissen aus anderen Organismen zurückgegriffen werden, indem man das Genom nach Homologen zu bekannten Interaktoren von centrosomalen Proteinen durchsucht. Beispielsweise ist bei Säugern bekannt, dass die beiden an der Krankheit Lissenzephalie beteiligten Proteine Doublecortin (DCX) und LIS1 miteinander interagieren (Caspi *et al.*, 2000). Da LIS1 in *Dictyostelium* ebenfalls am Centrosom nachgewiesen werden konnte (Rehberg *et al.*, 2005), ist es auch interessant, das homologe Protein zu DCX zu identifizieren und zu untersuchen.

## 1.5 Lissenzephalie, LIS1 und Doublecortin (DCX)

Lissenzephalie ist der Oberbegriff für eine Reihe von Entwicklungsstörungen des Gehirns, die zu schweren Behinderungen bei Neugeborenen führen. Allen Arten gemeinsam ist eine Wanderungsstörung der Nervenzellen des Gehirns in den ersten 1-4 Monaten der Entwicklung des Fötus. Die Folge dieser Störung ist der fehlende Aufbau der sieben kortikalen Zellschichten und dadurch eine glatte (gr.: lissos) Ausprägung der Oberfläche der Großhirnrinde. Die meisten betroffenen Kinder sind entweder durch mangelnde Großhirnaktivität gar nicht lebensfähig oder bleiben auf der Entwicklungsstufe eines Säuglings stehen. Ihre Lebenserwartung ist trotz intensiver Betreuung deutlich reduziert. Sie bleiben lebenslang schwere Pflegefälle mit starken intellektuellen und körperlichen Defiziten (Dobyns *et al.*, 1993).

Die häufigste Ursache für Lissenzephalie sind Mutationen in den zwei Genen *lis1* und *dcx* (Leventer *et al.*, 2000; Pilz *et al.*, 1998). Da letzteres sich auf dem X-Chromosom befindet, kann es bei Mutationen des *dcx*-Gens bei Frauen zu einer Sonderform der Lissenzephalie kommen. Durch unterschiedliche X-Inaktivierung kommt es zur Ausbildung eines Mosaikphänotyps, des so genannten „Doppel-Cortex“ Syndroms, wodurch das Protein seinen Namen

erhielt (des Portes *et al.*, 1998). Dabei sind einige Neuronen, bei denen das X-Chromosom mit dem mutierten Allel deaktiviert ist, in der Lage, ihre Wanderung zu vollziehen und sorgen so für eine gefurchte und gelappte Oberfläche der Großhirnrinde. Die anderen Neuronen können durch das Fehlen des funktionellen DCX-Proteins nicht bis zur Oberfläche des Gehirns vordringen und bilden so eine weiter innen liegende, zweite Schicht mit Zellkörpern, also einen zweiten Cortex. In MRT-Aufnahmen des Gehirns ist dieses Phänomen an zwei Schichten aus grauer Substanz zu erkennen (Hashimoto *et al.*, 1993).



**Abbildung 3: Erscheinungsbild von Lissenzephalie in MRT-Aufnahmen des Gehirns.** Normal: Aufnahme eines gesunden Menschen; DCX-Female: Doppelcortex-Syndrom, weiblicher Patient mit Mutation in *dcx* auf einem X-Chromosom, LIS1 und DCX-Male: Volle Ausprägung von Lissenzephalie durch Mutation in LIS1 bzw. DCX. Abbildung aus (Feng und Walsh, 2001)

Die beiden Proteine LIS1 und DCX sind Mikrotubuli-bindende Proteine und bewirken eine Stabilisierung der Filamente (Horesh *et al.*, 1999; Sapir *et al.*, 1999a). LIS1 hat neben der Bedeutung während der Gehirnentwicklung auch noch wichtige Funktionen in anderen Zelltypen. Es ist ein Bestandteil des Mikrotubuli-plus-End-Komplexes (Xiang, 2003). Dieser sorgt für eine Verankerung der Mikrotubuli am Zellcortex und ist notwendig für Transportprozesse wie auch die Positionierung des Zellkerns und der Spindel (Vaughan, 2005). Andere wichtige Proteine in diesem Komplex sind XMAP215-Homologe, Dynein, Komponenten des Dynaktin-Komplexes und EB1.

Als erstes wurde LIS1 als die regulative  $\beta$ -Untereinheit des PAF-Acetylhydrolase-Komplexes (PAF-AH) identifiziert (Hattori *et al.*, 1994). Dieser Enzymkomplex ähnelt in der Struktur einem heterotrimeren G-Protein und sorgt für die Regulation des „Plättchen-aktivierenden Faktors“ (PAF). PAF ist ein bioaktives Phospholipid und erfüllt zahlreiche Funktionen; unter anderem dient es als intrazellulärer Botenstoff, der neuronale Differenzierungsvorgänge beeinflusst.

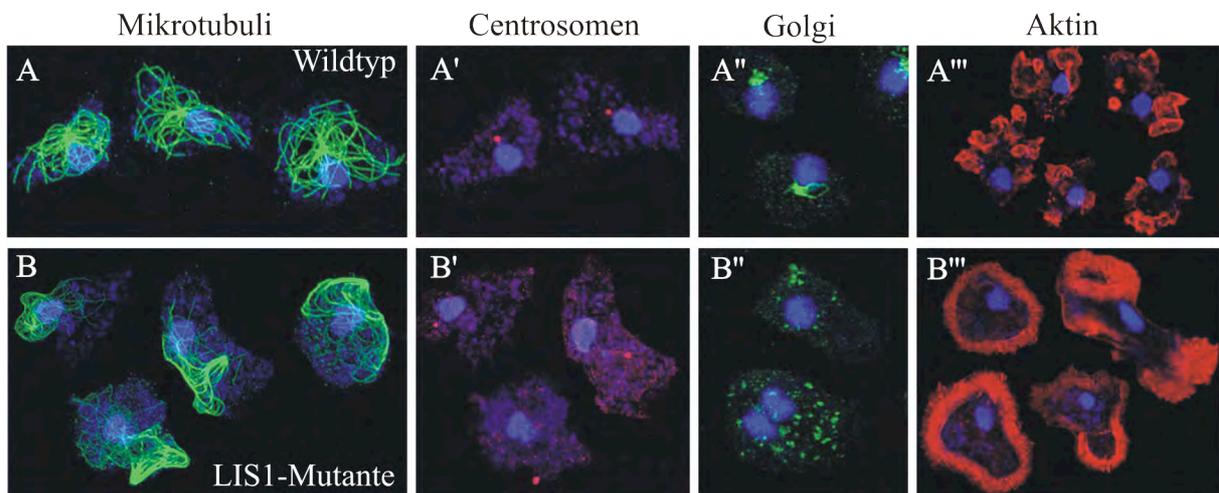
DCX ist im Gegensatz zu LIS1 bisher nur in Vertebraten bekannt und untersucht. Charakteristisch für das Protein sind zwei Mikrotubuli-bindende Bereiche, die so genannten DC-Domänen (Sapir *et al.*, 2000). Zwar existieren Proteine mit DC-Domänen auch in niederen Organismen, diese enthalten aber entweder nur eine DC-Domäne oder zusätzlich Kinasedomänen (Gönczy *et al.*, 2001).

In Säugerzellen interagieren die beiden Mikrotubuli-assoziierten Proteine DCX und LIS1 miteinander (Caspi *et al.*, 2000). Zusätzlich scheinen sie ähnliche Funktionen zu erfüllen, da Überexpression des Einen zur Schwächung des Phänotyps einer Mutation des Anderen führt (Tanaka *et al.*, 2004). Wie diese beiden Proteine genau zusammenarbeiten, ist allerdings nicht bekannt. Es ist auch recht schwer, die Funktion von Doublecortin zu erforschen, da dieses nur in Nervenzellen während einer frühen Phase der Gehirnentwicklung im ein bis vier Monate alten Fötus exprimiert wird. Es ist daher sinnvoll, für die Untersuchung dieses Proteins einen Organismus zu wählen, der in der Expressionsphase des Proteins besser zugänglich ist.

## 1.6 LIS1 in *Dictyostelium discoideum*

In *Dictyostelium discoideum* konnte ein Protein identifiziert werden, welches in 55 % seiner Aminosäuren mit dem menschlichen LIS1 übereinstimmt. Die Eigenschaften und Funktionen von DdLIS1 wurden in vegetativen Zellen bereits recht genau untersucht (Rehberg *et al.*, 2005). Das Protein lokalisiert entlang von Mikrotubuli während Interphase und Mitose, und ist ferner ein echtes centrosomales Protein, da es an isolierten Centrosomen nachgewiesen werden konnte. DdLIS1 interagiert mit einer Reihe von Proteinen, darunter das centrosomale Protein DdCP224, das *Dictyostelium*-Homolog zu den Mikrotubuli-assoziierten Proteinen XMAP215 aus *Xenopus*, Msps aus *Drosophila* und dem menschlichen TOG1 Protein. Es konnte auch eine direkte Bindung an die kleine GTPase Rac1A gezeigt werden. Zusätzlich interagiert DdLIS1 mit Komponenten des Dynein/Dynaktin-Komplexes. Dieser befindet sich am Zellcortex und verankert dort Mikrotubuli mit dem Cortex. Dadurch wird die radiale Mikrotubuliorganisation aufrechterhalten und das Centrosom und mit ihm der Zellkern in der Mitte der Zelle positioniert (Euteneuer und Schliwa, 1992; Koonce *et al.*, 1999). Dieser

Zusammenhang zwischen LIS1 und Dynein erklärt, warum eine Punktmutation im DdLIS1-Gen (DdLIS1-D327H) zu Phänotypen führt, die teilweise bereits für Dynein-Mutanten beschrieben sind (Koonce *et al.*, 1999; Koonce und Samsó, 1996). Dazu zählen eine Fehlorganisation des Golgi-Apparates, die Ablösung des Centrosoms vom Kern und eine massive Störung des Mikrotubuli-Cytoskeletts (Abbildung 4). Die Mikrotubuli scheinen den Kontakt zum Zellkortex zu verlieren, sind länger und gebündelt. Das Centrosom ist häufig nicht wie im Normalfall im Zellschwerpunkt (Centroid) zu finden, sondern bewegt sich schnell kreisförmig durch die Zelle und zieht dabei die Mikrotubuli wie einen Kometenschweif hinter sich her. Erklärt wird dieses Phänomen mit einer Störung des Dynein/Dynaktin-Komplexes, welcher dann nicht mehr in der Lage ist, die Mikrotubuli-Enden am Zellcortex zu fixieren.



**Abbildung 4: Die Punktmutation in DdLIS1 bewirkt eine deutliche Störung des Mikrotubuli- und Aktin-Cytoskeletts und des Golgi-Apparates.** Immunfluoreszenz-Mikroskopie von vegetativen Zellen des Stamms DdLIS1-D327H (B) im Vergleich zum Wildtyp (A). Gezeigt sind die Färbung von Mikrotubuli (A und B), Centrosomen (A' und B'), Golgi-Apparat (A'' und B'') und F-Aktin (A''' und B''').

Neben diesen Mikrotubuli-assoziierten Defekten wurde für die Mutante DdLIS1-D327H eine Verringerung des F-Aktin-Gehalts gemessen. Dies führt zu Wellen von Aktin-Polymerisation, die mit Hilfe von GFP-Aktin beobachtet werden können (Rehberg *et al.*, 2005). Ähnliches sieht man in Zellen, die mit einer geringen Menge der Aktin-depolymerisierenden Substanz Latrunculin A behandelt wurden. Eine mögliche Erklärung für diese Veränderung des Aktin-Cytoskeletts ist die Interaktion von DdLIS1 mit Rac1A, welches an der Regulation der Aktin-Dynamik beteiligt ist (Dumontier *et al.*, 2000).

## 1.7 Die Rolle von Mikrotubuli in *Dictyostelium discoideum*

Die essentielle Rolle von Mikrotubuli in der Mitose ist unumstritten. In *Dictyostelium* wie in allen anderen eukaryotischen Zellen werden diese Filamente benötigt, um eine Mitosespindel aufzubauen und damit für eine korrekte Aufteilung des Erbguts zu sorgen (Inoue, 1997). Auch in der Interphase sind Mikrotubuli wichtig. Sie dienen als Transportschienen und sind an der Polarisierung einer Zelle beteiligt (Schliwa, 1984; Small *et al.*, 2002; Steinberg und Fuchs, 2004). Dies ist vor allem in großen Zellen, wie z. B. Säugetierzellen, besonders wichtig. In kleineren Zellen, wie Hefezellen, reicht dagegen der Aktin-basierte Transport aus (Hoyt *et al.*, 1991; Yokoyama *et al.*, 1990). Eine Störung der Mikrotubuli bewirkt hier hauptsächlich eine Blockade der Mitose.

Auch in den kleinen *Dictyostelium*-Zellen scheinen Mikrotubuli in der Interphase keine so große Bedeutung zu haben. Ein Beispiel hierfür ist die oben beschriebene DdLIS1-Punktmutante. Diese Zellen zeigen in der Interphase ein stark gestörtes Mikrotubuli-Cytoskelett. Dennoch wachsen die Zellen auf Bakterien wie auch in Flüssigmedium normal, was auf funktionierende Phago- bzw. Pinocytose schließen lässt. Es ist außerdem keine Hemmung ihrer Beweglichkeit zu erkennen (Rehberg *et al.*, 2005).

Über die Rolle der Mikrotubuli und des Centrosom während der Entwicklung von *Dictyostelium* ist dagegen weniger bekannt. Es gibt zahlreiche Untersuchungen, die zeigen, dass für die gerichtete Zellbewegung in der Aggregationsphase wie auch in späteren Phasen Aktin-Polymerisation essentiell ist (Affolter und Weijer, 2005; Bretschneider *et al.*, 2002; Kimmel und Parent, 2003; Van Haastert und Devreotes, 2004). In manchen Säugerzelltypen werden für die gerichtete Zellbewegung zusätzlich noch Mikrotubuli benötigt, die für eine Polarisierung der Zelle und die Fortbewegung des Zellkerns sorgen (Lin *et al.*, 1994; Schliwa *et al.*, 1999). Vor allem für große Zellen, die sich langsam bewegen, scheinen Mikrotubuli essentiell zu sein. Kleinere und sehr mobile Zelltypen weisen dagegen auch unter Mikrotubuli-depolymerisierenden Bedingungen eine Polarisierung auf und können sich gerichtet bewegen (Schliwa und Höner, 1993). Inwieweit das auch für die kleinen und flinken *Dictyostelium*-Amöben zutrifft, ist weitgehend unbekannt.

## 1.8 Ziele der Arbeit

Das wichtigste Ziel dieser Arbeit war es, neue centrosomale Proteine zu identifizieren, um damit ein umfassenderes Wissen über das *Dictyostelium*-Centrosom zu sammeln. Als erste Möglichkeit sollte hierfür im Genom der Amöbe nach Homologen zu bekannten centrosomalen Proteinen aus anderen Organismen gesucht werden. Um auch unbekannte Proteine zu identifizieren, wurde zusätzlich ein „Proteomics“-Ansatz gewählt. Hierfür sollte die Präparation von Centrosomen aus *Dictyostelium* optimiert werden, um so Verunreinigungen durch DNA und nicht-centrosomale Proteine zu reduzieren. Die so gewonnenen Centrosomen sollten dann in Zusammenarbeit mit Dr. Albert Sickmann und Dr. Yvonne Reinders am Rudolf-Virchow-Institut in Würzburg mit Hilfe verschiedener Auftrennungsmethoden und anschließender Massenspektrometrie analysiert werden.

Ein weiteres Ziel war es, das DCX-Protein von *Dictyostelium* zu untersuchen und zu ermitteln, welche Rolle das in Vertebraten nur in Neuronen exprimierte Protein in der geselligen Amöbe spielt. Insbesondere schien hier die Interaktion und Zusammenarbeit mit dem centrosomalen Protein DdLIS1 interessant zu sein. Für die Erforschung dieser Zusammenhänge eignet sich *Dictyostelium* sehr gut, da dieser Modellorganismus gut zugänglich ist und als einziges nicht-Säugetiersystem alle bekannten an Lissenzephalie beteiligten Proteine vorweisen kann (Williams *et al.*, 2006).

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Reagenzien

Soweit nicht anders erwähnt, stammten die verwendeten Laborchemikalien von Merck, Sigma-Aldrich, Carl Roth, Difco, AppliChem und Boehringer Mannheim und hatten den Reinheitsgrad „p. a.“.

#### 2.1.2 Antikörper

##### Primäre Antikörper

Anti-DdDCX, Kaninchen Antiserum	diese Arbeit
Anti-DdLIS1, Kaninchen Antiserum	Rehberg <i>et al.</i> , 2005
Anti-DdCP224, DdCP224HIND, Kaninchen Antiserum	Hestermann und Gräf, 2004
Anti-DdCP224, mAb 2/165	Gräf <i>et al.</i> , 1999
Anti-DdEB1, Kaninchen Antiserum	Rehberg und Gräf, 2002
Anti- $\gamma$ -Tubulin, Kaninchen Antiserum	Euteneuer <i>et al.</i> , 1998
Anti-Dd14-3-3, Kaninchen Antiserum	Dr. A. Müller-Taubenberger
Anit-CABP1, mAb	Bain <i>et al.</i> , 1991
Anti-Aktin, mAb 224-236-1	Westphal <i>et al.</i> , 1997
Anti-GFP, Kaninchen Antiserum	Faix <i>et al.</i> , 2001
Anti-GFP, mAb 264-236-1	Chemicon
Anti-MBP, Kaninchen Antiserum	Gräf, 2001b
Anti-P0, mAb	Dr. Markus Maniak
Anti-Tubulin, mAb YL1/2	Chemicon
Anti-FLAG, mAb M2	Sigma-Aldrich
Anti-Digoxigenin	Boehringer Mannheim

##### Sekundäre Antikörper

Ziege-anti-Maus IgG Antikörper, Peroxidasekonjugat	Sigma-Aldrich
Ziege-anti-Kaninchen IgG Antikörper, Peroxidasekonjugat	Sigma-Aldrich
Ziege-anti-Ratte IgG Antikörper, Peroxidasekonjugat	Sigma-Aldrich
Ziege-anti-Maus IgG Antikörper, alkalische Phosphatase	Sigma-Aldrich
Ziege-anti-Maus IgG Antikörper, gekoppelt an Cy3	Dianova
Ziege-anti-Kaninchen IgG Antikörper, gekoppelt an Cy3	Dianova
Ziege-anti-Maus Alexa 488 oder 568	Molecular Probes, Inc.
Ziege-anti-Kaninchen 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 Antibiotika

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

### 2.1.5 Medien

#### 2.1.5.1 Medien für die *Dictyostelium discoideum*-Kultur

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

14,3 g/l Pepton (Oxoid); 7,15 g/l Hefeextrakt (Oxoid); 18 g/l Glukose; 3,5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 3,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; pH 6,7.

HL5c-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<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0,35 g/l Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; pH 6,5.

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

14,6 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 2 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; pH 6,0.

Phosphatagarplatten

15 g/l Bacto Agar in Phosphatpuffer.

SM-Agarplatten

10 g/l Pepton (Oxoid); 1 g/l Hefeextrakt (Oxoid); 10 g/l Glukose; 9 g/l Bacto Agar; 16 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 5,7 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 4 mM MgSO<sub>4</sub>; pH 6,5.

Elektroporationspuffer

50 mM Saccharose; 10 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; pH 6,1.

#### 2.1.5.2 Medien für die *E. coli*-Kultur (Sambrook *et al.*, 1989)

LB-Medium

10 g/l Trypton; 5 g/l Hefeextrakt; 5 g/l NaCl; pH 7,4.

LB-Agarplatten

1,5 % Agar in LB-Medium.

LB/Ampicillin

LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin.

**SM-Puffer**

100 mM NaCl; 8 mM MgSO<sub>4</sub>; 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 MgSO<sub>4</sub>; 10 mM MgCl<sub>2</sub>.

**Einfriermedium**

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

**2.1.6 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 MgCl<sub>2</sub>; pH 6,9.

**TE-Puffer**

10 mM Tris/HCl; 1 mM EDTA; pH 8,0.

**20 × SSC**

3 M NaCl; 0,3 M Na-Citrat; pH 7.

**10 × TAE**

400 mM Tris; 10 % Eisessig; 10 mM EDTA; pH 8,3.

**6 × TAE-Probenpuffer**

10 mM Tris/HCl, pH 8,0; 50 mM Na-EDTA; pH 8,0; 1 % SDS; 30 % Glycerin;  
0,025 % Bromphenolblau.

**PBS**

70 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 30 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 150 mM NaCl; pH 7,0.

**TBS**

10 mM Tris/HCl; pH 7,4; 150 mM NaCl.

**TBST**

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

**Harnstoff-Probenpuffer**

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

**6 × Laemmli-Probenpuffer**

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

**SDS-Laufpuffer**

25 mM Tris/HCl; pH 8,3; 0,1 % SDS (w/v); 192 mM Glycin.

5 × Fish-Puffer für GST-Pulldown

25 % Glycerin; 200 mM Tris/HCl; pH 7,4; 250 mM NaCl; 5 % NP40; 10 mM MgCl<sub>2</sub>.

Einbettmedium "Moviol" für Immunfluoreszenz-Mikroskopie

120 mg/ml Polyvinylalkohol 4-88; 30 % Glycerin; 0,2 M Tris-HCl; pH 8,8.

50 × PC (Proteaseinhibitormischung)

50 mM Pefabloc SC; 1,25 mg/ml Leupeptin; 0,5 mg/ml Tosyl-arginin-methylester; 0,5 mg/ml Soybean trypsin inhibitor; 0,05 mg/ml Aprotinin; 0,05 mg/ml Pepstatin.

### 2.1.7 Puffer und Lösungen für die Präparation von Centrosomen (Schulz *et al.*, 2006)

Lysepuffer

100 mM Na-PIPES; pH 6,9; 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 % (w/v) Saccharose.

frisch dazu: 1 mM ATP; 1 × PC; 0,3 % Triton X-100; 2 mM Benzamidin; 1 mM DTT; 2 μM Cytochalasin A.

Saccharoselösung für Kernaufreinigung

100 mM Na-PIPES; pH 6,9; 2 mM MgCl<sub>2</sub>; 55 % (w/v) Saccharose.

frisch dazu: 1 mM ATP; 1 × PC; 0,3 % Triton X-100; 2 mM Benzamidin; 1 mM DTT.

Pyrophosphatpuffer

100 mM Na-PIPES; pH 6,9; 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 30 % (w/v) Saccharose.

frisch dazu: 40 mM tetra-Natriumdiphosphat; 1 mM ATP; 1 × PC, 1 % Triton X-100; 2 mM Benzamidin; 1 mM DTT; 2 μM Cytochalasin A.

Gradientenpuffer

10 mM Na-PIPES ; pH 6,9; 2 mM MgCl<sub>2</sub>

frisch dazu: 0,1 % Triton X-100; 2 mM DTT.

Saccharoselösungen für Gradienten

10 mM Na-PIPES; pH 6,9; 2 mM MgCl<sub>2</sub>; Saccharose (50, 55 oder 80 %).

frisch dazu: 1 mM ATP; 1 × PC; 0,1 % Triton X-100; 2 mM Benzamidin; 2 mM DTT.

### 2.1.8 Vektoren

pA6PGFP-SSEB	Gräf <i>et al.</i> , 2003
pA15PGFPV18	Rehberg <i>et al.</i> , 2005
pDisc-Flag-SSEB	Gräf <i>et al.</i> , 2000
pMALc2	New England Biolabs
pGex-4T-2	GE Healthcare
pLPBLP	Faix <i>et al.</i> , 2004
pDEX-NLS-cre	Faix <i>et al.</i> , 2004

### 2.1.9 Bakterien und *Dictyostelium discoideum*-Stämme

*E. coli* XL-1 blue (Stratagene) wurde für Klonierungen verwendet.

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

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

*Dictyostelium* Stamm Clathrin-GFP: NC4A2 transformiert mit pTX-GFP-CLC (Damer und O'Halloran, 2000).

*Dictyostelium* Stamm DdLIS1-D327H (Rehberg *et al.*, 2005)

*Dictyostelium* Stamm GFP-Tubulin (Rehberg und Gräf, 2002)

*Dictyostelium* Stamm GFP-DdCP224ΔN (Gräf *et al.*, 2000)

### 2.1.10 Computerprogramme

Microsoft Office 2003, Adobe Photoshop 5.5, Endnote 8.0.1, CorelDraw 12, DNA-Strider 1.4f6, Zeiss LSM 510Meta Software 3.2, Zeiss Axiovision 4.5, Compix SimplePCI 5.2, Image J 1.34l, Quicktime Pro 7.1.1, Huygens Essential 3.0.4pl.

### 2.1.11 Andere Materialien

0,45 µm Polycarbonat Filter	Nuclepore, Costar GmbH
5 µm Polycarbonat Filter	Nuclepore, Costar GmbH
Amyloseharz	GE Healthcare
NHS-Sepharose 4B	GE Healthcare
Glutathione-Sepharose™ 4 fast flow	GE Healthcare
Hybond N Nylon Membran	GE Healthcare
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 6 × TAE-Probenpuffer 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) kombiniert mit einer Geldokumentationssoftware (Intas) 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  $OD_{260}$  von 1,0 entsprechen 50  $\mu\text{g/ml}$  DNA (Sambrook *et al.*, 1989). Häufig wurde die DNA-Konzentration auch durch den Vergleich der Bandenintensitäten mit einem Molekulargewichts-Marker in Ethidiumbromid gefärbten Agarosegelen 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) 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 (verschiedene Hersteller) benutzt. 25  $\mu\text{l}$  Reaktionen enthielten 0,8 mM dNTP (0,2 mM jedes Nukleotids), 25 pmol 5'- und 3'-Primer, 1 U Taq-Polymerase und 2,5  $\mu\text{l}$  10  $\times$  PCR-Puffer (100 mM Tris/HCl; pH 8,3), 500 mM KCl, 15 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0,1 % (w/v) Gelatine). Als „Template“ wurden cDNA, genomische oder Plasmid-DNA eingesetzt. Vor den Amplifizierungsschritten wurde der Reaktionsansatz bei 94°C für 3 min denaturiert. Generell wurden 33 Vervielfältigungs-Zyklen (Denaturierung bei 94°C für 30 s, Hybridisierung bei 48-55°C für 45 s, Elongation bei 68 oder 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 (Boehringer Mannheim) oder das ReproFast PCR System (Genaxxon) unter Befolgung der Herstellerangaben benutzt.

### 2.2.6 Reverse-Transkriptions-PCR (RT-PCR)

Diese Methode wurde zur Vervielfältigung von unspezifischen oder spezifischen cDNA-Fragmenten mit bekannten flankierenden Sequenzen verwendet. 1  $\mu\text{g}$  polyadenylierte RNA (Abschnitt 2.2.18) wurde mit 1  $\mu\text{g}$  eines unspezifischen Oligo-dT-Primers oder spezifischen reversen Primers in einem Gesamtvolumen von 16  $\mu\text{l}$  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  $\mu\text{l}$  5  $\times$  M-MLV-Puffer (Promega), 2  $\mu\text{l}$  dNTP-Mix (5 mM jedes Nukleotids), 1  $\mu\text{l}$  RNasin Inhibitor (Boehringer

Mannheim) und 1 µl M-MLV Reverse-Transkriptase (Promega) gestartet und bei 42°C für 1 h 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 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 2 und 12 h gespalten. Die Vollständigkeit der Reaktion wurde auf einem Agarosegel überprüft.

### **2.2.8 Phosphatase Behandlung (Sambrook *et al.*, 1989)**

Um eine Religation von linearisierten Vektoren mit kompatiblen Enden zu verhindern, wurden die 5'-Phosphatgruppen durch Behandlung mit alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm entfernt. 2,5 µg des linearisierten Vektors wurden in einem Reaktionsansatz von 25 µl in 1 × Phosphatase-Puffer (50 mM Tris/HCl, pH 9,0; 1 mM MgCl<sub>2</sub>; 0,1 mM ZnCl<sub>2</sub>; 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.

### **2.2.9 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 1 × 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.

### **2.2.10 DNA-Ligase Reaktion**

DNA-Fragmente wurden mit T4 DNA-Ligase (NEB) in einem Gesamtvolumen von 10 µl 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 wurden auf einem analytischen Agarosegel abgeschätzt.

### **2.2.11 Phenol/ Chloroform-Extraktion und Ethanolfällung**

Wässrige DNA-Lösung wurde mit 0,5 fachem Volumen TE-equilibriertem Phenol (AppliChem) und mit 0,5 fachem Volumen einer 24:1 Mischung von Chloroform und Isoamylalkohol versetzt. Nach gründlichem Vermischen wurde für 10 min bei maximaler

Geschwindigkeit in einer Eppendorf-Zentrifuge zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde abgenommen und noch einmal gleiches Volumen der Chloroform/ Isoamylalkohol-Mischung zugegeben und erneut Phasentrennung durch 5 min Zentrifugation beschleunigt. Der Überstand wurde dann durch Zugabe von 2,5 fachem Volumen kaltem Ethanol gefällt und das Sediment nach der Zentrifugation mit 70 % kaltem Ethanol gewaschen.

### **2.2.12 Herstellung elektrokompenter *E. coli*-Zellen**

1 l LB-Medium wurde mit 5 ml Übernachtskultur des gewünschten *E. coli* Stammes (meist XL1- blue) angeimpft, und bei 37°C mit 240 rpm bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,5 geschüttelt. Die Zellen wurden auf Eis abgekühlt, in sterile Röhrchen 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 50 ml Röhrchen) wurden die Zellen mit 10 % Glycerin gewaschen und schließlich in 2 ml 10 % Glycerin aufgenommen. Nach Aliquotierung (50 µl) in sterile Eppendorfröhrchen wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff schock gefroren und bei -70°C gelagert.

### **2.2.13 Elektrotransformation von *E. coli*-Zellen**

Elektrokompente Zellen wurden auf Eis aufgetaut, mit 1-5 µl 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 Transformanten erfolgte durch Analyse des Restriktionsverdaus auf einem Agarosegel.

### **2.2.15 Präparation chromosomaler DNA aus *Dictyostelium discoideum***

$1-2 \times 10^8$  Zellen einer axenisch wachsenden Kultur wurde zweimal mit kaltem H<sub>2</sub>O 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 100 µl Proteinase K-Lösung (14,7 mg/ml) zugesetzt. 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. Kleinere Mengen genomischer DNA für die Analyse von Klonen mittels PCR wurden aus 1-5 ml einer axenisch wachsenden Kultur mit dem "high pure PCR template preparation" Kit (Roche) präpariert.

### **2.2.16 Transformation und Klonierung von *Dictyostelium discoideum***

#### Elektroporation

*Dictyostelium*-Zellen wurden bis zu einer Dichte von  $2-3 \times 10^6$  Zellen/ml kultiviert, geerntet und einmal in kaltem Phosphatpuffer und zweimal in kaltem Elektroporationspuffer (50 mM Saccharose; 10 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; pH 6,1) gewaschen. Die Zellen wurden zu einer Endkonzentration von  $1 \times 10^8$  Zellen/ml in kaltem Elektroporationspuffer resuspendiert, mit 15-30 µg Plasmid DNA vermischt und in eine vorgekühlte sterile Elektroporationsküvette transferiert (Abstand zwischen den Elektroden: 4 mm). 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  $\text{MgCl}_2/\text{CaCl}_2$  Lösung (Endkonzentration je 1 mM) wurden die Zellen für weitere 15 min bei Raumtemperatur geschwenkt und anschließend in 25 ml HL5c-Medium aufgenommen. Für eine Selektion in Flüssigmedium wurden die Zellen auf eine 24-Lochzellkulturplatte verteilt. Nach einer Erholungsperiode von 24 Stunden wurde durch Zugabe des entsprechenden Antibiotikums Selektionsdruck ausgeübt (4 µg/ml Blastizidin S bzw. 10 µg/ml G418). Die Zellen wurden für 8-14 Tage bei 21°C inkubiert bis Kolonien resistenter Zellen auftraten.

Alternativ wurden Zellen, in die ein Konstrukt mit V18 Promotor vor der G418-Resistenzkassette transformiert worden war, auf Platte ausgestrichen. Hierfür wurde eine gut mit *Klebsiella aerogenes* bewachsene Platte mit 5 ml Phosphatpuffer mit 10 µg/ml G418 und Penicillin/Streptomycin abgewaschen. Mit 2,5 ml dieser Suspension wurden die Zellen 24 Stunden nach der Transformation aufgenommen und auf fünf Phosphatagarplatten mit 100 µg/ml G418 ausplattiert. Innerhalb einer Woche konnten Klone beobachtet werden, die dann für die Untersuchungen in 24-Loch-Kulturplatten überführt werden konnten.

#### Klonierung der Transformanden

Die Transformanden wurden mit einer sterilen Pipette resuspendiert und ein Tropfen der Zellsuspension auf einen Objektträger gegeben. Die Zellen wurden durch Immunfluoreszenz-Mikroskopie 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 HL5c-Medium mit Blastizidin S (4 µg/ml) bzw. G418 (10 µg/ml) und einer Penicillin/Streptomycin Lösung überführt.

### 2.2.17 Transformation von *Dictyostelium discoideum* mit pDEX-NLS-cre

Um bei Anwendung des „Cre-loxP“ Systems die Blastizidin-Resistenzkassette zu entfernen wurde das Plasmid pDEX-NLS-cre (Faix *et al.*, 2004) in die Zellen transformiert. Dabei wurde zuerst wie bei einer gewöhnlichen Transformation (siehe 2.2.16) vorgegangen. Nach der 24 stündiger Erholungsphase wurden die Zellen in einer Kulturflasche für 3 Tage mit 10 mg/ml G418 kultiviert. Nach dem Absterben der nicht transformierten Zellen wurden die Zellen in frisches Medium ohne G418 überführt, damit sie das Plasmid wieder verlieren. Nachdem Klone zu erkennen waren, wurden die Transformanden wie in 2.2.16 beschrieben vereinzelt. Nun mussten Stämme selektiert werden, die die Blastizidin-Resistenz verloren hatte. Hierfür wurden die Klone auf Blastizidin-haltige (4 µg/ml) und -freie Platten zusammen mit *Klebsiella aerogenes* gegeben und nach ca. einer Woche Klone gewählt, die nur auf der Platte ohne Antibiotikum wuchsen. Anschließend wurde die genomische Struktur des betreffenden Gens durch PCR untersucht.

### 2.2.18 Isolierung polyadenylierter RNA aus *Dictyostelium discoideum*

Polyadenylierte RNA (mRNA) wurde mit dem “QuickPrep mRNA Micro Kit” (GE Healthcare) nach Herstellerangaben präpariert. Um für die Herstellung von cDNA auch mRNA von entwicklungsregulierten Gene zu erhalten, wurden Zellen aller Entwicklungsstufen eingesetzt. Die Ausbeute betrug 7-8 µg mRNA pro  $1 \times 10^7$  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  $-70^\circ\text{C}$  gelagert. Die präzipitierte mRNA wurde durch 15 minütige Zentrifugation bei 14.000 rpm (Beckman CS-15R Zentrifuge, F2402 Rotor) sedimentiert, mit 70 % Ethanol in DEPC-behandelten Wasser gewaschen, Luft getrocknet und in DEPC-behandelten Wasser gelöst.

### 2.2.19 Southernblot-Analyse

Für jede Spur wurde 6 µg genomische DNA (präpariert wie in 2.2.15 beschrieben) mit je 40 U Enzym in einem Volumen von 250 µl für 3 Stunden verdaut. Nach erneuter Zugabe des Enzyms wurde noch mal für 3 Stunden inkubiert. Es schloss sich eine Phenol/Chloroformextraktion und eine Ethanolfällung an. Das Pellet wurde in 15 µl Auftragspuffer aufgenommen und kurz auf  $94^\circ\text{C}$  erhitzt.

Die Fragmente wurden auf einem 0,8 %igem Agarosegel für 30 min bei 25 V und weiter bei 50 V aufgetrennt. Nach Ethidiumbromid-Färbung wurde das Gel für 15 min mit 0,25 M HCl behandelt und anschließend mit Wasser kurz gewaschen. Es folgte die Denaturierung für drei mal 15 min in 0,5 M NaOH mit 1,5 M NaCl. Nach erneutem Waschen des Gels wurde dann dreimal für 15 min mit 1 M Tris/HCl, pH 7 mit 1,5 M NaCl neutralisiert.

Der Transfer der DNA erfolgte mit  $10 \times \text{SSC}$  auf eine HybondN Nylon-Membran (GE Healthcare) mittels Kapillarkräfte über Nacht. Anschließend wurde die Membran getrocknet und für 1,5 min mit UV-Licht bestrahlt.

### **2.2.20 Digoxygenin-Markierung von DNA-Sonden, Hybridisierung und Detektion**

Zur Digoxygenin-Markierung von DNA-Sonden wurde das DIG DNA-Markierungs- und Detektions-System (Boehringer Mannheim) verwendet. DIG-markierte DNA-Sonden wurden durch PCR synthetisiert. Dazu wurde eine  $20 \times$  dNTP-Mischung, supplementiert mit einem gleichen Volumen  $10 \times$  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  $37^\circ\text{C}$  für 1 h vorhybridisiert. Danach wurde die frisch denaturierte DIG-markierte Sonde zugegeben (mindestens  $50 \text{ ng}/100 \text{ cm}^2$  Filter Oberfläche, die Konzentration wurde aus der Bandenintensität auf Ethidiumbromid gefärbten Agarosegelen abgeschätzt). Die Hybridisierung wurde bei  $37^\circ\text{C}$  über Nacht durchgeführt. Die Filter wurden zweimal mit Hochsalzpuffer ( $2 \times \text{SSC}$ ;  $0,1 \%$  SDS) für 5 min bei Raumtemperatur und zweimal mit Niedrigsalzpuffer ( $0,1 \times \text{SSC}$ ;  $0,1 \%$  SDS) 15 min bei  $65^\circ\text{C}$  gewaschen. Die Filter wurden mit Maleinsäurepuffer ( $100 \text{ mM}$  Maleinsäure;  $150 \text{ mM}$  NaCl; pH 7,5) für 5 min äquilibriert und mit anti-Digoxygenin 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 zehnmünütige Waschschritte in Maleinsäurepuffer entfernt. Die Sonde wurde durch CSPD-Lumineszenz (Roche) nachgewiesen.

### **2.2.21 Behandlung von Lösungen und Geräten für die Northernblot-Analyse**

Lösungen und destilliertes Wasser wurden mit  $0,1 \%$  DEPC (AppliChem) versetzt, im Abzug über Nacht gerührt und anschließend autoklaviert. Lösungen, die nicht mit DEPC versetzt werden konnten oder nicht autoklavierbar sind, wurden mit DEPC-behandeltem Wasser angesetzt. Hitzebeständige Glasschalen wurden 4 h bei  $180^\circ\text{C}$  gebacken. Die Gelkammer wurde 1 h mit  $1 \%$   $\text{H}_2\text{O}_2/1 \text{ N}$  NaOH behandelt.

### **2.2.22 Northernblot-Analyse**

Für die Northernblot-Analyse wurde polyadenylierter RNA auf einem  $1 \%$ igem Agarosegel aufgetrennt. Nach der Elektrophorese wurden die RNA-Gele zunächst fünf Minuten in Wasser und anschließend fünf Minuten in  $20 \times \text{SSC}$ -Lösung gewaschen. Der Transfer auf die Nylonmembran erfolgte über Nacht in  $20 \times \text{SSC}$  Lösung. Die Membranen wurden nach dem Transfer in  $2 \times \text{SSC}$ -Lösung gewaschen, kurz getrocknet und im UV-Crosslinker bestrahlt.

### **2.2.23 Herstellung und Hybridisierung von radioaktiv markierten Sonden**

Die zur Markierung verwendete DNA wurde mit Restriktionsenzymen aus Plasmiden geschnitten und über ein Agarosegel aufgereinigt. Es wurden ungefähr  $25 \text{ ng}$  DNA mit

Wasser zu einem Endvolumen von 24  $\mu$ l aufgefüllt und mit 10  $\mu$ l Lösung aus zufällig angeordneten Oligonukleotiden versetzt. Nach fünfminütigem Erhitzen auf 92°C wurden zu der auf Raumtemperatur abgekühlten Reaktionsmischung nacheinander 10  $\mu$ l 5  $\times$  Primer-Puffer, 5  $\mu$ l  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-dATP (50  $\mu$ Ci) und 2  $\mu$ l Klenow-Enzym (2 U/ $\mu$ l) pipettiert und für zehn Minuten bei 37°C inkubiert. Nicht eingebaute Nukleotide wurden durch Zentrifugation über eine 1 ml Sephadex G-50-Säule in TE-Puffer abgetrennt. Die radioaktiv markierte Probe wurde vor ihrem Einsatz im Northernblot bei 100°C für zehn Minuten denaturiert und danach fünf Minuten auf Eis abgekühlt. Die Hybridisierungslösung wurde aus entsprechenden Stocklösungen ansetzen: 50 % Formamid (deionisiert), 120 mM Natriumphosphat pH 6,8 (1,2 M Stock), 2  $\times$  SSC, 1 % NLS (20 % Stock), 0,1 % SDS (20 % Stock), 4 mM EDTA (0,2 M Stock), 4  $\times$  Denhardts (100  $\times$  Stock). In dieser Lösung wurde die Membran 1 h bei 37°C prähybridisiert (ca. 10 ml Lösung pro 50 ml Röhrchen). Anschließend wurden 5 ml abgenommen und 15  $\mu$ l frisch denaturierte <sup>32</sup>P-dATP markierte Hybridisierungsprobe zusetzen und über Nacht hybridisiert. Nach dreimaligem Waschen mit 15 ml Waschlösung (50 % Formamid; 120 mM Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>; pH 6,8; 1  $\times$  SSC; 1 % NLS; 0,1 % SDS; 4 mM EDTA) wurde die Membran getrocknet und ein Röntgenfilm in einer Filmkassette mit Verstärkerfolie bei -80°C exponiert.

### 2.2.24 Oligonukleotide

DCX1	ATGACATCTACTTCAGGTAAACCTAAAATGG
DCX3- <i>SalI</i>	GATACGCGTCGACTAATGACATCTACTTCAGGTAAACCTAAAATGG
DCX5- <i>BamHI</i>	CGCGGATCCATGACATCTACTTCAGGTAAACCTAAAATGG
DCX6- <i>BamHI</i>	CTCGGATCCTTAAAATATTTCTTGTTCTTGTGGTTTTTG
DCX8- <i>PstI</i>	AAA <u>ACTGCAGT</u> TAAAATATTTCTTGTTCTTGTGGTTTTTG
DCX14-L- <i>KpnI</i>	GCGGGTACCTCCTGAACCACCTTCATCATCTTGATCGCTAACTTCTGC
DCX16- <i>SalI</i>	GATACGCGTCGACTTAAAATATTTCTTGTTCTTGTGGTTTTTG
DCX-rev	CAATTTTATCCTCTAATTCTACAAATG
UDCX1- <i>NcoI</i>	GATACGCCCATGGCAGATAGACTCTAACAAGCAGCATTGC
UDCX2- <i>BamHI</i>	CTCGGATCCCATTTTAGGTTTACCTGAAGTAGATGTC
Bsr-rev	CAGTACTCGTCCTATATACG

### 2.2.25 Vektorkonstruktionen

#### 2.2.25.1 Konstruktion von leeren GFP-Vektoren mit GGSGG-Linker

Um bei N-terminalen GFP-Fusionskonstrukten die Gefahr von Fehlfaltungen zu verringern, wurden Vektoren konstruiert, die für die AS-Sequenz GGSGG nach der GFP-Sequenz kodieren. Als Ausgangsvektor für das Konstrukt mit G418-Resistenzkassette wurde pA15PGFPV18 verwendet. Als erstes wurde ein Austausch des *AatII-SalI* Fragmentes mit pA6PGFP-SSEB vorgenommen, wodurch der Aktin-15-Promotor gegen einen

Aktin-6-Promotor ausgetauscht wurde. Das Produkt bekam die Bezeichnung pIS54 (pA6PGFPV18). Aus pIS54 wurde mit *PmlI* und *SalI* ein Stück der GFP-Sequenz entfernt und gegen das *PmlI/SalI* Fragment aus pDGFP MCS2 ersetzt, welches das gleiche GFP Stück inklusive der Sequenz für GGSGG enthielt. Das entstandene Plasmid erhielt die Bezeichnung pIS77 (pV18A6PGFP-L-SSEB). Das entsprechende Plasmid mit Blastizidin heißt pIS76 (pA6PGFP-L-SSEB). Es entstand aus pA6PGFP-SSEB durch den gleichen *PmlI/SalI* Austausch mit pDGFP MCS2.

#### **2.2.25.2 Konstruktion von Vektoren für die Expression von GFP- und FLAG-DdDCX-Fusionsproteinen in *Dictyostelium***

Für die Klonierung von DdDCX wurde codierende Sequenz mit den Primern DCX3-*SalI* und DCX6-*BamHI* durch PCR auf cDNA amplifiziert. Das PCR-Produkt wurde mit den Restriktionsenzymen *SalI* und *BamHI* geschnitten und unter Verwendung der gleichen Schnittstellen in die Vektoren pIS76 und pIS77 (Abschnitt 2.2.25.1) für GFP-Fusion und in pDisc-FLAG-SSEB für FLAG-Fusion eingebaut. Die entstanden Plasmide wurden als pIS79 (pA6PGFP-L-DCX), pIS80 (pV18A6PGFP-L-DCX) und pIS107 (pDisc-FLAG-DCX) bezeichnet.

#### **2.2.25.3 Konstruktion eines Vektors für die Expression eines MBP-DdDCX-Fusionsproteins in *E. Coli***

Für die Expression eines MBP-DdDCX-Fusionsproteins wurde die codierende Sequenz von DdDCX mit den Primern DCX5-*BamHI* und DCX8-*PstI* durch PCR amplifiziert. Das PCR-Produkt wurde mit den Restriktionsenzymen *BamHI* und *PstI* geschnitten und unter Verwendung der gleichen Schnittstellen in den Vektor pMALc2 (New England Biolabs) eingebaut. Das entstandene Plasmid erhielt die Bezeichnung pIS84 (pMal-DCX). Das Fusionsprotein wurde wie in 2.3.8 beschrieben hergestellt und für die Generierung eines polyklonalen Antikörpers verwendet.

#### **2.2.25.4 Konstruktion von Vektoren für die Expression von GST-DdDCX-Fusionsproteinen in *E. Coli***

Es wurden drei verschiedene GST-Fusionskonstrukte hergestellt:

pIS132: pGEX-DdDCX

pIS136: pGEX-DdDCX $\Delta$ PP

pIS137: pGEX-DdDCX $\Delta$ C

pIS132 enthält die gesamte codierende Sequenz von DdDCX. Hierfür wurde eine PCR auf pIS79 (2.2.25.2) mit den Primern DCX5-*BamHI* und DCX16-*SalI* durchgeführt. Das Produkt wurde in die *BamHI/SalI* Schnittstellen von pGEX-4T-2 eingesetzt.

Zur Deletion der Prolin-reichen Region wurde eine PCR-Amplifikation mit den Primern DCX3-*SalI* und DCX14-L-*KpnI* durchgeführt. Das PCR-Produkt wurde in den mit *SalI/KpnI* geöffneten Vektor pIS132 eingebaut. Das entstandene Konstrukt pIS136 codiert für ein GST-DdDCX-Fusionsprotein, in dem die Aminosäuren 121 bis 143 von DdDCX gegen einen GGSGG-Linker ausgetauscht sind.

Um ein Fusionsprotein von GST mit dem N-terminalen Bereich von DdDCX zu erzeugen, wurde pIS132 mit den Enzymen *KpnI* und *BamHI* geschnitten. Nach dem Entfernen der

Überhänge mit T4-DNA-Polymerase wurde das Plasmid durch Ligation wieder geschlossen. Das entstandene Konstrukt codiert für ein Fusionsprotein von GST mit den Aminosäuren 1 bis 143 von DdDCX.

#### **2.2.25.5 Konstruktion des *dcx*-Gendisruptionskonstruktes**

Etwa 1000 bp des 5'-Bereichs von *dcx* wurden mit den Primern UDCX1-*NcoI* und UDCX2-*BamHI* durch PCR auf genomischer DNA amplifiziert. Das PCR-Produkt wurde mit den Restriktionsenzymen *NcoI* und *BamHI* geschnitten und unter Verwendung der gleichen Schnittstellen in den Vektor pIS84 (2.2.25.3) eingebaut. Das entstandene Produkt pIS95 (pMal U-DCX) wurde mit den Enzymen *BamHI* und *EcoRI* geschnitten und damit die ersten 231 bp der codierenden Sequenz von DdDCX entfernt. Die Überhänge des geöffneten Vektors wurden mit T4-DNA-Polymerase (2.2.9) abgedaut und das ebenfalls überhangslose *NcoI/NdeI* Fragment aus pLPBLP, der die Blastizidin-Resistenzkassette enthielt, eingesetzt. Für die Transformation in *Dictyostelium* wurde nur das *NcoI/BamHI*-Fragment aus dem entstanden Plasmid pIS105 (pMal U-Bsr-DCX) verwendet, das nach der Restriktion über ein Agarosegel aufgereinigt wurde.

## **2.3 Biochemische Methoden**

### **2.3.1 Gewinnung von Gesamtzellextrakten und cytosolischen Extrakten**

Axenisch gewachsene *Dictyostelium discoideum* Zellen wurden bei einer Zelldichte von  $3\text{-}5 \times 10^6$  Zellen/ml geerntet und dreimal in Phosphatpuffer gewaschen. Dieser und alle folgenden Schritte wurden bei 4°C durchgeführt. Beim letzten Waschschrift wurden 2 µM Cytochalasin A (Sigma-Aldrich) zugegeben. Lysiert wurden die Zellen mit achtfachem Volumen Lysepuffer, wie für die Präparation von Centrosomen (siehe 2.3.13) beschrieben. Um kernfreien Überstand zu gewinnen, wurde das Lysat für 10 min bei maximaler Geschwindigkeit in einer gekühlten Eppendorfzentrifuge zentrifugiert. Für cytosolische Extrakte für SDS-PAGE wurde der Überstand mit  $0,5 \times$  Harnstoff-Probenpuffer versetzt und für 3 min auf 70°C erhitzt.

Für Gesamtzellextrakte wurden Zellen abzentrifugiert und in  $0,5 \times$  Harnstoff-Probenpuffer aufgenommen, so dass ca.  $5 \times 10^5$  Zellen auf eine Spur aufgetragen werden konnten.

### **2.3.2 Methanol/Chloroform-Proteinpräzipitation**

Diese Methode eignet sich für verdünnte Proteinlösungen, die Detergens, Phospholipide oder hohe Salzkonzentrationen enthalten und wurde hauptsächlich für die Fällung der nicht-centrosomalen Fraktionen verwendet (Wessel und Flügge, 1984). 150 µl Proteinlösung wurde mit 600 µl Methanol und 150 µl Chloroform vermischt, dann wurden 450 µl H<sub>2</sub>O zugesetzt und kräftig gemischt. Die obere flüssige Phase wurde nach Zentrifugation in einer Eppendorfzentrifuge entfernt. Das Chloroform-Kissen mit dem präzipitierten Protein wurde mit 3-fachem Volumen Methanol vermischt und zentrifugiert (maximale Geschwindigkeit, 2 min). Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen, das Proteinpellet getrocknet und in  $0,5 \times$  Harnstoff-Probenpuffer aufgenommen.

### 2.3.3 Bestimmung der Proteinkonzentration

Zur annähernden Bestimmung der Proteinkonzentration wurde die OD<sub>280</sub> einer Proteinlösung gemessen, wobei 0,7 mg Protein pro 1 OD<sub>280</sub> zugrunde gelegt wurde (dieser Wert ist für Immunglobuline am genauesten).

Die Proteinmenge einer Centrosomenpräparation wurde mit Hilfe des Amidoschwarztests bestimmt. Hierfür wurde die Proben in Harnstoff-Probenpuffer aufgenommen und mit 300 µl Färbelösung (2,6 mg/ml Amidoschwarz in Essigsäure/Methanol 1:10) versetzt. Nach 5 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde das Präzipitat für 5 min bei maximaler Geschwindigkeit in einer Eppendorffzentrifuge sedimentiert. Das Pellet wurde zweimal mit Waschlösung (Essigsäure/Methanol 1:10) gewaschen, jeweils gefolgt von 5 minütiger Zentrifugation, und anschließend in 700 µl 0,1 M Natronlauge aufgenommen. Die Färbung der Lösung wurde mittels Photometer bei 615 nm gemessen und mit einer BSA Eichkurve bestehend aus 4, 8 und 12 µg BSA verglichen.

### 2.3.4 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Proteine wurden auf diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamid Gelen aufgetrennt (Bollag *et al.*, 1996). Um Partikel zu entfernen, wurden die Stammlösungen durch ein 0,45 µm 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 5 × Laemmli-Probenpuffer versetzt und 2-5 min bei 70 bzw. 94°C denaturiert.

**Tabelle 1:** Zusammensetzung der SDS-Polyacrylamidgele mit verschiedenen Acrylamid-Konzentrationen

Stammlösung	3 % Sammelgel	12,5 % Trenngel	17,5 % Trenngel
<b>30 % Acrylamid</b>	0,68 ml	3,70 ml	5,14 ml
<b>1 % Bis-Acrylamid</b>	0,50 ml	0,93 ml	0,64 ml
<b>Trenngelpuffer</b> (2 M Tris/HCl, pH 8,7; 0,4 % SDS)	-	2,5 ml	2,5 ml
<b>Sammelgelpuffer</b> (0,25 M Tris/HCl, pH 6,8; 0,4 % SDS)	1,0 ml	-	-
<b>H<sub>2</sub>O</b>	1,78 ml	1,80 ml	0,72 ml
<b>10 % APS</b>	35 µl	45 µl	45 µl
<b>TEMED</b>	7 µl	9 µl	9 µl

Als Standard wurde ein Proteingemisch definierter Molekülmasse verwendet:

LMW (Sigma-Aldrich): 92,5; 67; 45; 30; 20; 14 kDa

HMW (Sigma-Aldrich): 205; 116; 97; 66; 45; 29 kDa

### 2.3.5 Coomassie-Blau-Färbung von SDS-Gelen

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.

### 2.3.6 Silberfärbung von SDS-Gelen

Die Silberfärbung von ein- und zweidimensionalen SDS-Gelen wurden mit dem „Silver Staining Kit“ von GE Healthcare nach den Anweisungen des Herstellers durchgeführt.

### 2.3.7 Westernblot-Analyse

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  $\epsilon$ -Amino-n-Capron-Säure).

Der Transfer wurde bei  $1 \text{ mA/cm}^2$  für 1 h durchgeführt, die Membran reversibel mit 0,25 % Ponceau S (Sigma-Aldrich) in 40 % Methanol/15 % Essigsäure gefärbt und der Größen standard gekennzeichnet. Die Membran wurde mit 5 % Magermilchpulver in TBST abgesättigt. Die Inkubation mit dem primären Antikörper verdünnt in TBST/1,5 % Magermilch erfolgte für 1 h bei Raumtemperatur. Danach wurde die Membran in TBST ( $3 \times 5 \text{ min}$ ) gewaschen und mit dem sekundären Antikörper (1:10.000 Verdünnung in TBST von anti-Kaninchen-, anti-Maus- oder anti-Ratte-Antikörper, Meerrettich-Peroxidase-Konjugat) für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Membran wurde  $3 \times 5 \text{ min}$  mit TBST gewaschen, kurz in TBS geschwenkt und nach den Herstellerangaben mit Chemikalien des ECL-Kits (AppliChem) inkubiert. Im Dunklen wurde ein Röntgenfilm (Kodak X-Omat AR Film) für unterschiedliche Dauer auf die in Frischhaltefolie eingewickelte Membran aufgelegt und mit einer Entwicklermaschine (AGFA) entwickelt.

### 2.3.8 Aufreinigung von bakteriell exprimierten MBP-Fusionsproteinen

Diese Aufreinigung wurde für das Fusionsprotein aus dem Maltose-bindenden-Protein und DdDCX durchgeführt. 0,5 l der entsprechenden *E.coli* Kultur wurde in LB/Amp-Medium, supplementiert mit 10 mM Glukose, bei  $37^\circ\text{C}$  bis zu einer  $\text{OD}_{600}$  von 1,0 kultiviert. Nach Induktion mit 0,3 mM IPTG wurden die Zellen für weitere 4-12 Stunden bei  $21^\circ\text{C}$  geschüttelt. Die Zellen wurden abzentrifugiert (5000 rpm, 10 min, Sorvall-Rotor GSA,  $4^\circ\text{C}$ ), in einem kleinen Volumen TE-Puffer resuspendiert und anschließend bei  $-20^\circ\text{C}$  eingefroren. Nach Auftauen wurden die Zellen durch sonifizieren lysiert und dann für 20 min bei 20.000 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 Lysepuffer (150 mM KCl; 2 mM  $\text{MgCl}_2$ ; 50 mM HEPES/K, pH 7,4) gewaschen. Das MBP-Fusionsprotein wurde mit Säulen- bzw. Lysepuffer,

beide mit 10 mM Maltose versetzt, eluiert. Die Reinheit der Präparation wurde durch SDS-PAGE untersucht.

### 2.3.9 Herstellung von polyklonalen Antisera aus Kaninchen

Die durch Amylose-Affinitätschromatographie gereinigten MBP-Fusionsprotein MBP-DdDCX 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) unter Benutzung eines Standardprotokolls von fünf Immunisierungen über einen Zeitraum von 60 Tagen durchgeführt.

Zur Affinitätsreinigung der Antisera 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 % NaN<sub>3</sub> zugesetzt.

### 2.3.10 Aufreinigung von bakteriell exprimierten GST-Fusionsproteinen

Für die bakterielle Expression von GST-Fusionsproteinen wurde 0,5 l der entsprechenden *E. coli*-Kultur in LB/Amp-Medium, supplementiert mit 10 mM Glukose, bei 37°C bis zu einer OD<sub>600</sub> von 1,0 kultiviert. Nach Induktion mit 0,3 mM IPTG wurden die Zellen für weitere 4-12 h bei 21°C geschüttelt. Die Zellen wurden abzentrifugiert (5000 rpm, 10 min, Sorvall-Rotor GSA, 4°C), in 10 ml 1 × PBS resuspendiert und anschließend bei -20°C eingefroren. Nach Auftauen wurden die Zellen durch Sonifizieren lysiert, 1 mM DTT und Proteinaseinhibitorcocktail zugesetzt und dann für 20 min bei 20.000 rpm (Sorvall SS34-Rotor) zentrifugiert. Der Überstand wurde auf die vorher mit PBS gewaschene Glutathion-Agarose-Säule gegeben. Die Durchlaufgeschwindigkeit wurde auf 1 Tropfen pro 10 sec. eingestellt. Anschließend wurde dreimal mit 1 × PBS mit 1 mM DTT gewaschen. Für die Elution wurden 150 mg Glutathion abgewogen und unmittelbar vor der Verwendung in 20 ml 1 × PBS mit 1 mM DTT und Proteinaseinhibitorcocktail gelöst und mit KOH auf einen pH von 7,4 eingestellt. Es wurden 8 Fraktionen von je 1 ml gesammelt und mittels SDS-PAGE getestet.

### 2.3.11 Aktin-Sedimentationsexperiment

G-Aktin aus Kaninchenmuskel und aufgereinigtes GST-Fusionsprotein wurde zunächst 10 min bei 50.000 g zentrifugiert, um unlösliche Bestandteile bzw. Protein-Aggregate abzutrennen. 5 µM G-Aktin wurden dann mit gleicher Menge GST-Fusionsprotein unter polymerisierenden Pufferbedingungen (10 mM Mops, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM KCl, pH 7) eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Als Kontrolle wurde jeweils zusätzlich eine Mischung ohne G-Aktin bzw. GST-Fusionsprotein angesetzt. Die Proben wurden dann in einer Beckman Tischzentrifuge bei 50.000 g in einem TLA100.3 Rotor bzw. in einer Eppendorfzentrifuge bei 10.000 g für 30 min bei 4°C zentrifugiert. Anschließend wurden

Pellet und Überstand getrennt, in äquivalenten Mengen Laemmli-Probenpuffer aufgenommen und mittels SDS-PAGE und nachfolgender Coomassie-Blau-Färbung analysiert.

### 2.3.12 GST-Pulldown mit *Dictyostelium*-Zellextrakt

4 ml einer üN-Kultur von pGEX und entsprechendem Fusionskonstrukt wurden auf 100 ml mit LB/Amp-Medium, supplementiert mit 10 mM Glukose, verdünnt und bei 37°C bis zu einer OD<sub>600</sub> von 1,0 kultiviert. Nach Induktion mit 0,3 mM IPTG wurden die Zellen für weitere 6 Stunden bei 21°C geschüttelt. Die Bakterien wurden für 5 min bei 5000 g abzentrifugiert, in 2 ml Phosphatpuffer resuspendiert, auf drei 1,5 ml Eppendorfgefäße aufgeteilt und bei -20°C eingefroren. Bei Bedarf wurde jeweils eine Portion Bakterien-suspension aufgetaut und die Zellen durch Sonifizierung lysiert. Nach Zugabe von 70 µl 10 × BPS und 7 µl 1 M DTT wurden unlösliche Bestandteile durch 30 min Zentrifugation bei maximaler Geschwindigkeit in einer gekühlten Eppendorfzentrifuge entfernt. Der Überstand wurde mit 20 µl gewaschenen Glutathion-Sepharose-Beads (Glutathione Sepharose™ 4 fast flow, GE Healthcare, Freiburg) gemischt und für 30 min auf einem Überkoprotator bei 6°C inkubiert. Anschließend wurde dreimal mit PBS mit 1 mM DTT und 2 mM MgCl<sub>2</sub> gewaschen.

Für den *Dictyostelium*-Zellextrakt wurden Kulturen mit 3-4 × 10<sup>6</sup> Zellen/ml verwendet und die Zellen nach 2 × Waschen mit Phosphatpuffer mit der achtfachen Menge an Lysepuffer (1 × Fish-Puffer mit 1 × PC, 2 mM BA, 1 mM DTT und 2 µM Cytochalasin A) und Vortexen lysiert. Unlösliche Bestandteile wurden durch 10 min Zentrifugation bei maximaler Geschwindigkeit in einer gekühlten Eppendorfzentrifuge entfernt.

Je 700 µl Lysat wurde mit den Beads, die das GST-Fusionsprotein gebunden hatten, gemischt und für 1 h auf einem Überkoprotator bei 6°C inkubiert. Die Beads wurden viermal für je 5 min mit kalter Waschlösung (1 × Fish-Puffer) gewaschen und anschließend mit 60 µl 0,5 × Harnstoff-Probenpuffer für 1 min auf 70°C erhitzt. Die Proben wurden mit Hilfe einer Westernblot-Analyse untersucht.

### 2.3.13 Centrosomenpräparation für die Verwendung in der Massenspektrometrie (Schulz *et al.*, 2006)

*Dictyostelium discoideum* Wildtypzellen wurden in 2 l AX-Medium bis zu einer Dichte von ca. 4 × 10<sup>6</sup> Zellen/ml kultiviert. Alle folgenden Schritte wurden, sofern nicht anderes angeben, auf Eis oder in auf 4°C gekühlten Zentrifugen durchgeführt. Die Zellen wurden durch Zentrifugation mit 500 g geerntet und zweimal mit je 100 ml Phosphatpuffer gewaschen. Ein dritter Waschschritt wurde mit 50 ml 2 µM Cytochalasin A in Phosphatpuffer durchgeführt. Dieses Zellpellet wurde in 50 ml Lysepuffer aufgenommen und die Zellen durch einminütiges vortexen und Filtration durch einen 5 µm Polycarbonat Filter (Nuclepore, Costar GmbH) lysiert. Zur Aufreinigung der Kerne wurde dieses Lysat auf sechs Beckmann SW40 Röhrchen verteilt, die je ein Kissen aus 2 ml 55%iger Saccharoselösung enthielten und die Kerne durch Zentrifugation (80.000 g, 1 h) sedimentiert. Um die Centrosomen von den Kernen zu lösen, folgte eine Behandlung mit 40 ml Pyrophosphatpuffer unterstützt durch die Ausübung von Scherkräften mittels eines Vortexers für eine Minute. Anschließend wurden nicht lysierte Bestandteile und Medienreste durch Zentrifugation bei 2500 g (10 min) entfernt. Der

Centrosomen-haltige Überstand wurde für 5 min mit 0,3 mg/ml Heparin auf Eis inkubiert und anschließend durch einen 5 µm Polycarbonat Filter filtriert. Die Suspension wurde dann vorsichtig auf Stufengradienten, jeweils bestehend aus 0,5 ml 80 % und 1 ml 50 % Saccharoselösung, in vier Beckmann SW40 Röhrchen geladen. Nach einer Zentrifugation bei 40.000 g für 1 h wurden die Gradienten mit einer Glaskapillare und einer Peristaltik Pumpe vom unten heraus mit einer Geschwindigkeit von etwa 0,4 ml/min fraktioniert und jeweils dreimal 1 ml aufgefangen. Die erste Fraktion enthielt die 80 %-50 % Grenze und die Centrosomen, die sich größtenteils dort ansammeln. Die zweite und dritte Fraktion wurde als NC1 bzw. NC2 (für: nicht centrosomal) bezeichnet und als Vergleichsprobe verwendet. Hierfür wurden die Proteine mittels Methanol/Chloroform (siehe 2.3.2) gefällt. Die Centrosomen-Fractionen der vier Gradienten wurden vereinigt, mit dem gleichen Volumen Gradientenpuffer versetzt und zweimal mit einer Spritze durch eine 27er Nadel gedrückt. Diese Suspension wurde dann auf den zweiten Stufengradienten aufgetragen, der aus je 1 ml 80, 55 und 50 % Saccharoselösung in vier Beckmann SW50.1 Röhrchen aufgebaut wurde. Nach der Zentrifugation (40.000 g, 1 h) wurde wieder mit einer Kapillare von unter her fraktioniert, die ersten 500 µl verworfen, dann 1 ml, der die aufgereinigten Centrosomen enthält, gesammelt und erneut von den vier Röhrchen vereinigt. Wieder wurde mit dem gleichen Volumen Gradientenpuffer verdünnt und die Centrosomen anschließend mit 12,5 µg/ml DNase (RNase-frei) für 30 min bei RT behandelt. Zur Entfernung der DNase wurden die Centrosomen dann durch ein Kissen aus 2 ml 55 % Saccharoselösung sedimentiert. Hierfür wurden erneut vier Beckmann SW50.1 Röhrchen verwendet und 1 h mit 40.000 g zentrifugiert. Die sedimentierten Centrosomen wurde in Gradientenpuffer aufgenommen und dann entweder direkt für Immunfluoreszenz-Mikroskopie verwendet oder portionsweise in 1,5 ml Reaktionsgefäßen sedimentiert (15 min, 17.500 g) und für weitere Verwendung bei -80°C aufbewahrt.

### **2.3.14 Verkürzte Centrosomenpräparation aus GFP exprimierenden Stämmen**

$1-2 \times 10^9$  Zellen eines Stammes, der ein GFP-Fusionsprotein exprimiert, wurden wie in Abschnitt 2.3.13 beschrieben mit entsprechend geringerer Menge an Lösungen geerntet, gewaschen und lysiert. Die Kerne wurden dann bei 3000 g für 10 min sedimentiert. Es folgte weiter die Pyrophosphatbehandlung und eine Aufreinigung der Centrosomen mit Hilfe eines 80 % - 50 % Saccharose-Stufengradienten wie oben beschrieben. Allerdings durfte den Puffern kein DTT zugesetzt werden, da sonst die GFP-Fluoreszenz zerstört worden wäre. Die erhaltene centrosomenhaltige Fraktion kann direkt für Immunfluoreszenz-Mikroskopie verwendet werden (siehe 2.4.4) und nach einer Gegenfärbung mit einem centrosomalen Marker auf GFP-Fluoreszenz untersucht werden.

### **2.3.15 2D-Gelelektrophorese**

Das Pellet von 2 Gradienten einer Centrosomenpräparation (ca. 60-70 µg) wurde in 200 µl Quellungspuffer (7 M Harnstoff, 2 M Thioharnstoff, 2 % Chaps, 2 % IPG-Puffer, 50 mM DTT, Bromphenolblau) aufgenommen und für 1 Stunde bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Unlösliche Bestandteile wurden durch 10 min Zentrifugation bei maximaler Geschwindigkeit in einer Eppendorffzentrifuge entfernt. Zur Rehydratisierung wurden die 11 cm langen IPG-

Streifen (Immobiline Dry Strips pH 3-10 NL, GE Healthcare) über Nacht in dem Quellungspuffer mit der gelösten Probe inkubiert. Dann wurden die Streifen kurz mit Wasser abgespült und in die Multiphor II Apparatur (GE Healthcare) überführt. An beiden Enden der Streifen wurden mit Wasser befeuchtete Filterpapiere aufgelegt, um Salze aufzunehmen, die zu den Elektroden wandern und dort ein Durchbrennen der Streifen verursachen würden. Neben den Filterpapieren wurden die Elektroden angebracht. Die Streifen wurden mit Öl überschichtet, um ein Austrocknen der Streifen und Reaktionen im basischen Bereich des Streifens durch atmosphärisches CO<sub>2</sub> während der Fokussierung zu vermeiden. Die IEF wurde mit folgendem Spannungsgradienten durchgeführt: 30 min 150 V, 60 min 300 V, 60 min 1500 V, 4,5 h 3000 V, insgesamt etwa 15.000 Vh.

Zur Denaturierung der Proteine wurden die IPG-Streifen vor der zweiten Trenndimension in SDS-haltiger Lösung äquilibriert. In zwei aufeinander folgenden Schritten wurde zunächst für 15 min mit Äquilibrierlösung (6 M Harnstoff, 2 % SDS, 50 mM Tris-Base, 30 % Glycerin) mit 65 mM DTT, dann 15 min mit Äquilibrierlösung unter Zugabe von 280 mM Iodacetamid, inkubiert.

Es folgte als 2. Dimension eine Auftrennung auf einem SDS-Gel. Hierfür wurden fertig erworbene Gele verwendet, die auf einer Kunststofffolie angebracht waren (ExcelGel™ 2-D, homogeneous 12,5 %, GE Healthcare) und eine horizontale Gelapparatur benutzt (Multiphor II Apparatur, GE Healthcare).

### 2.3.16 Proteinauftrennung für Massenspektrometrie

Die Proteinauftrennung für Massenspektrometrie wurde von Dr. Y. Reinders und Dr. A. Sickmann am Rudolph Virchow Institut für Experimentelle Biomedizin in Würzburg durchgeführt. Es wurden konventionelle 2D-Gele und BAC16-Gele verwendet und mit einer Silberfärbung gefärbt oder die Proben vorher mit Cy-Farbstoffen markiert. Zusätzlich wurde die iTRAQ -Methode angewendet. Alle Methoden sind in Reinders *et al.* beschrieben (2005).

### 2.3.17 Massenspektrometrie

Die Massenspektrometrie wurde ebenfalls von Dr. Yvonne Reinders und Dr. Albert Sickmann durchgeführt. Es wurden MALDI-ToF, ESI-ToF und ESI-Ionenfallen verwendet. Eine Beschreibung der Techniken findet sich bei Reinders *et al.* (2005).

## 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 600 µl einer Bakterienkultur mit der gleichen Menge Einfriermedium vermischt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C gelagert.

#### 2.4.2 Kultivierung und Konservierung von *Dictyostelium discoideum*

*Dictyostelium*-Zellen wurden in Schüttelkultur bei 150 rpm und 21°C in AX- oder HL5c-Medium kultiviert. Bei Mutanten wurde Blastizidin S und/oder G418 zugesetzt. Die Generationszeit betrug unter diesen Bedingungen etwa neun Stunden. Alternativ wurden adherierte Zellen für längere Aufbewahrung in Zellkulturflaschen kultiviert. Das Medium wurde zweimal pro Woche gewechselt.

Zur dauerhaften Lagerung wurden axenisch wachsende Zellen zweimal mit Phosphatpuffer gewaschen, auf eine Dichte von  $2-3 \times 10^8$  Zellen/ml in Phosphatpuffer eingestellt und je 500 µl auf Phosphatagarplatten ausgestrichen. Die innerhalb von 2-3 Tagen gebildeten Sporen wurden mit sterilen Phosphatpuffer (ca. 2 ml pro Platte) abgewaschen, in 1 ml Aliquots (Nunc 2,2 ml Röhrchen) in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C gelagert. Zur Inoculation einer Kultur wurden die Sporen bei Raumtemperatur aufgetaut und etwa 200 µl in Zellkulturflaschen mit HL5c-Medium inkubiert.

Direktes Einfrieren von Zellen wurde für schnelles Sicherstellen eines wertvollen Stammes verwendet. Hierfür wurden 900 µl einer gut gewachsenen Kultur mit 100 µl DMSO und 100 µl Pferdeserum gemischt, 2 h auf -20°C und 5 h auf -80°C abgekühlt, und anschließend in flüssigem Stickstoff gelagert. Das Auftauen erfolgte möglichst schnell und unter Verdünnung mit HL5c-Medium. Die Zellen wurden abzentrifugiert und in frischem HL5c-Medium aufgenommen.

#### 2.4.3 Entwicklungsreihen für Westernblot- und Northernblot-Analyse

Axenisch gewachsene *Dictyostelium*-Zellen der zu untersuchenden Stämme wurden bis zu einer Zelldichte von  $4 \times 10^6$  Zellen/ml kultiviert und nach zweimaligem Waschen mit Phosphatpuffer auf eine Dichte von  $5 \times 10^7$  Zellen/ml Phosphatpuffer eingestellt. Je 1 ml dieser Zellsuspension wurde auf einer Phosphatagarplatte (Durchmesser 10 cm) verteilt und die Platten nach dem Trocknen bei 21°C inkubiert. In regelmäßigen Abständen von je drei Stunden wurde je eine Platte geerntet. Die Zellen, bzw. Zellaggregate wurden mit einem Spatel von den Platten geschabt und entweder in 2,5 ml  $0,5 \times$  Harnstoff-Probenpuffer aufgekocht (Gesamtzellextrakt für Westernblot-Analyse) oder für die Gewinnung von RNA mit dem „Quick Prep Micro mRNA Purification“-Kit (GE Healthcare) verwendet.

#### 2.4.4 Indirekte Immunfluoreszenz-Mikroskopie von *Dictyostelium discoideum* und isolierten Centrosomen

Logarithmisch wachsende Zellen einer *Dictyostelium*-Kultur wurden auf  $1 \times 10^6$  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 mit PBS verdünnt, durch Zentrifugation (2500 g, 10 min) auf unbehandelte runde Deckgläschen sedimentiert 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 $-20^{\circ}\text{C}$ kaltem Aceton
Methanol-Fixierung:	100 % Methanol ( $-20^{\circ}\text{C}$ ), 5 min Fixierung
Glutaraldehyd-Fixierung:	0,5 % (v/v) Glutaraldehyd, 0,5 % Triton X-100 in 50 % PHEM-Puffer, 5 min Fixierung, dann $2 \times 5$ min waschen in Phosphatpuffer und $1 \times 10$ 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 %  $\text{NaN}_3$ , 1 h) bei Raumtemperatur inkubiert. Nicht gebundene Antikörper wurden durch drei fünfminütige Waschschriffe 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 Waschschriff DAPI (1 mg/ml) zugegeben bzw. 20 min mit TOPRO3 (1:1000 Verdünnung; Molecular Probes) inkubiert. Die Präparate wurden auf einem Objektträger mit 5  $\mu\text{l}$  „Moviol“ eingebettet. Alternativ wurde als Einbettmittel das „Pro Long Antifade Kit“ (Molecular Probes) verwendet. Die Fluoreszenzpräparate wurden mit DAPI-, Rhodamin- und Fluorescein-Filtern betrachtet, wobei die Mikroskopie und Bildaufzeichnung an einem Zeiss Axiovert 200M Mikroskop mit einer „AxioCam Mrm“ Kamera und der Axiovision-Software aufgezeichnet wurden. Lebendzellbeobachtungen wurden in Plastikpetrischälchen mit Deckgläschenboden (World Precision Instruments, Sarasota, U.S.A.) in HL5c-Medium oder Phosphatpuffer durchgeführt.

#### 2.4.5 Indirekte Immunfluoreszenz-Mikroskopie von Zellströmen

Für die Immunfluoreszenz von Zellströmen wurden logarithmisch wachsende Zellen einer *Dictyostelium*-Kultur mit Phosphatpuffer gewaschen und in einer Dichte von  $2 \times 10^5$  Zellen/ml Phosphatpuffer aufgenommen. Bei den Experimenten mit Nocodazol (AppliChem) wurde 2 mM der Chemikalie zugesetzt. Je 1 ml dieser Suspension wurde in mit Deckgläschen bestückten Löchern einer 24-Loch-Kulturplatte gegeben und bei  $21^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Sobald die Zellströme zu erkennen waren (ca. nach 10-12 h), wurde wie oben beschrieben mit Glutaraldehyd fixiert und eine Immunfärbung durchgeführt. Die Aufnahme dieser Präparate erfolgte an einem Axiovert 200M/510Meta Konfokal-Mikroskop mit einem 63x/1.3 bzw. 40x/1.3 Objektiv. Es wurden Bildstapel von bis zu 50 Bildern aufgenommen, um die gesamte Höhe der Zellaggregate zu erfassen.

#### 2.4.6 Chemotaxisexperimente

Zellen des Wildtypstammes AX2 und des zu untersuchenden Stammes wurden in HL5c-Medium bis zu einer Dichte von  $5 \times 10^6$  kultiviert. Nach zweimaligem waschen mit Phosphatpuffer wurden die Zellen in einer Dicht von  $1 \times 10^7$  Zellen/ml Phosphatpuffer aufgenommen und für 5,5 h bei  $21^{\circ}\text{C}$  gehungert. Ca. 3  $\mu\text{l}$  dieses Suspension von in 1 ml Phosphatpuffer in FluoroDish-Schälchen (WPI) gemischt. Nach 30 min wurde die Puffermenge reduziert und der Versuch gestartet. Hierfür wurde eine Kapillare mit einer 1 mM cAMP-Lösung befüllt

und mit Hilfe einer Mikroinjektionsanlage (Eppendorf InjektMan NI2) in die Nähe der Zellen gebracht. Für die Beobachtung wurde ein Zeiss Axiovert 200M Mikroskop mit einer "AxioCam Mrm" Kamera verwendet und mit dem Programm Axiovision 4.3 alle 10 sec ein Bild aufgenommen.

#### 2.4.7 Phototaxisexperimente

Für die Untersuchung der Wanderungsfähigkeit von Slugs wurden *Dictyostelium*-Zellen zuerst auf mit *K. aerogenes* bewachsenen SM-Agarplatten kultiviert. Zellen aus den Wachstumsrändern wurden dann mit einer Impföse auf eine Phosphatagarplatte transferiert und auf einem etwa 1 cm<sup>2</sup> großen Bereich verteilt. Die Platten wurden unter einseitigem Lichteinfall (lichtundurchlässiger Zylinder mit einem Schlitz) für 2-3 Tage bei 21°C inkubiert. Auf die Platte wurde eine Nitrocellulose-Membran aufgelegt und die Zellen durch einfrieren bei -20°C lysiert. Nach mehrfachem Waschen der Membran mit TBST wurde eine Färbung wie bei 2.3.7 für die Westernblot-Analyse beschrieben durchgeführt. Als primärer Antikörper wurde ein monoklonale Antikörper gegen Aktin verwendet. Als sekundärer Antikörper wurde ein an alkalische Phosphatase-gekoppelter Antikörper eingesetzt und anschließend mit NBT/BCIP (AppliChem) gefärbt.

#### 2.4.8 Langzeitbeobachtung der Entwicklung von *Dictyostelium*

Für die Aufnahme der Entwicklung über 24 h wurden Zellen aus Kulturen mit einer Dichte von 2-3 × 10<sup>6</sup> Zellen/ml verwendet und einmal mit Phosphatpuffer gewaschen. Für die hohe Zelldichte wurden 5 × 10<sup>5</sup> Zellen pro cm<sup>2</sup> und für die geringe Zelldichte 1 × 10<sup>5</sup> Zellen pro cm<sup>2</sup> auf Phosphatagarplatten ausgestrichen. Nach dem Trocknen der Platten wurden Agarblöcke aus den Platten ausgeschnitten und mit einem feinen Spalt nebeneinander auf einer leeren Petrischale positioniert. Das Präparat wurde durch eine Kunststoffabdeckung vor dem Austrocknen bewahrt. Die Beobachtung der Entwicklung erfolgte unter einem Zeiss Stemi 2000-CS mit Durchlichtaufsatz bei 10 bis 12,5 facher Vergrößerung. Als Beleuchtung diente eine KL1500 LCD Kaltlichtquelle (Zeiss). Es wurden alle 10 min Bilder mit der SimplePCI-Software 5.2 (Compix Inc., PA/USA) aufgezeichnet.

#### 2.4.9 Konfokale Mikroskopie

Konfokale Mikroskopie an Standard-Immunfluoreszenzpräparaten oder Lebendbeobachtungen an Einzelzellen wurden an einem Zeiss Axiovert 200M/510Meta Laser Scanning System, mit einem 63x/1.4 Objektiv durchgeführt. Lebende Zellen wurden bei sehr niedriger Laserintensität, zum Teil unter Agar-Auflage (Fukui, 1987), betrachtet. Die Bilder wurden mit einer Bildrate von etwa 2 Bildern pro Sekunde und einer Auflösung von meist 512 × 256 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 Suche nach bekannten centrosomalen Proteinen im Genom von *Dictyostelium discoideum*

Bis vor kurzem standen für die Erforschung von *Dictyostelium* nur Sequenzdaten vom Tsukuba cDNA-Projekt zur Verfügung. Eine Eigenschaft von solchen cDNA-Datenbanken ist aber, dass die cDNA von stark exprimierten Proteinen überrepräsentiert sind. Für schwach exprimierte Proteine, wozu nach bisherigen Erkenntnissen die meisten centrosomalen Proteine zählen, findet sich häufig kein Klon in einer solchen Bank. Eine klare Verbesserung brachte daher die Fertigstellung des Genomprojektes (Eichinger *et al.*, 2005), durch das nun die gesamte genomische Sequenz von *Dictyostelium discoideum* verfügbar wurde. Dies brachte die Möglichkeit mit sich, das Genom nach von anderen Spezies bekannten centrosomalen Proteinen zu durchsuchen. Als Grundlage hierfür wurde die Veröffentlichung über die massenspektrometrische Analyse des menschlichen Centrosoms im Labor von Prof. Dr. E. Nigg gewählt (Andersen *et al.*, 2003). Für alle Proteine, die dort als centrosomal oder als Kandidat für neue centrosomale Proteine bezeichnet wurden, wurde mittels BLASTP in der Dictybase-Genomdatenbank ([www.dictybase.org](http://www.dictybase.org)) nach einem homologen Protein in *Dictyostelium* gesucht. Darüber hinaus wurde genauso verfahren mit weiteren centrosomalen Proteinen, die in der menschlichen Präparation nicht nachgewiesen werden konnten, aber beim Menschen oder in anderen Organismen als centrosomal gelten. Konnte in *Dictyostelium* ein Protein mit mindestens 20 % Identität identifiziert werden, wurde dieses wiederum als Suchobjekt in einer BLASTP-Suche mit NCBI-Blast ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) eingesetzt. Wurde hierbei das anfängliche centrosomale Protein als bester Treffer gefunden, oder ein Homolog aus einem anderen Organismus, so wurde das entsprechende Protein in *Dictyostelium* als das homologe Protein der Amöbe eingeordnet.

Von Andersen *et al.* (2003) waren 47 bekannte centrosomale Proteine in der Centrosomenpräparation aus einer menschlichen Zelllinie nachgewiesen worden. Für 24 dieser Proteine existieren Homologe in *Dictyostelium*, von denen auch bereits 10 untersucht worden sind (Tabelle 2). Für die restlichen 14 Proteine ist eine Lokalisation an isolierten *Dictyostelium*-Centrosomen bisher nicht bekannt (Tabelle 3).

Zusätzlich konnten für das menschliche Centrosom 64 neue Kandidaten gefunden werden, und für 23 davon wurde die centrosomale Lokalisation durch GFP-Fusion bestätigt. Zu diesen

23 neuen centrosomalen Proteinen konnte in *Dictyostelium* kein homologes Protein identifiziert werden; von den 41 weiteren, nicht verifizierten Kandidaten gibt es nur vier Proteine mit ausreichender Homologie (Tabelle 4). Es wurden also zu den 111 Proteinen, die Andersen *et al.* in der menschlichen Centrosomenpräparation nachgewiesen haben, nur 28 *Dictyostelium*-Proteine mit signifikanter Aminosäureübereinstimmung gefunden. Hinzu kommen 10 Homologe zu centrosomalen Proteinen, die nicht in der Centrosomenpräparation aus menschlichen Zellen enthalten waren (Tabelle 5). Insgesamt konnte durch diese Suche die Zahl an höchstwahrscheinlich centrosomalen Proteinen in *Dictyostelium* von 10 auf 38 erhöht werden. Da aber auch das Centrosom der Amöbe ein sehr komplexes Organell ist und aus mehr als 100 verschiedenen Proteinen aufgebaut sein dürfte, fehlen wohl noch mehr als 60 Proteine, die noch auf ihre Identifizierung warten.

**Tabelle 2: Menschliche Proteine und ihre Homologen aus *Dictyostelium* mit bestätigter Lokalisation an isolierten Centrosomen**

Mensch		<i>Dictyostelium</i>		Identität
$\gamma$ -Tubulin	SWISS-PROT: P23258	DdTubC	DDB0168446	60 %
GCP2	SWISS-PROT: Q9BSJ2	DdSpc97	DDB0191247	32 %
GCP3	SWISS-PROT: Q96CW5	DdSpc98	DDB0191482	29 %
Centrin 2	SWISS-PROT: P41208	DdCrp	DDB0219932	33 %
Nek2 Kinase	SWISS-PROT: P51955	DdNek2	DDB0202045	43 %
ch-TOG	SWISS-PROT: Q14008	DdCP224	DDB0232951	24 %
EB1	SWISS PROT: Q15691	DdEB1	DDB0191160	39 %
Dynein heavy chain A	SWISS PROT: Q14204	DdDhcA	DDB0185096	50 %
LIS1	SWISS PROT: P43034	DdLIS1	DDB0219930	55 %
eIF-3zeta homologue to <i>S. pombe</i> Moe1	SWISS- PROT:O15371	DdMoe1	DDB0203171	37 %

**Tabelle 3: Centrosomale Proteine, die in der Centrosomenpräparation aus menschlichen Zellen nachgewiesen wurden, und ihre potentiellen Homologen aus *Dictyostelium***

Mensch		<i>Dictyostelium</i>		Identität
Dynein intermediate chain	SWISS-PROT: Q13409	DdDIC	DDB0215245	46 %
Dynactin p150 subunit	NP_075408	Ddp150	DDB0220487	26 %
Dynactin p50 subunit	SWISS-PROT: Q13561	Ddp50	DDB0220488	22 %
$\alpha$ -centractin Arp1	SWISS-PROT: P42024	DdArp1	DDB0188184	58 %
Lis-interacting protein mNudE	NP_060138	DdNudE	DDB0206558	29 %
CLIP-associating protein CLASP	TREMBL: O75118	DdCLASP	DDB0202837	27 %
Tubulin $\alpha$ -1 chain	SWISS-PROT: P05209	DdTubA	DDB0191380	64 %
Tubulin $\beta$ -2 chain	SWISS-PROT: P05217	DdTubB	DDB0191169	70 %
Heat shock protein HSP 90- $\alpha$	SWISS-PROT: P07900	heat shock protein 90	DDB0191163	64 %
14-3-3 protein $\epsilon$	SWISS-PROT: P42655	14-3-3 protein	DDB0232938	78 %
Casein kinase I, $\delta$	SWISS-PROT: P48730	casein kinase 1	DDB0185182	71 %
cAMP-dependent protein kinase, alpha catalytic subunit	SWISS-PROT: P17612	protein kinase A catalytic subunit	DDB0215408	45 %
cAMP-dependent protein kinase type II-beta regulatory chain	SWISS-PROT: P31323	protein kinase A regulatory subunit	DDB0214950	40 %
serine/threonine protein phosphatase 2A	SWISS-PROT: P30153	phosphoprotein phosphatase A	DDB0191258	55 %

**Tabelle 4: Kandidaten für neue centrosomale Proteine, die in der Centrosomenpräparation aus menschlichen Zellen nachgewiesen wurden, und ihre potentiellen Homologen aus *Dictyostelium***

Mensch		<i>Dictyostelium</i>		Identität
Kinesin-like protein KIF2	SWISS-PROT: O00139	Kinesin 6	DDB0191499	57 %
Ubiquitin activating enzyme E1	SWISS-PROT: P22314	DdUAE1	DDB0190927	50 %
NGAP-like protein	TREMBL: Q96SE1	DdNGAP	DDB0205484	33 %
Autoantigen	TREMBL: Q13025	Autoantigen	DDB0219320	33 %

**Tabelle 5: Bekannte centrosomale Proteine, die nicht in der Centrosomenpräparation aus menschlichen Zellen nachgewiesen wurden, und ihre potentiellen Homologen aus *Dictyostelium***

Centrosomales Protein (Organismus)		<i>Dictyostelium</i>		Identität
Ran (Mensch)	SWISS PROT: P17080	DdRan	DDB0215409	70 %
AuroraB (Mensch)	SWISS-PROT: O14965	DdAurB	DDB0216254	48 %
MPS1 Kinase (Zebrafisch)	UNI-PROT: Q8AYG3	DdMps1	DDB0203944	47 %
NTKL (Mensch)	NP_065731	DdNTKL	DDB0189357	42 %
Centrin 1 (Mensch)	SWISS-PROT: Q12798	DdCen	DDB0204694	38 %
Polo like Kinase (Mensch)	SWISS-PROT: P53350	DdPLK	DDB0167712	36 %
SUN-1 ( <i>C. elegans</i> )	SWISS-PROT: Q20924	DdSUN1	DDB0219949	28 %
$\beta$ -Catenin (Mensch)	SWISS-PROT: P35222	Aardvark	DDB0191132	24 %
Zyg-12 ( <i>C. elegans</i> )	SWISS-PROT: Q23529	DdHk3	DDB0219928	22 %
D-TACC ( <i>D. melanogaster</i> )	UNI-PROT: Q9NJH5	DdTACC1	DDB0220500	20 %

## 3.2 Identifizierung neuer centrosomaler Proteine durch Massenspektrometrie

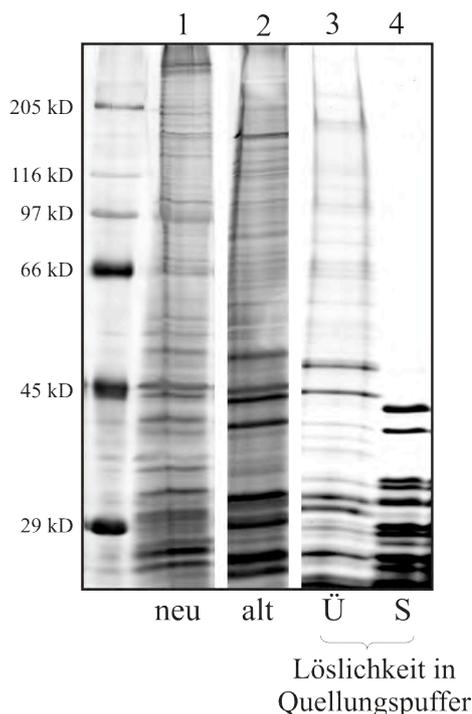
### 3.2.1 2D-Gelelektrophorese

Für die ersten Versuche, neue centrosomale Proteine mit Hilfe der Massenspektrometrie zu identifizieren, wurden Centrosomen aus *Dictyostelium*-Zellen anhand eines bereits veröffentlichten Protokolls gewonnen (Gräf, 2001a).

Um komplexe Proteingemische wie Centrosomen in für die Massenspektrometrie geeigneter Weise vorzubereiten, ist konventionelle die eindimensionale Gelelektrophorese nicht ausreichend. Um eine bessere Auftrennung der Proteine zu erreichen, wurde daher 2D-Gelelektrophorese angewendet. Für dieses Verfahren müssen die Proteine erst in einem Quellungspuffer aufgenommen werden, der kein ionischen Detergens enthalten darf. In diesem Gemisch lässt man die Gelstreifen, die einen pH-Gradienten aufweisen, aufquellen. Die Proteine werden durch Anlegen einer elektrischen Spannung ihrem isoelektrischen Punkt (pI) entsprechend aufgetrennt. Dieser Prozess wird als isoelektrische Fokussierung bezeichnet. Die Proteine müssen dann durch Umpuffern des Gelstreifens mit SDS denaturiert werden,

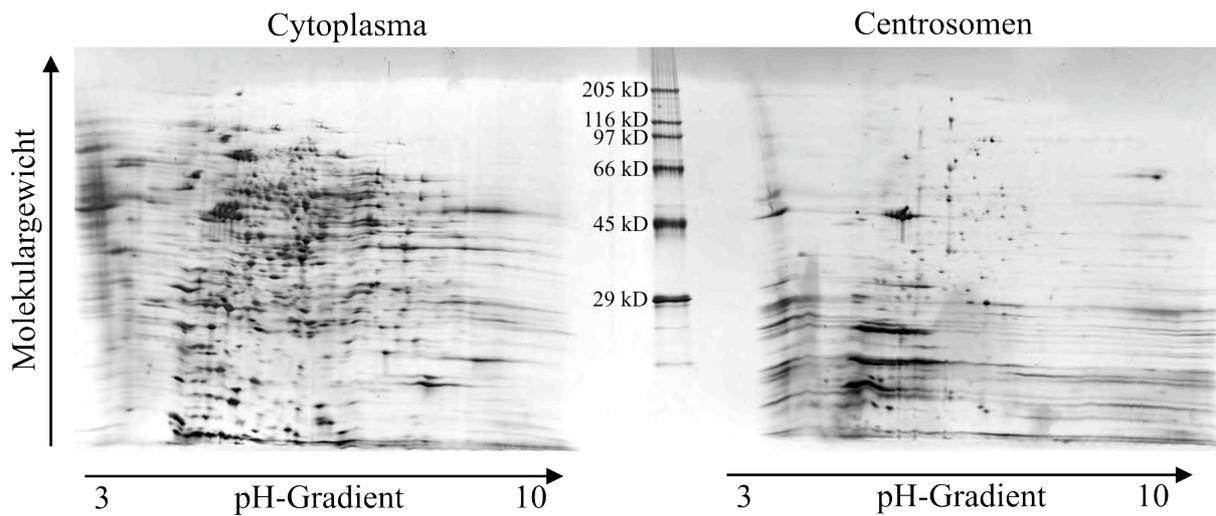
um sie ihrer Größe entsprechend in einer SDS-Gelelektrophorese, und damit in einer zweiten Dimension, auftrennen zu können.

Da sich jede Probe bei dieser Methode unterschiedlich verhält, mussten erst Pufferbedingungen gefunden werden, bei welchen sich die centrosomalen Proteine optimal voneinander trennen lassen und somit klare Spots auf dem Gel zu erkennen sind. Das beste Ergebnis wurde mit einem Quellungspuffer erzielt, der als denaturierendes Agens hauptsächlich große Mengen Harnstoff (7 M Harnstoff und 2 M Thioharnstoff), und das milde, nicht ionische Detergens Chaps enthält. Zusätzlich zeigte sich, dass eine hohe DTT-Konzentration eingesetzt werden sollte. In diesem Puffer wurden die Proben aufgenommen, ohne sie, wie für normale Probenpuffer üblich, aufzukochen. Dass bei dieser Prozedur nicht alle Proteine in Lösung gehen, zeigt Abbildung 5. Hierfür wurden lösliche und unlösliche Bestandteile durch Zentrifugation voneinander getrennt, mit SDS-Probenpuffer versetzt und neben einer vollständigen centrosomalen Probe auf einem SDS-Gel aufgetragen und eine Silberfärbung durchgeführt.



**Abbildung 5: Nicht alle Bestandteile der Centrosomenpräparation sind im Quellungspuffer löslich.** Centrosomen wurden nach der neuen (1) und der alten (2) Methode präpariert und auf einer SDS-PAGE aufgetrennt. (3 + 4) Centrosomen wurden in Quellungspuffer aufgenommen und die unlöslichen Bestandteile durch Zentrifugation abgetrennt. Der Überstand (3) und das Sediment (4) wurden auf einer SDS-PAGE aufgetrennt. Die Proteine wurden im Gel mit einer Silberfärbung sichtbar gemacht. Links am Rand sind die Größen der Banden des Molekulargewichtsstandards in kD angegeben.

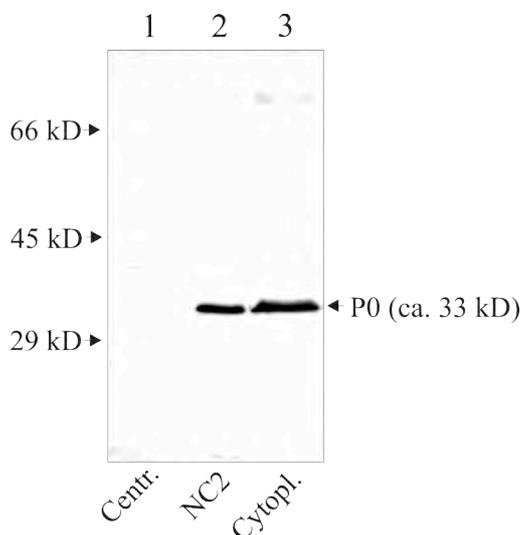
Nach Entfernung der unlöslichen Bestandteile wurde nun eine isoelektrische Fokussierung in einem pH-Gradienten von pH 3-10 durchgeführt. Der Gelstreifen wurde dann in einer SDS-haltigen Lösung umgepuffert, wobei sich erneut als wichtig erwies, hohe Konzentrationen an DTT einzusetzen. Es schloss sich eine SDS-Gelelektrophorese an. Die Proteine wurden dann entweder mit Silberfärbung oder durch colloidales Coomassie angefärbt (Abbildung 6).



**Abbildung 6: Silberfärbung eines 2D-Geles.** Cytoplasmatische und centrosomale Proteine wurden nach der isoelektrischen Fokussierung in einem pH-Gradienten von pH 3-10 auf ein SDS-Gel übertragen und in einer zweiten Dimension nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Dargestellt ist die Silberfärbung eines Gels, die Größe der Standardbanden ist in der Mitte in kD angegeben. Die horizontalen Streifen deuten an, dass in diesem Bereich die Proteine in der ersten Dimension nicht vollständig aufgetrennt werden konnten.

### 3.2.2 Erste Versuche mit der Massenspektrometrie

Die erzeugten 2D-Gele wurden in Kooperation mit dem Labor von Dr. Albert Sickmann von Dr. Yvonne Reinders in Würzburg analysiert. Hierfür wurden Spots aus den Gelen ausgeschnitten und Proteine nach Verdau mit Trypsin durch MALDI- oder ESI-MS identifiziert. Leider wurden in diesem ersten Anlauf nur ribosomale Proteine gefunden. Dies ist nicht besonders ungewöhnlich, da Ribosomen zu den häufigsten Kontaminationen bei den verschiedensten Aufreinigungsmethoden zählen. Mit einer Westernblot-Analyse konnte allerdings gezeigt werden, dass nur geringe Mengen an Ribosomen in der Präparation vorhanden sein konnten, da das ribosomale Protein P0 nicht nachgewiesen werden konnte (Abbildung 7). Dieses Phänomen ist unter Anwendern der Massenspektrometrie nicht unbekannt, allerdings lässt sich in der Literatur keine gute Begründung dafür finden.

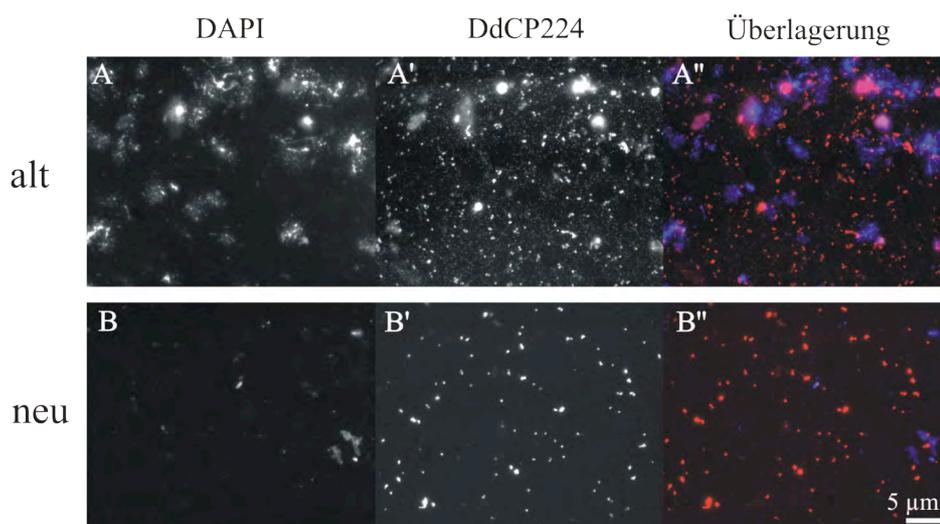


**Abbildung 7: Das ribosomale Protein P0 ist in der centrosomalen Probe nicht nachweisbar.** Aufgereinigte Centrosomen (1) wurden zusammen mit Proben der nicht-centrosomalen Fraktion NC2 (2) und der cytoplasmatischen Fraktion (3) auf einer SDS-PAGE aufgetrennt und in einer Westernblot-Analyse das ribosomale Protein P0 mit einem monoklonalen Antikörper nachgewiesen. Der Größe dreier Standardbanden ist links in kD angegeben.

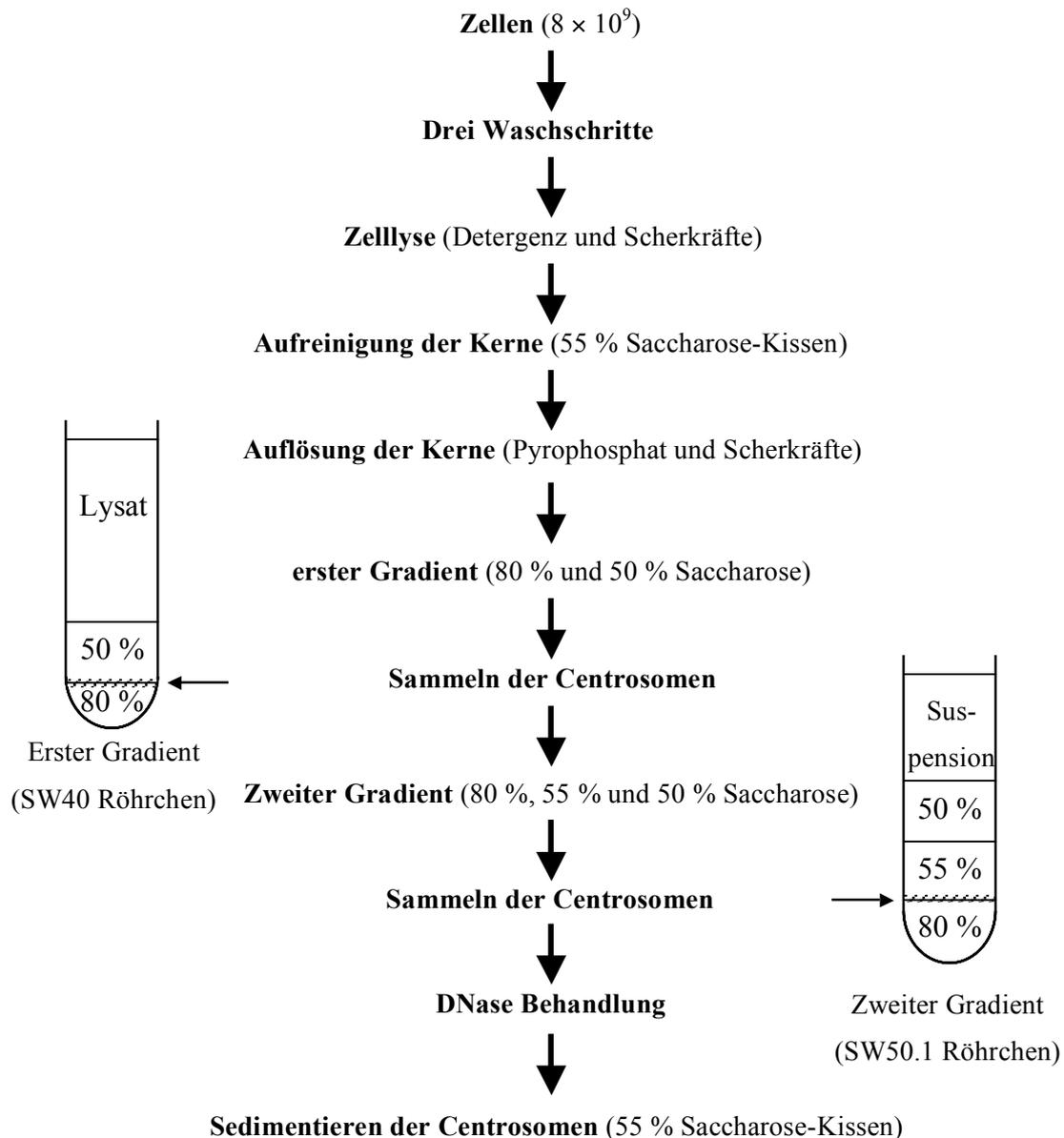
Ein weiteres Problem ergab sich daraus, dass zu diesem Zeitpunkt das *Dictyostelium*-Genomprojekt noch nicht fertiggestellt war. Da deshalb noch keine Identifizierung über einen Peptidmassenfingerabdruck durchgeführt werden konnte, musste auf *de novo*-Sequenzierung (Cagney und Emili, 2002) zurückgegriffen werden. Bei dieser recht unempfindlichen Methode wird die Aminosäuresequenz eines Peptides durch Massenspektrometrie bestimmt und dann mit der Datenbank bereits bekannter Proteine bzw. Proteinvorhersagen von sequenzierten Bereichen verglichen. Auch dies bietet wieder eine Erklärung für das zahlreiche Auffinden ribosomaler Proteine, da das Ribosom in *Dictyostelium* bereit sehr genau analysiert ist und damit ribosomale Proteine in der verwendeten Datenbank überrepräsentiert sein dürften. Dennoch zeigten diese ersten Versuche, dass sowohl die Präparation der Centrosomen, als auch die Auftrennung der Proteine vor der der Massenspektrometrie noch verfeinert werden mussten.

### 3.2.3 Optimierung der Centrosomenpräparation

Um eine verbesserte Aufreinigung zu erreichen, wurden der Centrosomenpräparation im Wesentlichen zwei Schritte hinzugefügt. Der erste dient einer verbesserten Abtrennung des Cytoplasmas bei der Anreicherung der Zellkerne mit den daran gebundenen Centrosomen. Als zweite Veränderung wurde eine DNase-Behandlung der Centrosomen eingeführt. Dies erwies sich als sehr wirksam, da hierdurch die Verunreinigung mit DNA und damit assoziierten Proteinen reduziert werden konnte (Abbildung 8), die bei Anwendung der alten Methode noch sehr deutlich mit einer DAPI-Färbung von Immunfluoreszenzpräparaten nachgewiesen werden konnte.



**Abbildung 8: Nachweis von DNA-Verunreinigungen in Centrosomenpräparationen.** Immunfluoreszenzpräparate von nach dem alten (A) und dem neuen (B) Protokoll isolierten Centrosomen. DNA-Kontaminationen wurden durch die Inkubation mit DAPI nachgewiesen (A und B), die Centrosomen wurden mit einem Antikörper gegen DdCP224 gefärbt (A' und B').



**Abbildung 9: Schritte der Centrosomenpräparation**

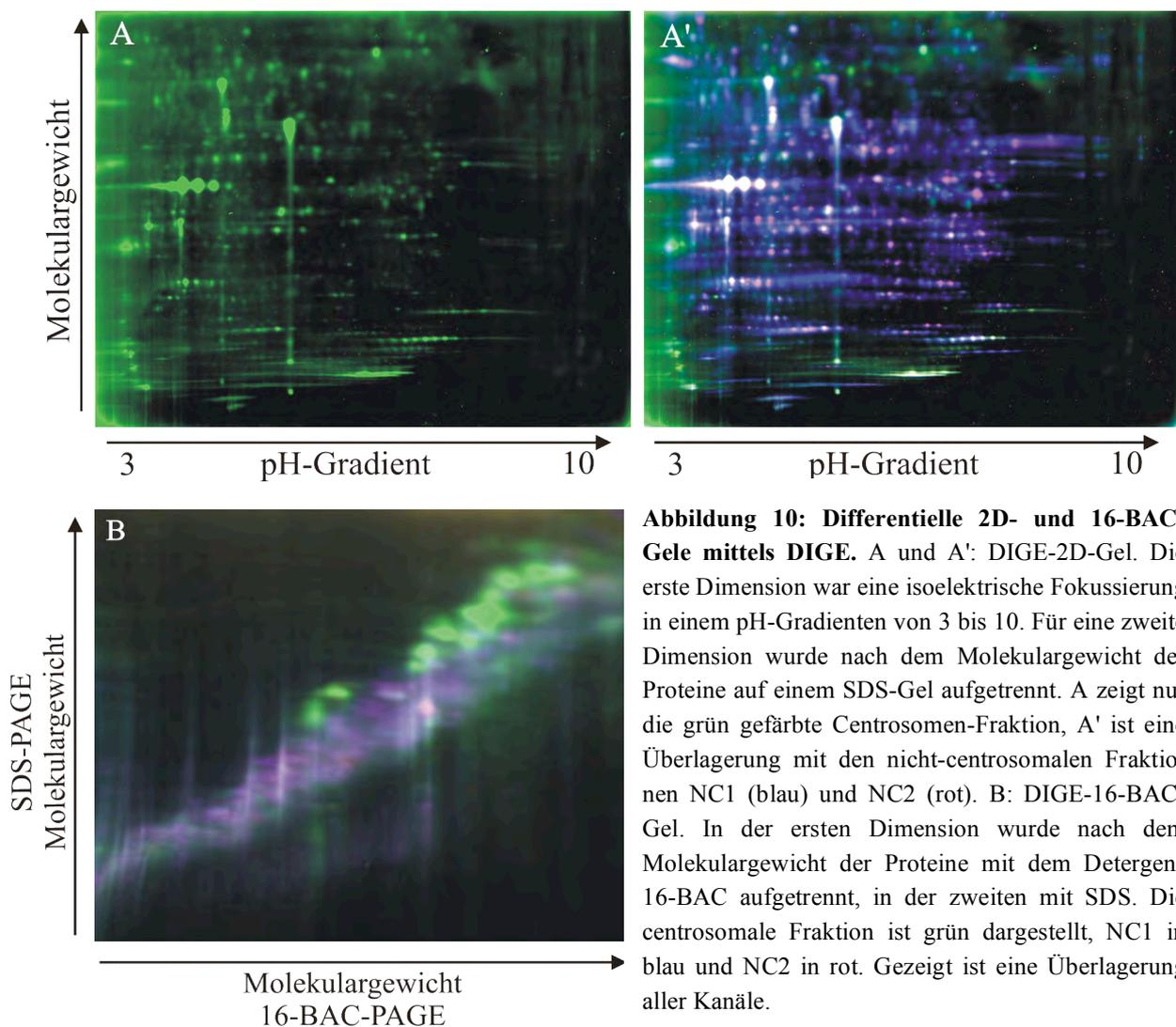
Abbildung 9 zeigt ein Fließdiagramm, in dem die einzelnen Schritte der Präparation dargestellt sind. Die Zellen wurden in großen Schüttelkulturen angezogen, geerntet und mit Phosphatpuffer gewaschen. Dem Lysepuffer wurde Cytochalasin A zugesetzt. In Kombination mit ATP sollte es für die Auflösung der Aktomyosinkomplexe sorgen, die bei der durchgeführten Zellyse mittels Triton X-100 entstehen. Nach der alten Methode wurden die Zellkerne mit den gebundenen Centrosomen nach der Zellyse durch einfache Zentrifugation gewonnen. Dies führte allerdings dazu, dass der cytoplasmatische Überstand nicht

vollständig entfernt werden konnte und das Kernsediment noch mit größeren Mengen cytoplasmatischer Proteine und Vesikeln verunreinigt war. Um dies zu verringern, wurde das Zellysate nun auf ein 55%iges Saccharose-Kissen aufgetragen und die Kerne durch die Zentrifugation durch die Saccharoselösung deutlicher vom Cytoplasma getrennt. Die nächsten Schritte wurden weitgehend vom alten Protokoll übernommen: Die Centrosomen wurden durch eine Behandlung mit Pyrophosphat und einer erhöhten Triton X-100-Konzentration von der Kernmembran abgetrennt und die Kerne aufgelöst. Es schloss sich eine Inkubation mit Heparin an. Dieses Polyanion bindet an Histone und bewirkt dadurch eine bessere Löslichkeit des Chromatins und soll damit die Cosedimentation von DNA und DNA-gebundenen Proteinen mit den Centrosomen in den folgenden Zentrifugationsschritten reduzieren. Die Aufreinigung der Centrosomen erfolgte dann mit Hilfe zweier Zentrifugationen im Dichtegradienten. Der erste Stufengradient wurde aus einer 80%igen und einer 50%igen Saccharoseschicht aufgebaut. Mit einer Glaskapillare und Peristaltikpumpe wurden dann die Centrosomen, die sich an der 80-50 %-Grenze ansammeln, und zwei nicht-centrosomale Fraktionen (NC1 bzw. NC2) gesammelt. Die centrosomale Fraktion wurde dann erneut auf einen Gradienten geladen, der diesmal zusätzlich noch eine 55%ige Schicht enthielt. Nach dem Durchlaufen dieses Gradienten waren die Centrosomen nun gut genug aufgereinigt, um eine Inkubation bei Raumtemperatur unbeschadet überstehen zu können. Dies war nötig für die folgende DNase-Behandlung, der zweiten wesentlichen Veränderung im Vergleich zur alten Präparationsmethode. Damit sollten anheftende DNA und DNA-bindende Proteine entfernt werden. Als letztes wurden die Centrosomen noch einmal über ein Saccharose-Kissen zentrifugiert, um die DNase zu entfernen und die Centrosomen zu sedimentieren. Mit dieser Präparation konnten etwa 120 bis 150  $\mu\text{g}$  Centrosomen aus einer Ausgangsmenge von  $8 \times 10^9$  Zellen isoliert werden. Um die Proteinzusammensetzung der Centrosomen präpariert nach der neuen Methode mit der der alten Methode zu vergleichen, wurden beide auf einem SDS-Gel aufgetrennt und die Proteine mit einer Silberfärbung sichtbar gemacht (Abbildung 5). Es zeigte sich, dass vor allem die starken Banden im Bereich des niedrigen Molekulargewichts schwächer ausgeprägt waren. Da die Intensität dieser Banden auch zwischen Präparationen der gleichen Art schwankt, liegt die Vermutung nahe, dass es sich hierbei um Verunreinigungen handelt.

Derart aufgereinigte Centrosomen wurden dann erneut in der 2D-Gelelektrophorese eingesetzt und mittels Massenspektrometrie analysiert. Es zeigte sich, dass ribosomale Proteine nun weniger dominant auftraten, und es konnten auch zwei bereits bekannte centrosomale Proteine,  $\gamma$ -Tubulin und DdCP224, identifiziert werden.

### 3.2.4 Optimierung der Auftrennung

Die Methode der 2D-Gelelektrophorese mit isoelektrischer Fokussierung als erster Dimension hat den Nachteil, dass sie nur zur Auftrennung von durchschnittlichen Proteinen geeignet ist. Besonders große, kleine oder auch stark geladene Proteine können meist nicht in einzelne Spots aufgelöst werden oder gehen bei der Übertragung von der ersten auf die zweite Dimension verloren (Herbert, 1999; Rabilloud, 1996; Rabilloud *et al.*, 1997). Besonders schlecht ist die Auftrennung im basischen Bereich, was sich durch horizontale Streifen im Gel bemerkbar macht (Abbildung 6). Daher wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Yvonne Reinders weitere Methoden zur Probenvorbereitung etabliert (Reinders *et al.*, 2005). Gut geeignet für besonders große, hydrophobe oder basische Proteine ist die 16-BAC/SDS-Gelelektrophorese (Hartinger *et al.*, 1996). Hierbei werden die Proteine in einer ersten Dimension in Anwesenheit des Detergens 16-BAC aufgetrennt.



**Abbildung 10: Differenzielle 2D- und 16-BAC-Gele mittels DIGE.** A und A': DIGE-2D-Gel. Die erste Dimension war eine isoelektrische Fokussierung in einem pH-Gradienten von 3 bis 10. Für eine zweite Dimension wurde nach dem Molekulargewicht der Proteine auf einem SDS-Gel aufgetrennt. A zeigt nur die grün gefärbte Centrosomen-Fraktion, A' ist eine Überlagerung mit den nicht-centrosomalen Fraktionen NC1 (blau) und NC2 (rot). B: DIGE-16-BAC-Gel. In der ersten Dimension wurde nach dem Molekulargewicht der Proteine mit dem Detergens 16-BAC aufgetrennt, in der zweiten mit SDS. Die centrosomale Fraktion ist grün dargestellt, NC1 in blau und NC2 in rot. Gezeigt ist eine Überlagerung aller Kanäle.

Für einen differentiellen Ansatz wurde die sogenannte DIGE Methode (differential in-gel electrophoresis) (Tonge *et al.*, 2001; Unlu *et al.*, 1997) angewendet. Die Proteine von centrosomalen und nicht centrosomalen Proben werden hierfür an unterschiedliche, fluoreszierende Farbstoffe gekoppelt. Danach werden beide Proben vereinigt und in einer konventionellen 2D- oder 16-BAC-Gelelektrophorese aufgetrennt (Abbildung 10). Anhand der Fluoreszenz kann man erkennen, welche Spots nur, bzw. stärker in der centrosomalen Probe auftreten und diese für die weitere Analyse auswählen. Signale, die in allen Proben gleichermaßen auftreten, können als unspezifisch herausgefiltert werden.

Neben diesen bildgebenden Verfahren wurde noch die iTRAQ-Methode (Ross *et al.*, 2004) verwendet, die ohne Gelelektrophorese auskommt. Hierfür wurden die Proteingemische zuerst mit Trypsin verdaut und dann die einzelnen Peptide von centrosomalen und nicht centrosomalen Proben mit unterschiedlichen iTRAQ-Reagenzien markiert, welche in der Massenspektrometrie gut nachweisbar sind. Nach der Vereinigung der beiden Gemische folgte eine Auftrennung der Peptide über eine Kationenaustausch-Chromatographie und der Nachweis mittels Massenspektrometrie. Bei diesem Verfahren spielt die Größe der Proteine keine Rolle, sie kann also bei der Identifizierung von besonders kleinen wie auch besonders großen Proteinen helfen.

### 3.2.5 Auswertung der Rohdaten

Für alle Methoden wurde die Regel angewendet, dass ein Protein nur als gefunden gewertet wird, wenn mindestens zwei verschiedene seiner Peptide identifiziert werden konnten.

Eine weitere Möglichkeit der Klassifizierung der Daten bietet der Anreicherungsfaktor, also das Mengenverhältnis des Proteins zwischen der centrosomalen und der nicht-centrosomalen Fraktion NC2. Die Grenze für diesen Faktor wurde bei der iTRAQ Methode auf 1,5 festgelegt. Bei den gelbasierten Techniken wurde nach rein optischen Gesichtspunkten vorgegangen, das heißt, es wurden nur Spots auf den Gelen zur Messung ausgewählt, bei denen in der nicht-centrosomalen Fraktion mit dem Auge kein Signal zu erkennen war.

Für die so ausgewählten Proteine wurde in der nur teilweise annotierten Dictybase-Genomdatenbank ([www.dictybase.org](http://www.dictybase.org)) nach Informationen gesucht. Hier finden sich sowohl bestätigte Daten von bereits untersuchten Proteinen als auch Vermutungen über die Funktion und Lokalisierung neuer Proteine. Letztere basieren auf Anwesenheit von bekannten Domänen oder Sequenzvergleichen und wurden ebenfalls für die Einordnung der gefundenen Proteine verwendet. Alle nicht-annotierten Proteine, über die dort nichts oder nur wenig angegeben war, wurden anschließend auf Ähnlichkeiten zu aus anderen Organismen bekannten Proteinen untersucht. Hierfür wurde der NCBI-Blast verwendet.

### 3.2.6 Zusammenfassung der identifizierten Proteine

Die Ergebnisse dieser massenspektrometrischen Analyse der Centrosomen von *Dictyostelium* wurden bereits veröffentlicht (Reinders *et al.*, 2005). Allerdings unterscheiden sich die in der Veröffentlichung aufgeführten Ergebnisse teilweise von den hier gemachten Angaben, da sich im letzten halben Jahr die Einträge in der Dictybase-Genomdatenbank für einige Proteine verändert haben. Eine vollständige Auflistung der insgesamt 261 gefundenen Proteine und die jeweilige Methode, mit der sie identifiziert wurden, ist im Anhang (Tabelle 8) zu finden.

Für 217 der gefundenen Proteine ist bereits eine nicht-centrosomale Lokalisation und/oder Funktion bekannt, oder durch Homologie zu anderen Proteinen in anderen Organismen wahrscheinlich. Diese wurden daher als Verunreinigung angesehen. Dazu zählen vor allem die ribosomalen, Aktin- und DNA-bindenden Proteine sowie Stoffwechsellzyme und alle Proteine, die mit Transkription und Translation zusammenhängen.

Es wurden drei bereits bekannte Komponenten des *Dictyostelium*-Centrosoms gefunden. Es handelte sich hierbei um DdCP224 (Gräf *et al.*, 2000),  $\gamma$ -Tubulin (Euteneuer *et al.*, 1998) und DdSPC98 (Daughterer und Gräf, 2002). Zusätzlich konnten acht Proteine nachgewiesen werden, deren homologe Proteine sich in anderen Organismen am Centrosom befinden (Tabelle 6).

**Tabelle 6: Identifizierte bekannte centrosomale Proteine**

Name	DDB	Veröffentlichung
$\gamma$ -Tubulin	DDB0185068	Euteneuer <i>et al.</i> , 1998
Microtubule-associated protein CP224	DDB0232951	Gräf <i>et al.</i> , 2000
Spindle pole body component 98	DDB0191482	Daughterer und Gräf, 2002
fttB, Dd14-3-3	DDB0232938	Pietromonaco <i>et al.</i> , 1996
heat shock cognate protein, hsc90, hsp90	DDB0191163	Lange <i>et al.</i> , 2000
kinesin family member 13	DDB0201557	Whitehead <i>et al.</i> , 1996
GTP-binding nuclear protein RAN/TC4	DDB0215409	Zhang <i>et al.</i> , 1999
$\alpha$ -Tubulin	DDB0191380	Andersen <i>et al.</i> , 2003
$\beta$ -Tubulin	DDB0191169	Andersen <i>et al.</i> , 2003
Phosphoprotein Phosphatase A	DDB0191258	Andersen <i>et al.</i> , 2003
ubiquitin activating enzyme E1	DDB0220497	Andersen <i>et al.</i> , 2003

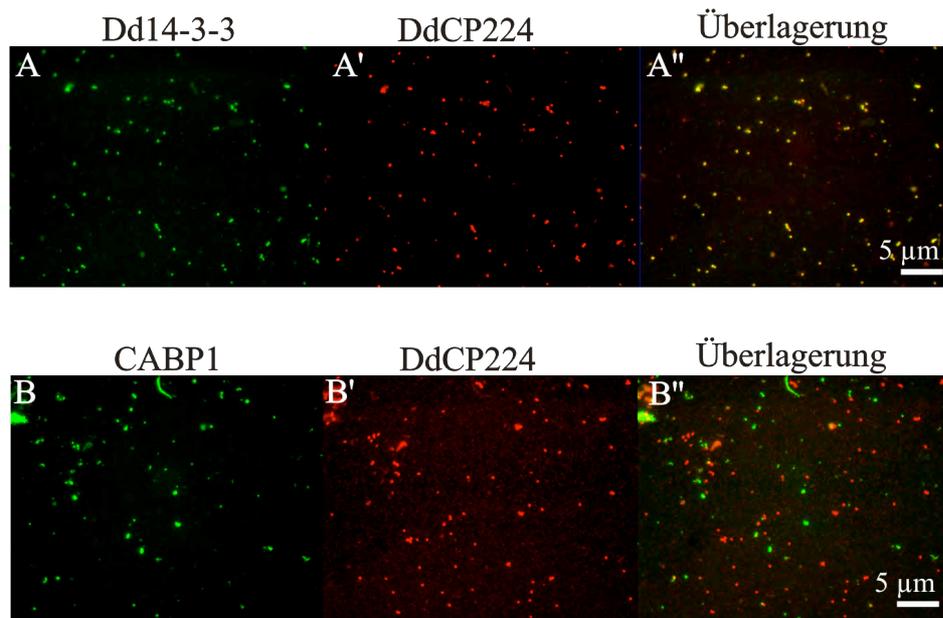
Übrig blieben 33 Proteine, über die entweder nichts bekannt ist, oder deren bekannte oder durch Homologievergleich angenommene Funktion eine Lokalisation am Centrosom nicht unwahrscheinlich erscheinen lässt. Sie werden als mögliche centrosomale Proteine angesehen. Die Anreicherungsfaktoren dieser Kandidaten und der centrosomalen Proteine sind im Anhang aufgeführt (Tabelle 9). Besonders interessant erscheinen hierbei Proteine, die hohe Anreicherungsfaktoren aufweisen oder durch mehr als eine der drei Auftrennungsmethoden (also 2D-Gelelektrophorese, 16-BAC-Gele oder iTRAQ-Methode) identifiziert wurden. Es konnten sieben Proteine, die als centrosomal oder möglicherweise centrosomal angesehen werden, mit jeweils zwei Methoden und zwei Proteine mit sogar allen drei Methoden nachgewiesen werden.

### 3.2.7 Überprüfung der centrosomalen Lokalisation einzelner Kandidaten

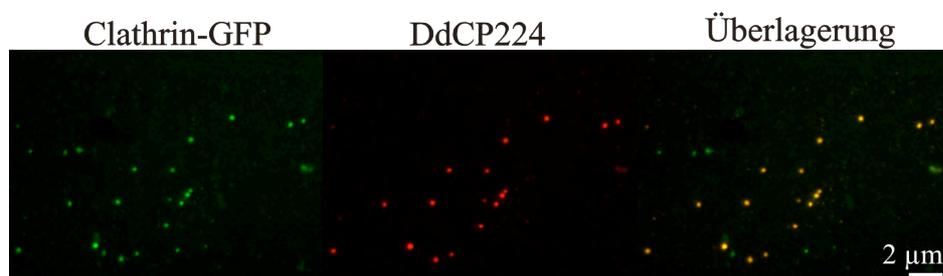
Einfach zu überprüfen sind Kandidaten, gegen die ein Antikörper existiert, oder von denen ein GFP-Fusionskonstrukt zur Verfügung steht. Von anderen Arbeitsgruppen wurden freundlicherweise polyklonale Antikörper gegen das 14-3-3 Protein aus *Dictyostelium* (DDB0232938) und gegen CABP1 (DDB0185023) bereitgestellt. Damit konnte eine Immunfärbung von isolierten Centrosomen durchgeführt werden (Abbildung 11). Für die Markierung des Centrosoms wurde der monoklonale Antikörper gegen DdCP224 verwendet. Mit dem Antikörper gegen das 14-3-3 Protein war eine eindeutige Färbung am Centrosom zu erkennen. Dd14-3-3 ist also tatsächlich ein echtes centrosomales Protein. Der Antikörper, der gegen das Protein CABP1 gerichtet ist, erzeugte dagegen keine Markierung am Centrosom, wohl aber an anderen Strukturen im Präparat, die kein DdCP224 enthielten.

Von Dr. Terry O'Halloran wurde ein Clathrin-GFP-Stamm zur Verfügung gestellt. Hiervon wurden ebenfalls Centrosomen isoliert und mikroskopisch daraufhin überprüft, ob die GFP-Fluoreszenz mit einer Immunfärbung von DdCP224 kolokalisiert (Abbildung 12). An jedem Centrosom konnte ein schwaches GFP-Signal beobachtet werden. Daraus kann man schließen, dass Clathrin zwar mit dem Centrosom assoziiert ist, aber entweder die Bindung nicht sehr stark ist oder nur wenige Moleküle beteiligt sind.

Über das bislang unbekanntes Protein DDB0191988 konnte ebenfalls eine Information erhalten werden. Dieses Protein wurde im Labor von Prof. Dr. Angelika Noegel in Köln als Interaktor des Cyclase-aktivierten Proteins (CAP, DDB0191139) (Sultana *et al.*, 2005) identifiziert. Teile des 248 kD großen Proteins wurden als GFP-Fusionsprotein exprimiert und dadurch am Centrosom lokalisiert (Angelika Noegel, persönliche Kommunikation).



**Abbildung 11: Überprüfung der centrosomalen Lokalisation von Dd14-3-3 und CABP1.** Immunfluoreszenz-Mikroskopie isolierter Centrosomen, gefärbt mit Antikörpern gegen Dd14-3-3 (A; grün) und CABP1 (B; grün). Gegenfärbung mit dem monoklonalen Antikörper gegen DdCP224 (A' und B', rot). In der Überlagerung der Kanäle (A'' und B'') ist zu erkennen, dass die Signale von Dd14-3-3 mit denen von DdCP224 übereinstimmen, nicht aber die Signale von CABP1.



**Abbildung 12: Clathrin-GFP lokalisiert an isolierten Centrosomen.** Immunfluoreszenz-Mikroskopie isolierter Centrosomen aus einem Stamm, der Clathrin-GFP (grün) exprimiert. Die Centrosomen wurden mit dem monoklonalen Antikörper gegen DdCP224 (rot) gefärbt. Die GFP-Fluoreszenz kolokalisiert mit der Färbung von DdCP224.

Auf diese Weise konnte für drei der 33 Kandidaten auf eine von Massenspektrometrie unabhängige Weise eine centrosomale Lokalisation in *Dictyostelium* bestätigt und für einen Kandidaten ausgeschlossen werden.

### 3.3 Untersuchung von DCX in *Dictyostelium discoideum*

#### 3.3.1 Sequenzvergleich und Klonierung von DdDCX

In *Dictyostelium* konnte bei einer BLASTP-Suche in Daten des *Dictyostelium*-Genomprojektes ein Protein identifiziert werden, das in 29 % der Aminosäuren mit dem menschlichen Doublecortin übereinstimmt (Abbildung 13). Dieses Protein mit der Dictybase-Nummer DDB0233528 wurde als DdDCX bezeichnet. Die Identität beschränkt sich allerdings auf die beiden DC-Domänen, welche Doublecortin die Bindung an Mikrotubuli ermöglichen. Der Prolin- und Serin-reiche C-Terminus, welcher vermutlich die Bindung von Doublecortin an andere Proteine vermittelt (Friocourt *et al.*, 2001; Tsukada *et al.*, 2003), ist



**Abbildung 13: Sequenzvergleich von DdDCX mit HsDCX.** DdDCX (DDB0233528) ist zu 29 % identisch mit HsDCX (NP 000546), die Übereinstimmungen liegen hauptsächlich in zwei Bereichen, die den DC-Domänen entsprechen. DdDCX enthält also wie das menschliche DCX die zwei Mikrotubuli-bindenden DC-Domänen, der für HsDCX wichtige C-terminale Bereich ist aber nicht konserviert.

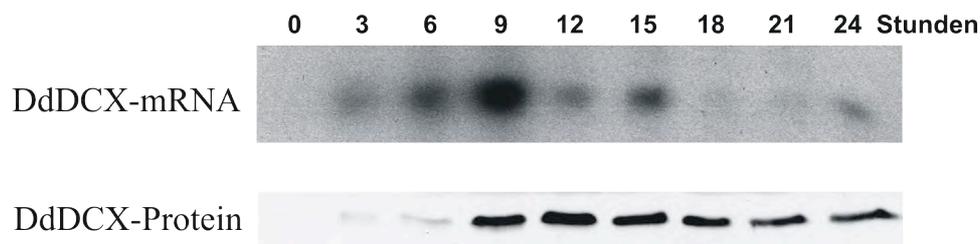
nicht konserviert. Dagegen findet sich in DdDCX zwischen den DC-Domänen ein Bereich, der mehrfach Prolin enthält und diese Funktion übernehmen könnte. Das Protein besteht nach den Angaben von Dictybase aus 308 Aminosäuren und hat ein errechnetes Molekulargewicht von 34 kD.

Der gesamte kodierende Bereich wurde mit Hilfe der PCR aus cDNA amplifiziert und in verschiedene Vektoren eingebaut. Durch die Sequenzierung konnte die Vorhersage von Dictybase für die Sequenz von DdDCX bestätigt werden.

### 3.3.2 DdDCX ist entwicklungsreguliert

Am besten untersucht ist das Doublecortin der Säugetiere. Hierfür ist bekannt, dass es nur in einer kurzen Phase der Gehirnentwicklung eine Rolle spielt, und nur dort zu dieser Zeit exprimiert wird. Um herauszufinden, ob in *Dictyostelium* ebenfalls eine entwicklungsabhängige Expression vorliegt, wurde eine Northernblot-Analyse verschiedener Entwicklungsstadien durchgeführt. Hierfür wurden Wildtypzellen auf nährstofffreien Phosphatagarplatten ausgestrichen und in regelmäßigen Abständen für die Gewinnung von mRNA geerntet. Von den Proben aller Zeitpunkte wurden einheitliche Mengen auf einem Agarosegel aufgetrennt und mittels Kapillarblot auf eine Membran übertragen. Für die Hybridisierung wurde ein radioaktiv markiertes PCR-Produkt über die gesamte Länge der codierenden Sequenz von DdDCX verwendet.

Um auch den Verlauf der Proteinmenge zu verfolgen zu können, musste erst ein polyklonaler Antikörper gegen DdDCX hergestellt werden. Zur Immunisierung wurde ein bakteriell exprimiertes Fusionsprotein aus DdDCX und dem Maltose-bindenden-Protein (MBP) verwendet. Die Spezifität des entstandenen Serums wurde durch Immunfluoreszenz-Mikroskopie (Abbildung 15) und Westernblot-Analyse (Abbildung 19 D) überprüft. Mit diesem Antikörper wurde eine Westernblot-Analyse durchgeführt. Die Zellen für die Proteinproben wurden gewonnen, wie oben für die mRNA beschrieben.

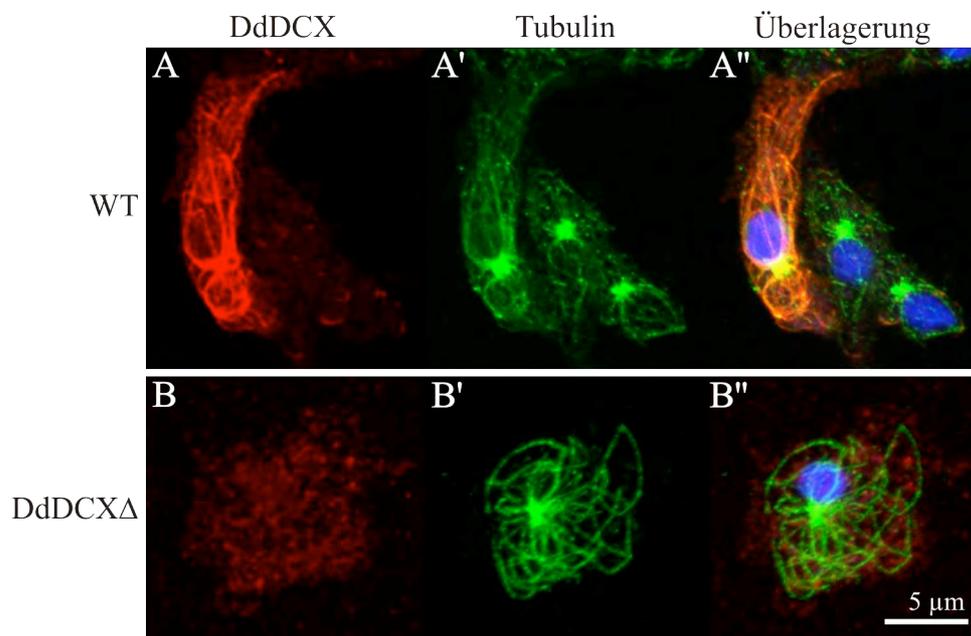


**Abbildung 14: DdDCX ist entwicklungsreguliert.** Wildtypzellen wurden für 0-24 Stunden auf nährstofffreien Phosphatagarplatten kultiviert und für die Präparation von mRNA und Gesamtzellextrakt verwendet. Dargestellt ist eine Northernblot-Analyse mit einer Sonde gegen *dcx* und eine Westernblot-Analyse mit dem polyklonalen Antikörper gegen DdDCX.

Aus beiden Experimenten war ersichtlich, dass DdDCX entwicklungsreguliert ist (Abbildung 14). In vegetativ wachsenden Zellen (t0) befand sich weder das Transkript noch Protein in den Zellen. Nach drei Stunden unter Hungerbedingungen war ein schwaches Signal auf dem Northernblot zu erkennen und ein Höhepunkt war nach neun Stunden erreicht. In den folgenden Zeitpunkten wurde die Expression wieder schwächer. Das Protein war in den Zellen erst nach neuen Stunden auf Phosphatagar in größeren Mengen vorhanden und nahm bis zum Ende des Experiments nur geringfügig wieder ab. Das Protein DdDCX scheint also recht stabil zu sein und eher langsam abgebaut zu werden.

### 3.3.3 Endogenes DdDCX und DdDCX-Fusionsproteine lokalisieren entlang von Mikrotubuli

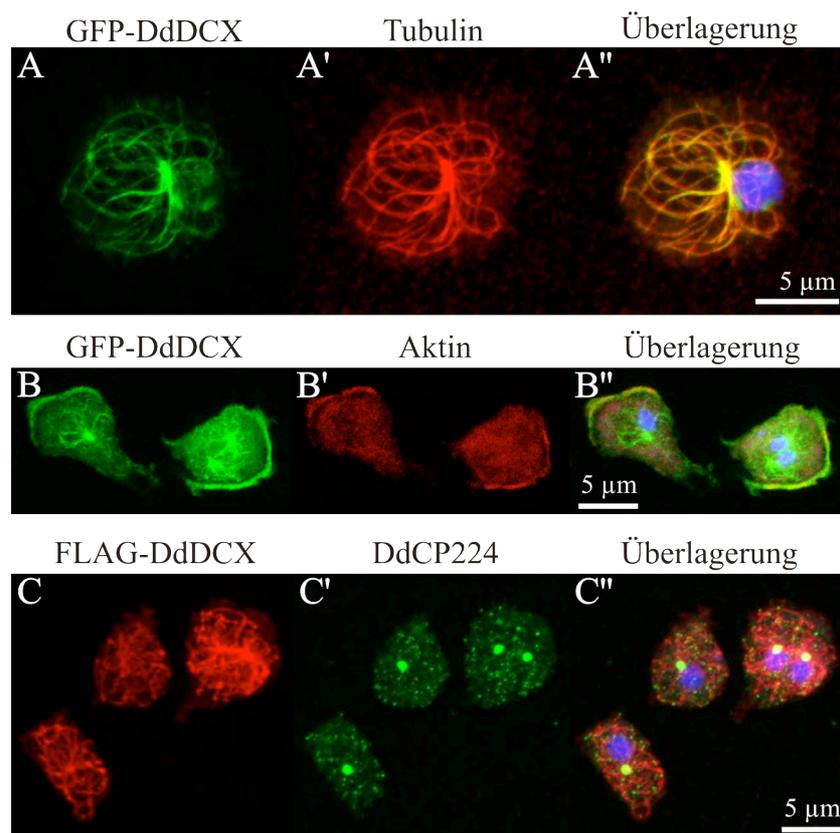
Die subzelluläre Lokalisation von DdDCX wurde mit Hilfe des spezifischen polyklonalen Antikörpers und zwei verschiedenen Fusionskonstrukten analysiert. Um eine Färbung mit dem Antikörper sehen zu können, musste man die Zellen in Phosphatpuffer hungern lassen. Anschließend wurde eine Immunfärbung durchgeführt. Nach acht Stunden unter Hungerbedingungen zeigten die meisten Zellen eine Färbung, die mit einer Markierung der Mikrotubuli übereinstimmte (Abbildung 15). In wenigen Zellen schien der Antikörper nicht zu



**Abbildung 15: Endogenes DdDCX lokalisiert entlang von Mikrotubuli.** Immunfluoreszenz-Mikroskopie mit Zellen vom Wildtyp AX2 (A) und DdDCXΔ (B), die für 8 Stunden in Phosphatpuffer geschüttelt wurden. Gefärbt wurde mit Antikörpern gegen DdDCX (A und B, rot) und gegen Tubulin (A' und B', grün). In der Überlagerung (A'' und B'') ist zusätzlich noch die DNA-Färbung mit TOPRO3 gezeigt (blau). Im Wildtyp kolokalisiert die Färbung von DdDCX mit den Mikrotubuli, die Färbung ist aber nicht in allen Zellen zu erkennen. In den DdDCXΔ-Zellen ist kein klares Signal mit dem Antikörper gegen DdDCX sichtbar.

binden. Vermutlich handelte es sich bei diesen um Zellen, die in ihrer Entwicklung zurücklagen und so DdDCX noch nicht exprimierten.

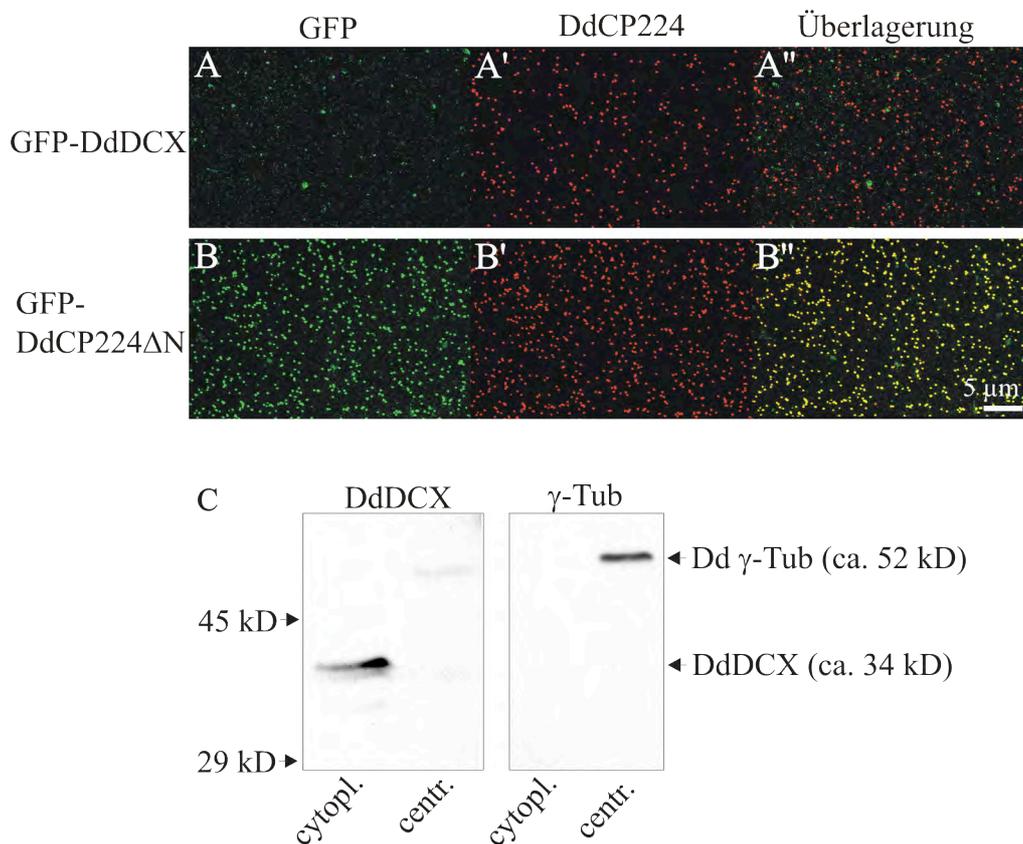
Um auch die Lokalisation von DdDCX in vegetativ wachsenden Zellen untersuchen zu können, wurden Zellen generiert, die ein GFP-DdDCX oder ein FLAG-DdDCX-Konstrukt unter Kontrolle des Aktin-6-Promotors exprimierten. Allerdings handelte sich hier um eine extreme Überexpression, da ja in vegetativ wachsenden Zellen gar kein endogenes DdDCX vorkommt. Dennoch zeigten diese Zellen keinen feststellbaren Phänotyp. Durch Immunfluoreszenz-Mikroskopie konnte gezeigt werden, dass auch die Fusionskonstrukte GFP-DdDCX (Abbildung 16 A und B) und FLAG-DdDCX (Abbildung 16 C) entlang von Mikrotubuli und am Centrosom lokalisieren. DdDCX ist also wie das Säugetier-Doublecortin ein Mikrotubuli-assoziiertes Protein (Gleeson *et al.*, 1999). GFP-DdDCX konnte zusätzlich in manchen Zellen am Cortex beobachtet werden und kolokalisierte dort mit F-Aktin (Abbildung 16 B).



**Abbildung 16: GFP-DdDCX und FLAG-DdDCX lokalisieren an Mikrotubuli.** Immunfluoreszenz-Mikroskopie mit vegetativen Zellen der Stämme GFP-DdDCX und FLAG-DdDCX. A: GFP-DdDCX (A und B, grün) kolokalisiert mit einer Färbung der Mikrotubuli (A', rot). B: In manchen Zellen ist GFP-DdDCX auch am Cortex sichtbar und kolokalisiert dort mit einer Färbung von F-Aktin (B'). C: FLAG-DdDCX wurde mit einem monoklonalen Antikörper gegen die Flag-Sequenz nachgewiesen und befindet sich ebenfalls an Mikrotubuli. Die Centrosomen wurden mit dem Antikörper gegen DdCP224 gefärbt (C'').

### 3.3.4 DdDCX ist kein fester Bestandteil des Centrosoms

Um herauszufinden, ob die Lokalisation von DdDCX am Centrosom Mikrotubuli-abhängig ist, wurden mittels eines vereinfachten Präparationsprotokolls Mikrotubuli-freie Centrosomen vom GFP-DdDCX exprimierenden Stamm und als Kontrolle vom Stamm GFP-DdCP224 $\Delta$ N gewonnen. Für letzteren war bekannt, dass das GFP-fusionierte C-terminale Fragment von DdCP224 an isolierten Centrosomen zu finden ist (Gräf *et al.*, 2000). Die Centrosomen beider Stämme wurden auf Deckgläser zentrifugiert und mit eiskaltem Methanol fixiert. Anschließend folgte eine Immunfluoreszenzfärbung mit einem monoklonalen Antikörper gegen das centrosomale Markerprotein DdCP224. Die Analyse dieser Präparate ergab, dass zwar die Centrosomen des Kontrollstamms GFP-Fluoreszenz aufwiesen, nicht aber die von GFP-DdDCX (Abbildung 17 A und B).



**Abbildung 17: DdDCX lässt sich nicht an isolierten Centrosomen nachweisen.** A: Immunfluoreszenz-Mikroskopie mit Centrosomen isoliert aus GFP-DdDCX exprimierenden Zellen. Die schwachen GFP-Signale stimmen nicht mit der Färbung des centrosomalen Proteins DdCP224 überein. B: Kontrolle zu A, GFP-DdCP224 $\Delta$ N kann an isolierten Centrosomen nachgewiesen werden. C: Westernblot-Analyse von isolierten Centrosomen aus für acht Stunden in Phosphatpuffer geschüttelten Wildtypzellen. DdDCX ist mit dem polyklonalen Antikörper in der cytoplasmatischen, nicht aber in der centrosomalen Fraktion nachweisbar. Die Färbung mit einem Antikörper gegen Dd  $\gamma$ -Tubulin ergibt dagegen nur eine Bande in der centrosomalen Fraktion.

Um zu zeigen, dass auch das endogene, erst während der Entwicklung exprimierte DdDCX-Protein nicht an isolierten Centrosomen lokalisiert ist, wurde ein ähnliches Experiment mit Centrosomen aus für acht Stunden in Phosphatpuffer gehungerten Wildtypzellen durchgeführt. Diese wurden anschließend mit dem polyklonalen Antikörper gegen DdDCX gefärbt. Auch hier konnte DdDCX nicht am Centrosom nachgewiesen werden, wohl aber an den Mikrotubuli der parallel gefärbten Zellen (nicht gezeigt).

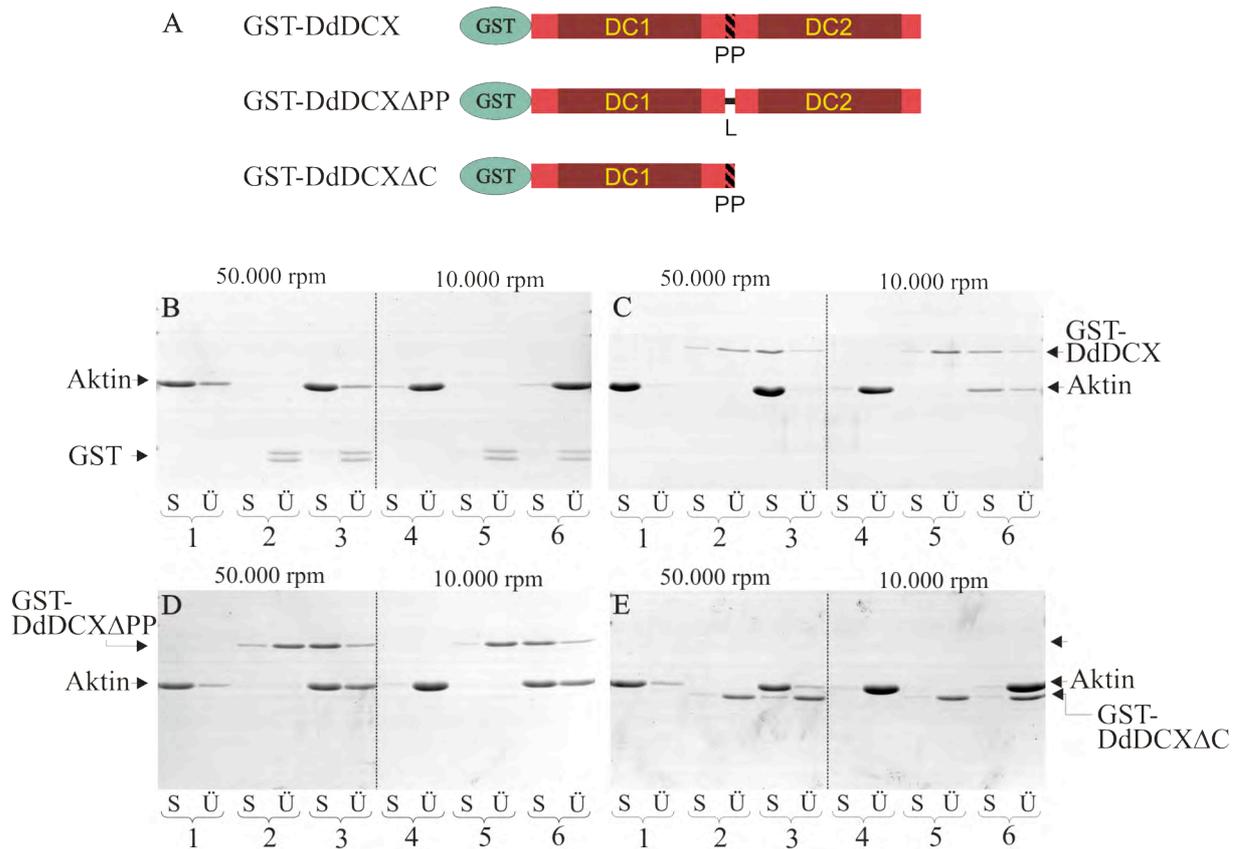
Zusätzlich wurden diese Centrosomen durch Westernblot-Analyse untersucht (Abbildung 17 C). Das bekannte centrosomale Protein  $\gamma$ -Tubulin konnte nur in der Centrosomenprobe, nicht aber in einer cytoplasmatischen Fraktion nachgewiesen werden. Mit dem Antikörper gegen DdDCX ist dagegen keine Bande entsprechender Größe in der Spur mit der centrosomalen Fraktion, wohl aber in der mit der cytoplasmatischen Fraktion zu erkennen.

Aus diesen Experimenten kann geschlossen werden, dass DdDCX kein fester Bestandteil des *Dictyostelium*-Centrosoms ist, sondern nur durch die Bindung an Mikrotubuli, die ihren Ursprung am Centrosom haben, dort lokalisiert ist.

### 3.3.5 DdDCX bindet direkt an Aktin

Für das menschliche Doublecortin ist bekannt, dass es direkt oder indirekt über das Protein Neurabin II an Aktin bindet (Tsukada *et al.*, 2003). Für Neurabin II konnte bei einer Durchsichtung des *Dictyostelium*-Genoms kein homologes Protein gefunden werden.

Um nun festzustellen, ob DdDCX direkt an Aktin bindet, wurden Aktin-Sedimentationsexperimente durchgeführt. Hierfür wurden drei verschiedene GST-Fusionskonstrukte verwendet (Abbildung 18 A). Eines enthielt die kodierende Sequenz von DdDCX in voller Länge (GST-DdDCX), im zweiten war die mittlere, Prolin-reiche Region entfernt (GST-DdDCX $\Delta$ PP) und im dritten fehlte die C-terminale DC-Domäne (GST-DdDCX $\Delta$ C). Als Kontrolle wurde der Ausgangs-GST-Expressionsvektor (pGEX) eingesetzt. Die Proteine wurden in Bakterien exprimiert und über eine Glutathion-Sepharose-Matrix aufgereinigt. Anschließend wurde aus Hühnerbrust gewonnenes Aktin polymerisiert und dabei die GST-Fusionsproteine zugegeben. Als Kontrolle wurden auch je eine Mischung ohne GST-Fusionsprotein und ohne Aktin angesetzt. Nach der Inkubation wurden die Ansätze bei hoher und bei niedriger Drehzahl zentrifugiert. Dadurch kann unterschieden werden, ob das polymerisierte Aktin als einzelne Filamente oder gebündelt vorliegt. Sediment und Überstand wurden voneinander getrennt mit Laemmli-Probenpuffer versetzt, auf einem SDS-Gel aufgetrennt und die Proteine durch eine Coomassie-Blau-Färbung sichtbar gemacht (Abbildung 18 B bis E).



**Abbildung 18: Nachweis der Bindung von GST-DdDCX-Fusionsproteinen an Aktin.** A: Graphische Darstellung der verschiedenen GST-Fusionsproteine. B bis E: Coomassie-gefärbte SDS-Gele von Aktin-Sedimentationsexperimenten mit folgenden GST-Fusionskonstrukten: GST (B), GST-DdDCX (C DdDCX Volllänge), GST-DdDCX $\Delta$ PP (D, DdDCX ohne die Prolin-reiche Region) und GST-DdDCX $\Delta$ C (E, N-Terminus von DdDCX). Als Kontrollen wurden nur Aktin (1 und 4) oder nur GST-Fusionsprotein (2 und 5) in den Ansatz gegeben. Für den eigentlichen Versuch wurden Aktin und GST-Protein gemeinsam eingesetzt (3 und 6). Zentrifugiert wurde bei 50.000 rpm (1 - 3) bzw. 10.000 rpm (4 - 6). Aufgetragen wurden jeweils Sediment (S) und Überstand (Ü).

Aktin alleine verhielt sich bei allen Versuchen wie erwartet. Nach Zentrifugation bei hohen Drehzahlen war fast das gesamte Aktin im Sediment zu finden, es war also nahezu vollständig polymerisiert. Bei geringerer Zentrifugationsgeschwindigkeit ließ sich das Aktin nicht sedimentieren, es lag also nicht in Form von Bündeln vor. Die GST-Fusionsproteine alleine befanden sich immer zum größeren Teil im Überstand.

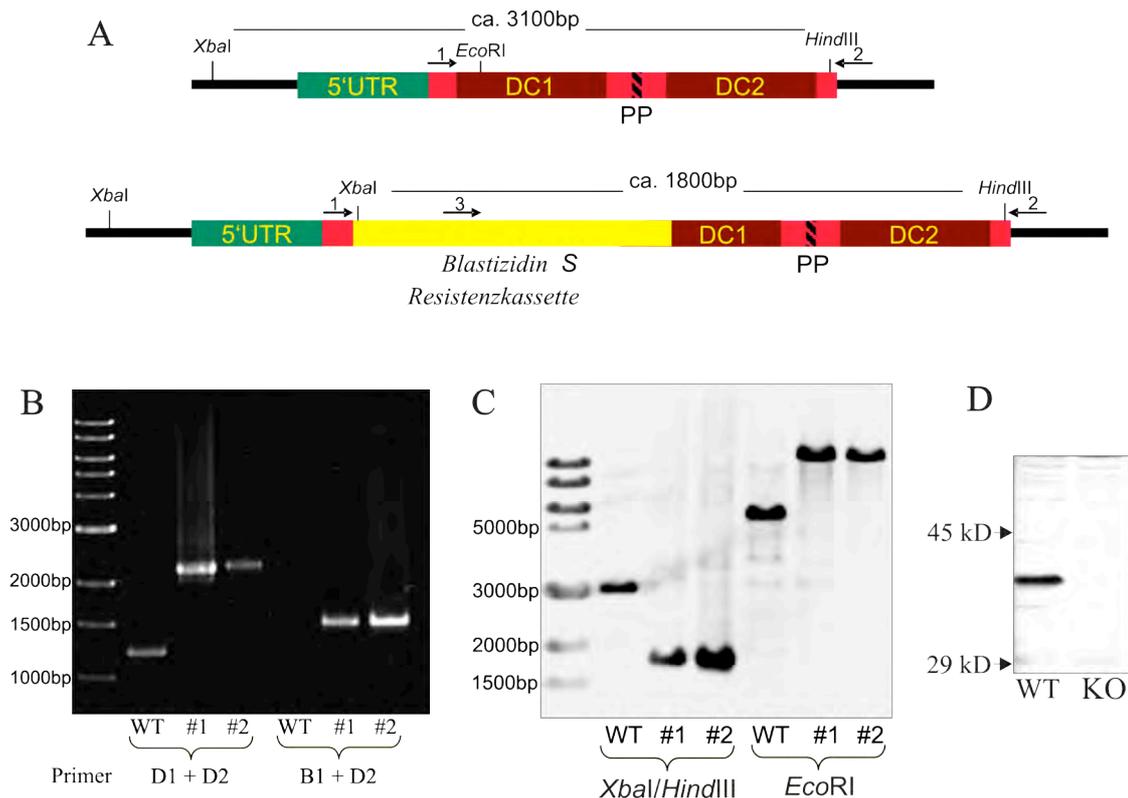
GST alleine konnte auch in Anwesenheit von Aktin nicht im Sediment nachgewiesen werden. Und auch das Verhalten von GST-DdDCX $\Delta$ C wurde durch die Zugabe von Aktin nicht beeinflusst. Beide Proteine binden also nicht an polymerisiertes Aktin.

Andere Eigenschaften wurden für das Volllängen-Protein beobachtet: Bei Zugabe von polymerisiertem Aktin war ein größerer Anteil von GST-DdDCX im Sediment zu finden und dafür ein deutlich geringerer Anteil im Überstand als ohne Aktin. GST-DdDCX bindet also *in vitro* an Aktinfilamente. Zusätzlich bewirkte das Protein, dass sich ein Teil des Aktins auch

bei niedriger Drehzahl abzentrifugieren ließ, es kann also Aktinfilamente bündeln. Ebenso verhielt sich GST-DdDCX $\Delta$ PP. Die Prolin-reiche Mittelregion scheint also keine Bedeutung für die Bindung von DdDCX an Aktin zu haben. Der C-terminale Bereich scheint dagegen essentiell für die Bindung an Aktin zu sein, da die Deletion zu einem Verlust der Bindung führte.

### 3.3.6 Generierung und Untersuchung einer DdDCX-Nullmutante

Zur Analyse der zellulären Funktion von DdDCX wurde eine DdDCX-Nullmutante (DdDCX $\Delta$ ) hergestellt. Dazu wurde ein Vektor konstruiert, in dem zwischen einem ca. 1000 bp langen 5'-Bereich und den Basen 232 bis 921 der für DdDCX kodierenden Sequenz eine Blastizidin-Resistenzkassette eingesetzt wurde (Abbildung 19A). Die DdDCX-Nullmutanten wurden durch zwei verschiedene PCR-Reaktionen identifiziert (Abbildung 19 B). Eine davon basiert auf einer Größenverschiebung durch den Einbau der Kassette und soll



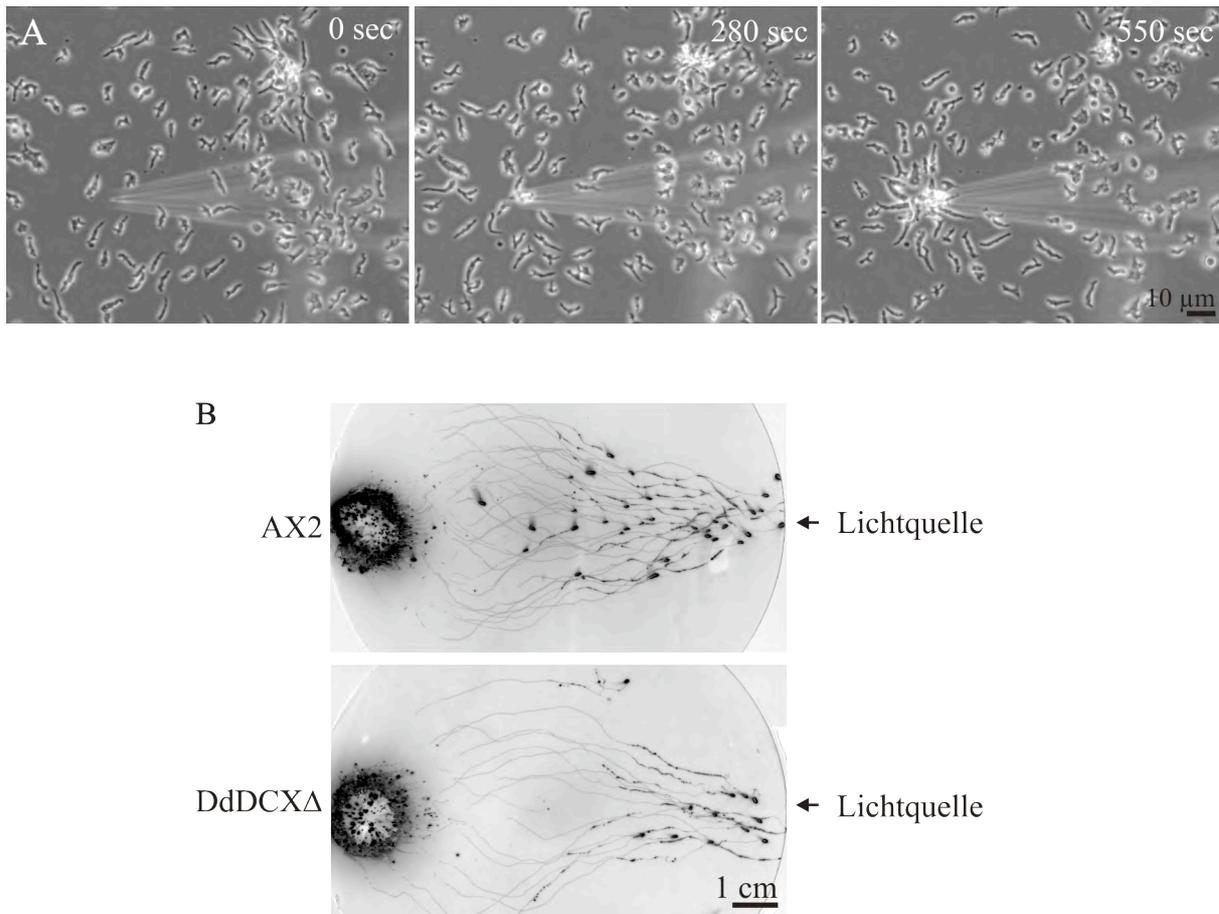
**Abbildung 19: Generierung und Nachweis einer DdDCX-Nullmutante.** A: Für die Generierung einer Nullmutante wurde ein Konstrukt transformiert, welches ca. 1000 bp des 5'-Bereichs von *dcx* enthielt, und bei dem die kodierende Sequenz von DdDCX bis zu der *EcoRI*-Schnittstelle gegen eine Blastizidin-Resistenzkassette ausgetauscht worden war. Die Klone wurden durch zwei verschiedene PCR-Reaktionen (B), eine Southernblot-Analyse (C) und durch Westernblot-Analyse (D) überprüft. Für den PCR-Nachweis wurden die Primer DCX1 (1), DCX-rev (2) und Bsr-rev (3) verwendet. Abgebildet sind jeweils nur einzelne Beispiele, insgesamt wurde der Genotyp von vier unabhängigen Klonen bestätigt. In der Westernblot-Analyse konnte mit dem polyklonalen Antikörper gegen DdDCX in den KO-Stämmen auch nach acht Stunden in Phosphatpuffer kein Protein nachgewiesen werden.

zeigen, dass kein Wildtyp-DdDCX-Gen mehr vorhanden ist. In der zweiten Variante wurden Primer eingesetzt, von denen einer nur außerhalb des transformierten Konstrukts und der zweite in der Kasette bindet. Dadurch kann nur bei einer Nullmutante ein PCR-Produkt entstehen. Anschließend wurde der Genotyp der ausgewählten Klone durch eine Southernblot-Analyse bestätigt (Abbildung 19 C). Zusätzlich wurde auch die Abwesenheit des Proteins in entwickelnden Zellen durch Immunfluoreszenz-Mikroskopie (Abbildung 15) und in einer Westernblot-Analyse (Abbildung 19 D) getestet, wodurch auch die Spezifität des polyclonalen Antikörpers (siehe 3.3.2) nachgewiesen werden konnte. Insgesamt drei unabhängige Nullmutanten wurden für die Untersuchungen verwendet.

Obwohl aufgrund der kaum messbaren Expressionsmenge von DdDCX im Wildtyp ein KO-Phänotyp in vegetativen Zellen unwahrscheinlich war, wurden folgende Tests mit vegetativ wachsenden Zellen von DdDCX $\Delta$  im Vergleich zum Wildtypstamm AX2 durchgeführt: Untersuchung der Zellform und der Anzahl der Zellkerne und Centrosomen pro Zelle, Analyse des Mikrotubuli- und des Aktin-Cytoskeletts mittels Immunfärbung mit Antikörpern gegen Tubulin bzw. Aktin, Wachstumsmessungen auf Platten mit *Klebsiella* und in Flüssigmedium sowie Beobachtung der Zellbewegung. In keinem Fall konnte ein Unterschied zum Wildtyp festgestellt werden. Dies wurde allerdings auch nicht unbedingt erwartet, da die Funktion des Proteins aufgrund des Expressionsmusters in der Entwicklung von *Dictyostelium* liegen sollte.

Um mögliche Defekte von DdDCX $\Delta$  in der Entwicklung aufzuzeigen, wurden Chemotaxis- und Phototaxisexperimente gemacht (Abbildung 20). Hierdurch konnte nachgewiesen werden, dass gehungerte Zellen der Nullmutante auf einen cAMP-Gradienten ebenso wie AX2 Zellen reagieren (Abbildung 20 A). Auch die Slugs, die während der Entwicklung von DdDCX $\Delta$  entstanden, zeigten normales Verhalten und bewegten sich auf eine Lichtquelle zu (Abbildung 20 B)

Änderungen der Entwicklungsgeschwindigkeit eines Stammes im Vergleich zum Wildtyp werden häufig durch den Nachweis von bekannten entwicklungsregulierten Proteinen gezeigt, die als Marker eingesetzt werden. Das Protein „Contact site A“ (CsA) wird in Wildtypzellen nach 6 bis 12 Stunden unter Hungerbedingungen stärker exprimiert (Ochiai *et al.*, 1982). Das Antigen des Antikörpers Mud1 ist erst später in der Entwicklung in größeren Mengen nachweisbar, etwa nach 15 Stunden (Krefft *et al.*, 1984). Eine Westernblot-Analyse von Protein-Entwicklungsreihen (siehe 3.2.2) gefärbt mit einem Antikörper gegen CsA und dem Mud1-Antikörper ließ erkennen, dass diese beiden Marker zeitlich einen ähnlichen Verlauf

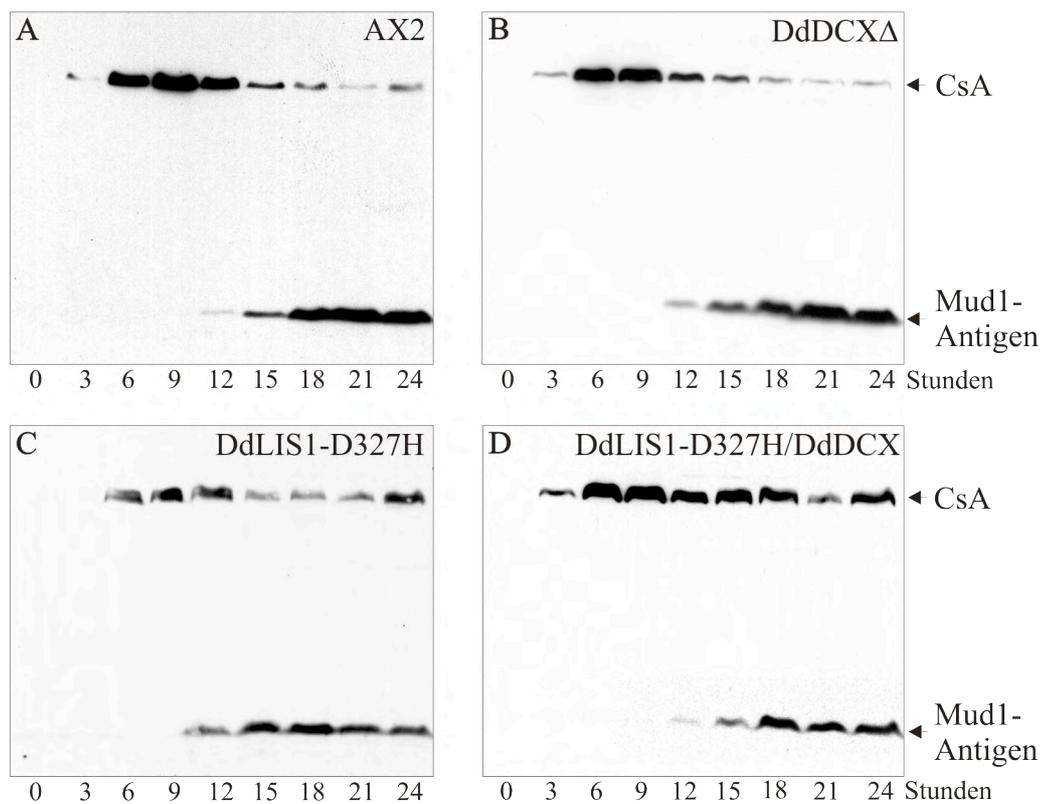


**Abbildung 20: Chemotaxis- und Phototaxisexperimente mit DdDCX $\Delta$ .** A: Chemotaxisexperiment. Die Zellen von DdDCX $\Delta$  reagieren auf die mit cAMP gefüllte Kapillare und bewegen sich darauf zu. Siehe auch Filmsequenz 2 auf CD. B: Phototaxisexperiment. Die Spuren der Slugs wurden nach dem Transfer auf eine Membran durch Immunfärbung mit einem Antikörper gegen Aktin sichtbar gemacht. Die Slugs von DdDCX $\Delta$  bewegten sich vergleichbar mit dem Wildtyp AX2 auf die Lichtquelle zu.

zeigten wie im Wildtyp (Abbildung 21 A und B). Die Entwicklung der DdDCX $\Delta$  Zellen war demnach im Vergleich zu AX2 weder verzögert noch beschleunigt.

Für eine Analyse des gesamten Entwicklungsablaufes wurden Bildsequenzen an einem Stereomikroskop bei geringer Vergrößerung aufgenommen. Die Zellen wurden in verschiedenen Zelldichten auf nährstofffreie Phosphatagarplatten ausgebracht. Auf gleiche Weise wurde mit Wildtypzellen verfahren, welche eine vergleichbare Historie aufwiesen wie die Zellen der Mutante, d. h. ähnlich lange in Kultur waren und die gleiche Zelldichte erreicht hatten. Agarblöcke beider Platten wurden so präpariert, dass die Zellen beider Stämme gleichzeitig beobachtet werden konnten. Auf diese Weise wurde sichergestellt, dass Mutante und Wildtyp unter identischen Bedingungen verglichen werden konnten. So entstanden Aufnahmen, welche die Entwicklung von DdDCX $\Delta$  über einen Zeitraum von 24 Stunden zeigen (Siehe Filmsequenz 5 auf CD). Aber auch in diesem Experiment konnte kein

Unterschied zum Wildtyp gezeigt werden; die Zellen beider Stämme verhielten sich absolut synchron. Auch in Form und Größe der Aggregate war keine Abweichung zu erkennen. Die Deletion von DdDCX erzeugt also weder in vegetativen Zellen noch in der Entwicklung einen erkennbaren Phänotyp. Eine mögliche Erklärung ist, dass das Fehlen von DdDCX in der Mutante durch ein anderes Protein ausgeglichen wird. Dafür kommt an erster Stelle DdLIS1 in Frage, da in menschlichen Zellen die Überexpression von LIS1 den Defekt, den eine Mutation im *dcx*-Gen verursacht, ausgleichen kann (Tanaka *et al.*, 2004). Bevor getestet werden konnte, ob dies auch in *Dictyostelium* der Fall ist, musste erst die Funktion von DdLIS1 in der Entwicklung untersucht werden.

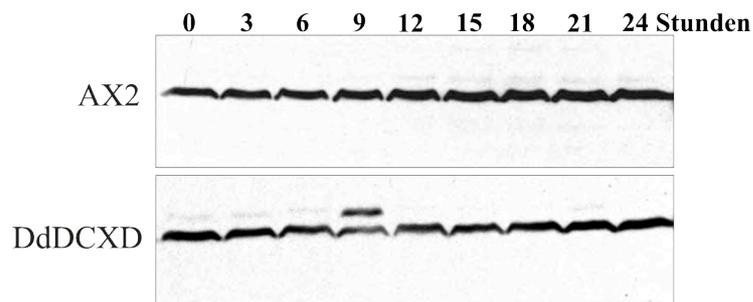


**Abbildung 21: Die Punktmutation in DdLIS1, nicht aber die Deletion von DdDCX bewirkt eine leichte Veränderung in der Expression des Entwicklungsmarkers CsA.** Zellen der Stämme AX2 (A), DdDCXΔ (B), DdLIS1-D327H (C) und DdLIS1-D327H/DdDCXΔ (D) wurden für 0-24 Stunden auf nährstofffreien Phosphatagarplatten kultiviert und für die Präparation von Gesamtzellextrakt verwendet. Dargestellt ist eine Westernblot-Analyse der Entwicklungsreihen mit den primären Antikörpern gegen CsA und das Mud1-Antigen.

### 3.4 Die Rolle von DdLIS1 in der Entwicklung von *Dictyostelium discoideum*

#### 3.4.1 LIS1 ist nicht entwicklungsreguliert

Im Gegensatz zu DdDCX wird DdLIS1 auch in vegetativ wachsenden Zellen exprimiert und kann mit einem spezifischen polyklonalen Antikörper nachgewiesen werden (Rehberg *et al.*, 2005). Um zu untersuchen, ob Schwankungen der Proteinmenge während der Entwicklung von *Dictyostelium* auftreten, wurde eine Westernblot-Analyse durchgeführt. Hierfür wurden die Proteinproben aus der gleichen Wildtyp-Entwicklungsreihe verwendet, die bereits für die Untersuchung von DdDCX generiert worden waren (siehe 3.3.2). Die Immunfärbung mit dem Anti-DdLIS1-Antikörper zeigte in allen Spuren ein vergleichbares Signal bei ca. 47 kD (Abbildung 22). Das Protein ist also während der gesamten Entwicklung in ungefähr gleich bleibender Menge anwesend, es liegt demnach keine Entwicklungsregulation vor.



**Abbildung 22: DdLIS1 ist in der Entwicklung des Wildtyp und der DdDCX-Nullmutante in gleich bleibender Menge nachweisbar.** Westernblot-Analyse von Entwicklungsreihen über 24 Stunden der Stämme AX2 und DdDCX $\Delta$  gefärbt mit dem polyklonalen Antikörper gegen DdLIS1.

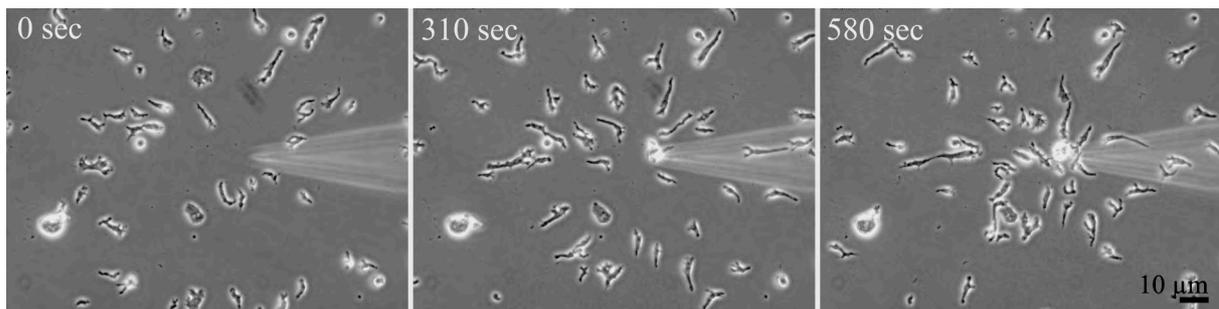
#### 3.4.2 Untersuchungen zur Funktion von DdLIS1 in der Entwicklung

Um die Funktion von DdLIS1 zu erforschen, war in einer früheren Arbeit versucht worden, eine Nullmutante zu erzeugen. Nachdem dies nicht gelungen war, wurde eine Punktmutation in das DdLIS1-Gen eingeführt (Rehberg *et al.*, 2005). Der Austausch der Aminosäure Asparaginsäure in Position 327 gegen Histidin entspricht der menschlichen Mutation D317H und führt dort zu einer leichten Form der Lissenzephalie (Caspi *et al.*, 2003; Sapir *et al.*, 1999b). Es wird vermutet, dass dieser Aminosäureaustausch teilweise zu einer Fehlfaltung der Proteinmoleküle führt, und es so nur zu einem partiellen Ausfall des Proteins kommt. Da es sich aber bei *Dictyostelium* um einen haploiden Organismus handelt, war hier mit einem stärkeren Effekt als bei Säugerzellen zu rechnen.

Das veränderte Protein liegt in den Zellen in etwa in gleicher Menge wie das Wildtyp-DdLIS1 in AX2-Zellen vor. Auch die Lokalisation des Proteins DdLIS1 wird durch die Punktmutation nicht verändert, es lässt sich mit Hilfe des Antikörpers  $\alpha$ -DdLIS1 an Mikrotubuli und am Centrosom nachweisen.

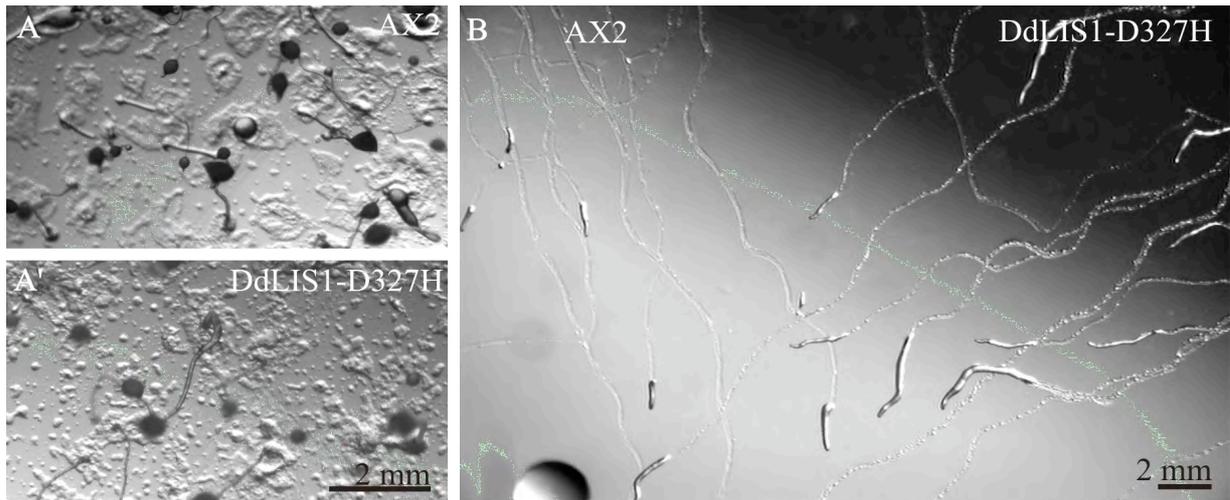
In der vegetativen Phase weisen die DdLIS1-D327H-Zellen eine starke Veränderung des Cytoskeletts auf (Abbildung 4) (Rehberg *et al.*, 2005). Dennoch konnte keine deutliche Beeinträchtigung der Zellbewegung unter vegetativen Bedingungen festgestellt werden. Auch war es möglich, den Stamm in Form von Sporen zu konservieren. Dies war ein erster Hinweis darauf, dass die Zellen in der Lage sind, sich unter Hungerbedingungen zu entwickeln.

Um dies genauer zu untersuchen, wurde als erstes ein Chemotaxisversuch durchgeführt. Hierbei konnte beobachtet werden, dass die meisten Zellen sich eindeutig auf die mit cAMP gefüllte Kapillare zubewegten (Abbildung 23, Filmsequenz 3 auf CD). Allerdings gab es einige Zellen, die keine Polarisierung zeigten, flach ausgestreckt auf dem Deckglas verblieben und sich nicht der cAMP Quelle annäherten.



**Abbildung 23: Die Punktmutation in DdLIS1 bewirkt keine Beeinträchtigung der cAMP-Wahrnehmung.** Zellen des Stammes DdLIS1-D327H bewegen sich in einem Chemotaxisexperiment auf eine mit cAMP-gefüllte Kapillare zu. Siehe auch Filmsequenz 3 auf CD.

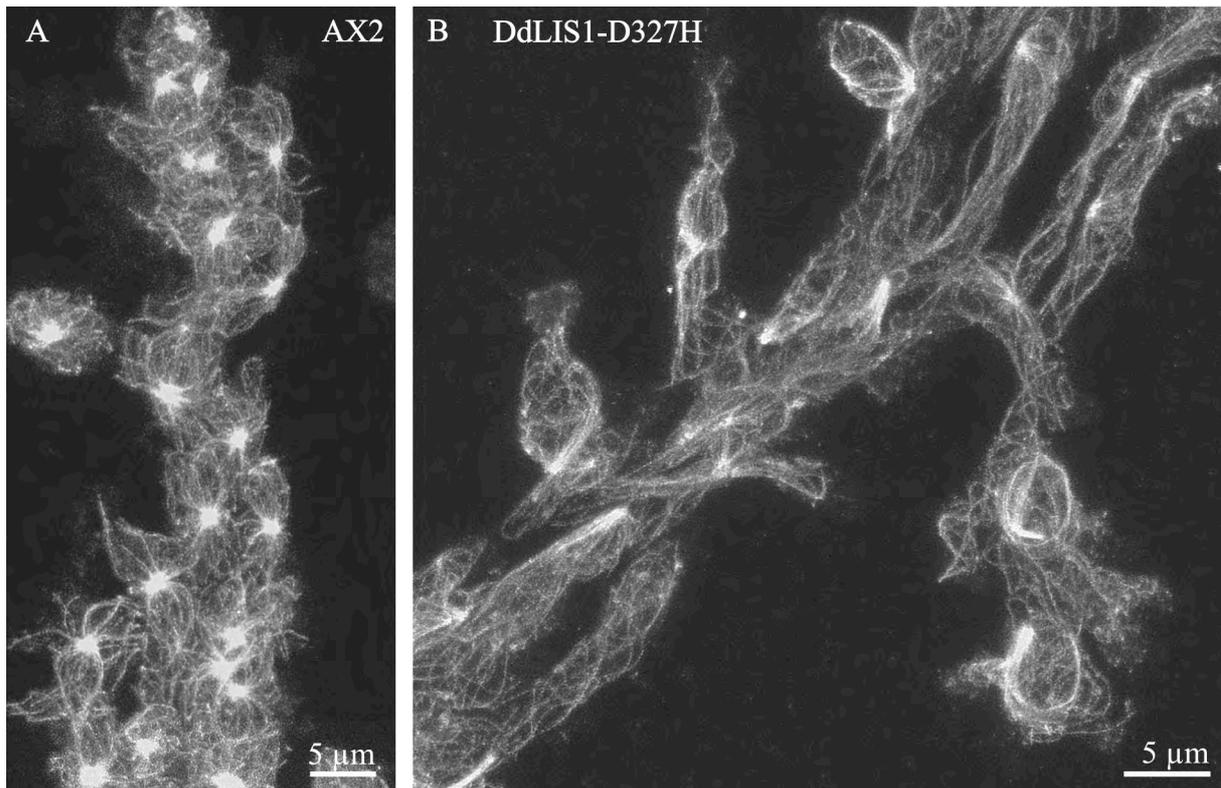
Als nächstes wurden wie für DdDCXA beschrieben stereomikroskopische Bildsequenzen über 24 Stunden zusammen mit dem Wildtypstamm AX2 aufgenommen (siehe 3.3.6). Es zeigte sich, dass die Punktmutation zu keiner deutlich sichtbaren Veränderung des Entwicklungsablaufes führt und auch die Größe und die Beweglichkeit der Zellaggregate nicht beeinflusst ist (Siehe Filmsequenz 6 auf CD). Allerdings blieben mehr einzelne Zellen als beim Wildtyp auf der Platte zurück, die sich nicht an der Entwicklung beteiligten (Abbildung 24 A). Ähnliches konnte auch bei den Spuren, die von den Slugs hinterlassen wurden, beobachtet werden. Die Slugs von DdLIS1-D327H schienen bei der Fortbewegung mehr Zellen zu verlieren als Wildtypslugs (Abbildung 24 B). Möglicherweise handelte sich es hierbei um Zellen, die besonders starke Störungen aufwiesen und daher in ihrer Beweglichkeit eingeschränkt waren.



**Abbildung 24: In DdLIS1-D327H-Zellen bleiben bei Entwicklung und bei der Slugbewegung mehr Zellen zurück.** Stereomikroskopische Aufnahmen von Zellen und Aggregaten von AX2 (A) und DdLIS1-D327H (A') nach 24 Stunden auf Phosphatagarplatten und von Slugspuren der Stämme AX2 und DdLIS1-D327H (B).

Daher sollte getestet werden, ob DdLIS1-D327H-Zellen mit einem stark veränderten Mikrotubuli-Cytoskelett normal an der Bildung von Aggregaten beteiligt sind, oder ob sie einzeln zurückbleiben. Hierfür ließ man DdLIS1-D327H-Zellen in Phosphatpuffer auf Deckgläsern hungern. Die entstandenen Zellströme wurden fixiert (siehe 3.6.2). Nach einer Immunfluoreszenzfärbung der Mikrotubuli wurden konfokale Aufnahmen von Zellen innerhalb und außerhalb der Aggregate gemacht (Abbildung 25). Es zeigte sich, dass sich zahlreiche Zellen mit gestörtem Mikrotubuli-Cytoskelett abseits der Zellströme befanden, aber auch etliche in die Ströme integriert waren.

Zusätzlich wurde auch wieder die Expression der Markerproteine CsA und des Mud1-Antigens in den DdLIS1-D327H-Zellen getestet (Abbildung 21). Auch hier konnte bezüglich des Beginns der Expression kaum eine Abweichung von Wildtyp AX2 festgestellt werden. Allerdings nahm die Menge an CsA in den späteren Proben nicht wie normal ab. Es könnte sich hierbei um die auf den Platten beobachteten Einzelzellen handeln, die ihre Entwicklung nicht bis zum Ende durchlaufen hatten, sondern im Stadium der CsA-Expression verblieben waren. Diese Versuche zeigten, dass der Stamm DdLIS1-D327H im Prinzip in der Lage ist, sich annähernd normal zu entwickeln. Allerdings scheinen einzelne Zellen, vermutlich je nach Stärke ihres Phänotyps, Entwicklungsdefekte zu haben. Möglicherweise ist DdLIS1 also durchaus notwendig für die Entwicklung von *Dictyostelium*, es reicht aber vermutlich eine geringe Menge an funktionsfähigen Molekülen aus, um diese Aufgaben zu erfüllen.

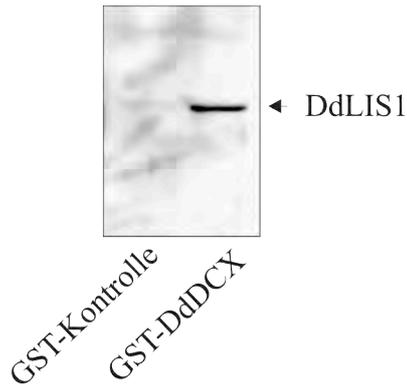


**Abbildung 25:** Zellen von DdLIS1-D327H mit stark gestörtem Mikrotubuli-Cytoskelett sind in Aggregationsströme integriert. Z-Projektion von konfokalen Aufnahmen von Zellströmen der Stämme AX2 (A) und DdLIS1-D327H (B) gefärbt mit einem Antikörper gegen Tubulin.

### 3.5 Zusammenspiel von DdDCX und DdLIS1

#### 3.5.1 DdDCX interagiert mit DdLIS1

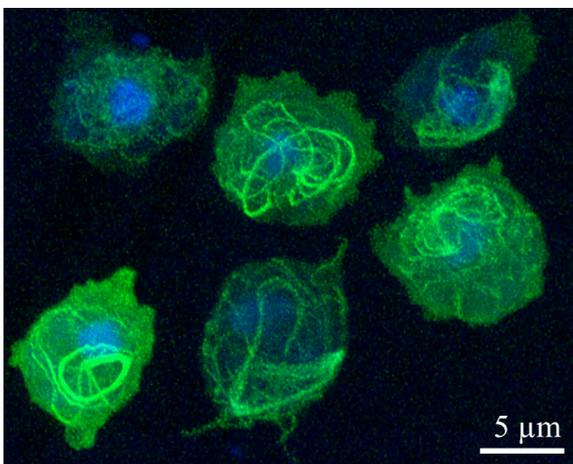
Um die bereits für das Säugersystem beschriebene Interaktion zwischen LIS1 und DCX auch in *Dictyostelium* nachzuweisen, wurde ein „GST-Pulldown“-Experiment durchgeführt (Caspi *et al.*, 2000). Hierfür wurde ein GST-DdDCX-Fusionsprotein und als Kontrolle unfusioniertes GST in Bakterien exprimiert und an entsprechendes Säulenmaterial gebunden. Das GST- bzw. GST-DdDCX-Harz wurde anschließend mit cytoplasmatischem Extrakt aus Wildtypzellen inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen wurden die anhaftenden Proteine durch Aufkochen mit SDS-Auftragspuffer vom Säulenmaterial abgelöst und auf einem SDS-Gel aufgetrennt. Es folgte der Nachweis von DdLIS1 mittels Immunfärbung eines Westernblots (Abbildung 26). In der Spur mit GST-DCX war eine Bande der richtigen Größe (ca. 62 kD) zu erkennen, die in der GST-Kontrolle nicht auftrat. Es konnte also eine spezifische Bindung von DdLIS1 an DdDCX nachgewiesen werden. Da der Versuch mit cytoplasmatischem Extrakt durchgeführt worden war, kann allerdings nicht ausgeschlossen werden, dass noch andere Proteine für die Interaktion notwendig sind.



**Abbildung 26: DdLIS1 interagiert mit GST-DdDCX.** Bakteriell exprimiertes GST und GST-DdDCX wurde an Glutathion-Sepharose-Harz gebunden und mit *Dictyostelium*-Zellextrakt inkubiert. Abgebildet ist eine Westernblot-Analyse gefärbt, mit dem Antikörper gegen DdLIS1.

### 3.5.2 Überexpression von GFP-DdDCX kompensiert den Phänotyp von DdLIS1-D327H nicht

In Säugerzellen können LIS1 und DCX einander komplementieren und die Funktionen des anderen Proteins übernehmen. Wird eines der beiden Proteine überexprimiert, so kann dies das Fehlen des jeweils anderen ausgleichen und den Phänotyp aufheben (Tanaka *et al.*, 2004). Um zu testen, ob DdDCX in der Lage ist, die Funktion von DdLIS1 in der vegetativen Wachstumsphase von *Dictyostelium* zu übernehmen, wurde das GFP-DdDCX-Konstrukt in die DdLIS1-D327H-Zellen eingebracht. Drei unabhängige Transformanten wurden bezüglich des Mikrotubuli-Cytoskeletts untersucht. Das GFP-Fusionsprotein lokalisierte wie in Wildtypzellen an den Mikrotubuli. Es war daher keine weitere Färbung der Zellen notwendig um zu erkennen, dass das Mikrotubuli-Cytoskelett die gleichen Störungen aufwies wie in den untransformierten DdLIS1-D327H-Zellen (Abbildung 27). Die Überexpression von DdDCX in Form eines GFP-Fusionsproteins ist also nicht ausreichend, um den Phänotyp der DdLIS1-Punktmutation zu schwächen oder gar aufzuheben (vergleiche Abbildung 4 A und B).



**Abbildung 27: Zellen mit der DdLIS1-Punktmutation zeigen auch bei Expression von DdDCX-GFP ein gestörtes Mikrotubuli-Cytoskelett.** Immunfluoreszenz-Mikroskopie von DdLIS1-D327H-Zellen, die zusätzlich GFP-DdDCX (grün) exprimieren. Der Zellkern wurde mit TOPRO3 gefärbt (blau).

### 3.5.3 DdLIS1 wird in DdDCXΔ nicht verstärkt exprimiert

Auch wenn GFP-DdDCX nicht das Protein DdLIS1 in vegetativen Zellen nicht ersetzt, wäre es dennoch möglich, dass DdLIS1 in der DdDCX-Deletionsmutante die Aufgaben von DdDCX übernimmt und daher kein Phänotyp zu beobachten war. Um zu testen, ob *Dictyostelium* zu diesem Zweck selber für eine Überexpression sorgt, wurden erneut die Proteinproben der Entwicklungsreihe mittels Westernblot-Analyse untersucht und der DdLIS1-Antikörper verwendet (Abbildung 22). Es zeigte sich, dass DdLIS1 in den DdDCXΔ-Zellen in etwa in der gleichen Menge vorliegt wie in den Wildtypzellen und sich die Menge auch während der Entwicklung nicht verändert. *Dictyostelium* reagiert auf den Ausfall von DdDCX also nicht mit einer verstärkten Expression von DdLIS1. Es wäre aber möglich, dass die normale Menge des Proteins ausreicht um die Funktion von DdDCX zu übernehmen. Dies konnte nur getestet werden, indem eine Mutante erzeugt wurde, die sowohl die Punktmutation im DdLIS1-Gen, wie auch die DdDCX-Deletion trug.

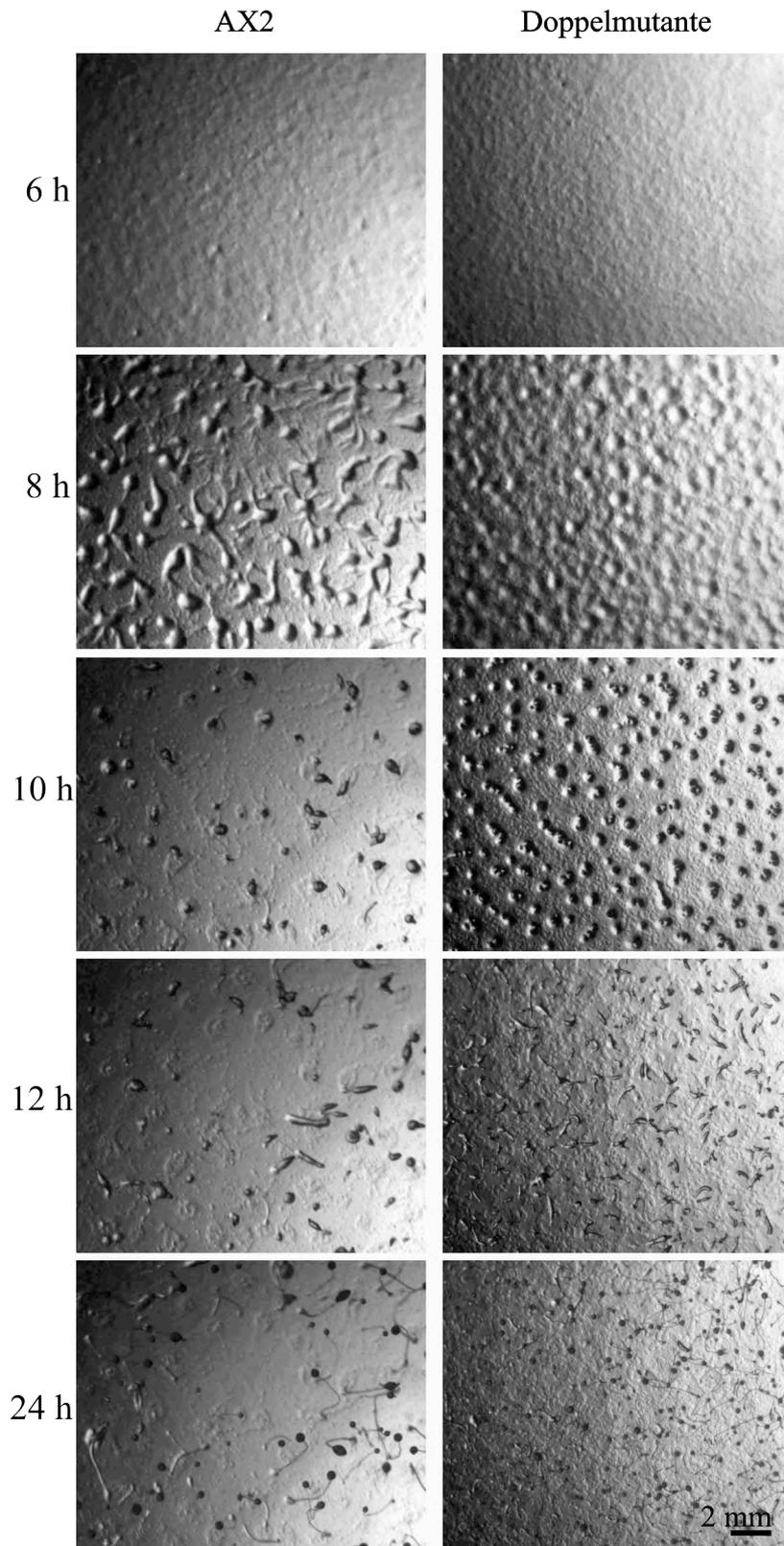
### 3.5.4 Herstellung einer Doppelmutante

Für die Selektion auf homologe Rekombination eignet sich in *Dictyostelium* am besten die Blastizidin-Resistenzkassette. Diese wurde daher sowohl zur Generierung der DdDCXΔ-Mutante, wie auch für die Einführung der Punktmutation in das DdLIS1-Gen verwendet. Um nun den erneuten Einsatz der Blastizidin-Resistenz für eine zweite Transformation zu ermöglichen, wurde das „Cre-loxP“-System (Faix *et al.*, 2004) verwendet. Die in der DdLIS1-Punktmutante eingesetzte Kassette ist flankiert von den sogenannten loxP-Bereichen. Diese werden von der Cre-Rekombinase, welche durch Transformation des Plasmides pDEX-NLS-cre bereitgestellt wird, erkannt. Das Enzym entfernt dann die zwischen den beiden loxP-Bereichen befindliche Sequenz, in diesem Fall die Kassette. Auf diese Weise wurde eine nicht mehr blastizidinresistente DdLIS1-Punktmutante generiert. Diese wurde mit dem DdDCXΔ-Konstrukt transformiert, und Klone durch die PCR, wie in 3.3.5 beschrieben, identifiziert. Die folgenden Untersuchungen wurden mit drei unabhängigen Klonen durchgeführt.

### 3.5.5 Charakterisierung des Phänotyps der Doppelmutante

Als erstes wurde kontrolliert, ob sich die Zellen des Stammes DdLIS1-D327H/DdDCXΔ in der vegetativen Phase genauso verhalten wie die Zellen, die nur die Punktmutation im DdLIS1-Gen tragen. Dies wäre zu erwarten, da das DdDCX-Protein erst in der Entwicklung exprimiert wird. Hierfür wurden durch Immunfluoreszenz-Mikroskopie das Mikrotubuli- und das Aktin-Cytoskelett überprüft. Es konnten keine Unterschiede zu DdLIS1-D327H gefunden werden.

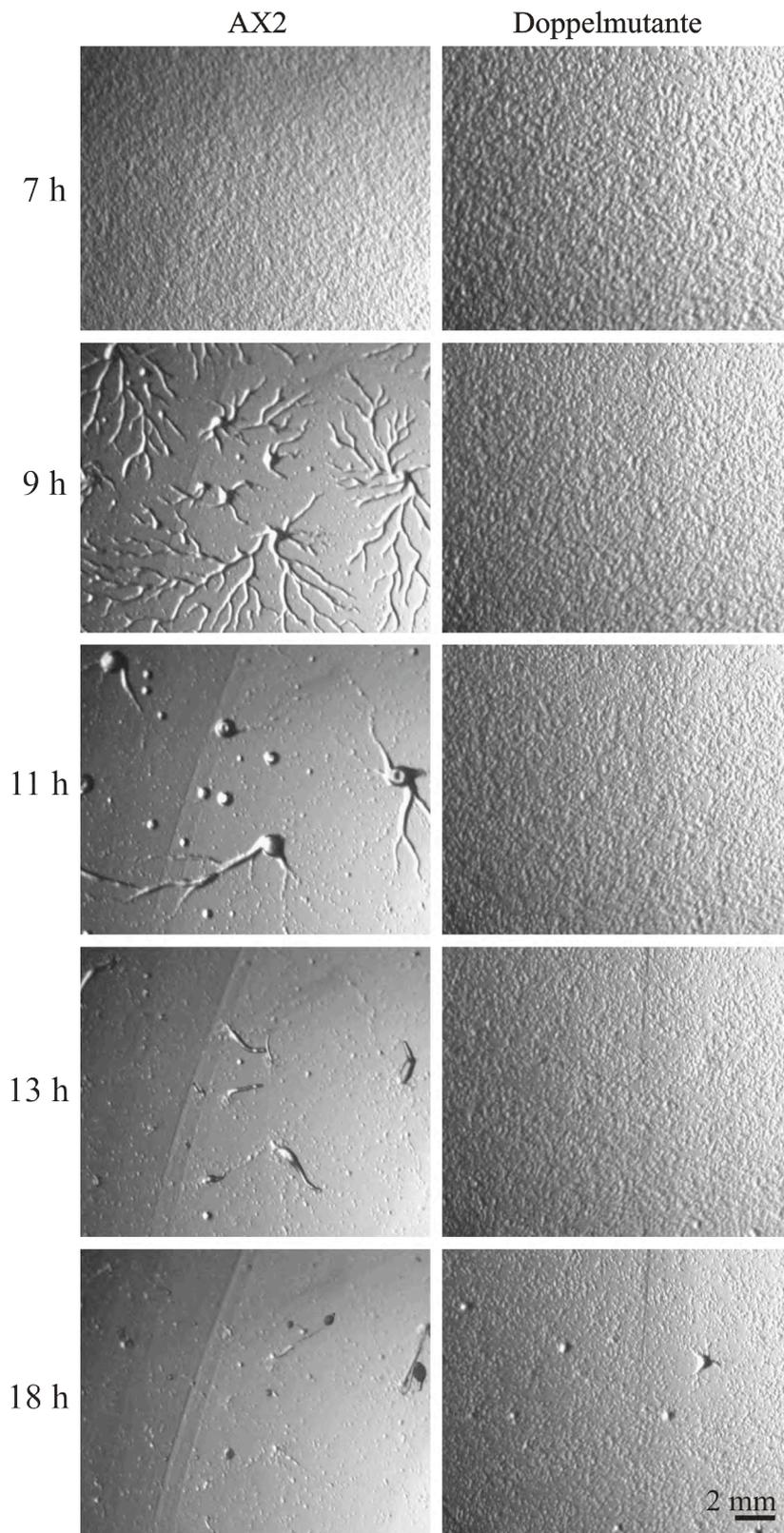
Auch für die Doppelmutante wurde die Expression der beiden Entwicklungsmarker überprüft (Abbildung 21). Es zeigte sich kein Unterschied zu DdLIS1-D327H. Wie in der Einzelmutante setzte die Expression normal ein, es bleibt dann aber eine im Vergleich zum Wildtyp bzw. zu DdDCXA etwa dreifach größere Menge an CsA bis zum Ende der Entwicklung erhalten.



**Abbildung 28: In der Entwicklung bildet die Doppelmutante bei hoher Zelldichte kleinere Aggregate als der Wildtyp.**

Die Zellen von Wildtyp und DdLIS1-D327H/DdDCXA wurden mit einer Dichte von  $5 \times 10^5$  Zellen pro  $\text{cm}^2$  auf Phosphatagarplatten verteilt und die Entwicklung beider Stämme gleichzeitig unter einem Stereomikroskop beobachtet. Die Zeitangaben beziehen sich auf die Dauer seit dem Transfer auf die Agarplatten.

Siehe auch Filmsequenz 7 auf CD.



**Abbildung 29: Bei geringer Zelldichte ist die Entwicklung der Doppelmutante gestört.**

Die Zellen von AX2 und DdLIS1-D327H/DdDCX $\Delta$  wurden mit einer Dichte von  $1 \times 10^5$  Zellen pro  $\text{cm}^2$  auf Phosphatagarplatten verteilt und die Entwicklung beider Stämme gleichzeitig unter einem Stereomikroskop beobachtet. Die Zeitangaben beziehen sich auf die Dauer seit dem Transfer auf die Agarplatten.

Siehe auch Filmsequenz 8 auf CD

Dass die Zellen in ihrer Entwicklung nicht verzögert sind, zeigte sich auch bei den 24-Stunden-Aufnahmen am Binokular (Abbildung 28, Filmsequenz 7 auf CD). Allerdings konnte dennoch ein deutlicher Unterschied zum Wildtyp beobachtet werden: Die Aggregate,

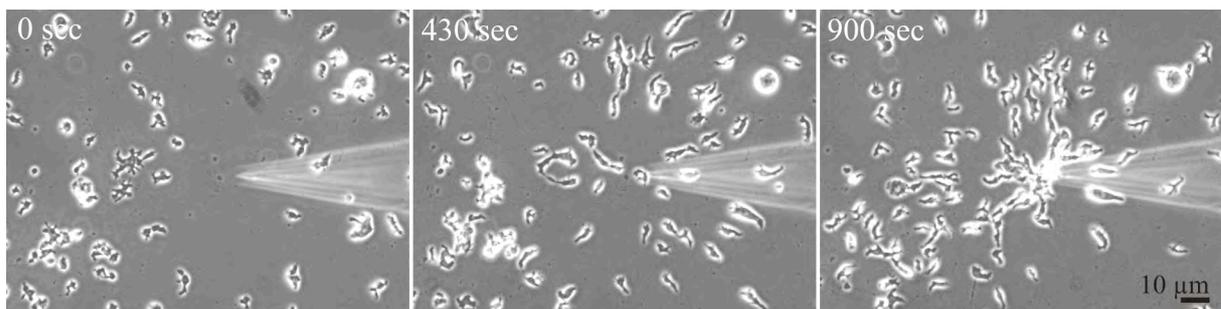
die aus Zellen des Stammes DdLIS1-D327H/DdDCX $\Delta$  entstanden, waren deutlich kleiner als normal. Es wurden viel kleinere Zellhaufen gebildet, aus denen sehr kleine Slugs entstanden, die aber dennoch sehr mobil waren. Zum Abschluss der Entwicklung war der Agar mit vielen Fruchtkörpern besiedelt, die nur etwa ein Drittel der Wildtypgröße erreicht hatten.

Dies deutete an, dass die Zellen Probleme bei der Aggregation haben und deshalb weniger Zellen zu einem Zentrum zusammenlaufen. Um dies näher zu untersuchen, wurden weitere Aufnahmen gemacht, diesmal aber nur ein fünftel der ursprünglichen Zellmenge auf einer Platte verteilt (Abbildung 29, Filmsequenz 8 auf CD). Für den Wildtyp konnten bei dieser geringen Zellzahl sehr deutliche Zellströme beobachtet werden und es wanderten für ein Aggregat die Zellen aus einem Bereich von bis zu 1 cm Durchmesser zusammen.

Die Zellen des Stammes DdLIS1-D327H/DdDCX $\Delta$  dagegen bildeten keine Zellströme, und es wurden nur sehr vereinzelt Aggregate sichtbar. Bei geringerer Zelldichte ist die Doppelmutante also nicht mehr in der Lage, sich normal zu entwickeln.

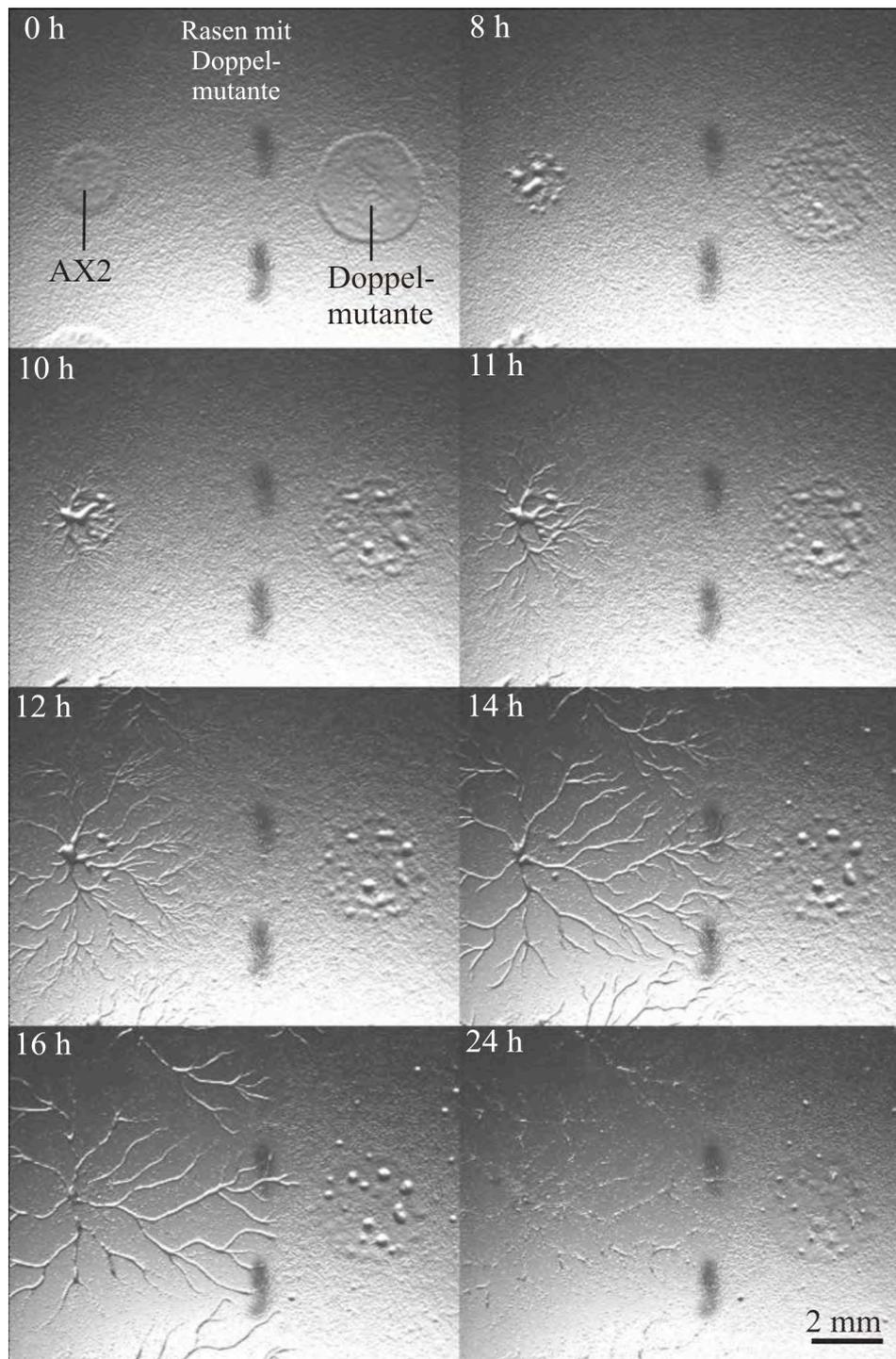
### 3.5.6 Reaktion der Doppelmutante auf externe Signale

Um den Phänotyp der Doppelmutante besser zu definieren, wurde überprüft, ob die Zellen in der Lage sind, auf externe Signale zu reagieren. Hierfür wurden als erstes Experimente zur Chemotaxis durchgeführt. Es zeigte sich, dass die Zellen normal auf cAMP reagieren und auf die Kapillare zulaufen (Abbildung 30, Filmsequenz 4 auf CD).



**Abbildung 30:** Die Zellen der Doppelmutante bewegen sich auf eine mit cAMP gefüllte Kapillare zu. Chemotaxisexperiment mit Zellen des Stammes DdLIS1-D327H/DdDCX $\Delta$ . Siehe auch Filmsequenz 4 auf CD.

In einem weiteren Versuch wurden Zellen von DdLIS1-D327H/DdDCX $\Delta$  in geringer Zelldichte auf einer Phosphatagarplatte verteilt. Auf die Zellschicht wurde eine kleine Menge dicht gewachsener AX2-Kultur und als Kontrolle einer Kultur der Doppelmutante aufgetropft. Die Entwicklung wurde dann für ca. 30 Stunden unter dem Binokular beobachtet (Abbildung 31, Filmsequenz 9 auf CD).



**Abbildung 31: Durch externe Signale ist die Doppelmutante in der Lage, Aggregationsströme zu bilden.** Wildtypzellen und Zellen der Doppelmutante wurden auf eine Phosphatagarplatte getropft, auf die zuvor Zellen der Doppelmutante in niedriger Zelldichte ( $1 \times 10^5$  Zellen pro  $\text{cm}^2$ ) verteilt worden waren. Die Zeitangaben beziehen sich auf die Dauer seit dem Transfer auf die Agarplatten. Siehe auch Filmsequenz 9 auf CD.

Als erstes konnte man nur sehen, wie die Wildtypzellen aggregieren (8 h). Dann entstanden, zunächst dicht um den Tropfen, Zellströme, die aus den umliegenden Mutantenzellen gebildet wurden (10 h) und sich dann immer weiter von dem Tropfen entfernten. Letztendlich entwickelten sich die Mutantenzellen in einem Bereich von ca. 5 mm um den Wildtyp. Um den Tropfen mit der Doppelmutante zeigten sich keine Zellströme.

Die Zellen der Doppelmutante sind also in der Lage, externe Signale wahrzunehmen und sich gerichtet darauf hinzubewegen. Zusätzlich scheinen sie die Signale auch weiterzugeben, denn nur so konnte es zur Bildung von Zellströmen kommen, die sich immer weiter von der ursprünglichen Signalquelle entfernt fortsetzte.

### **3.6 Die Rolle von Mikrotubuli in der Entwicklung von *Dictyostelium discoideum***

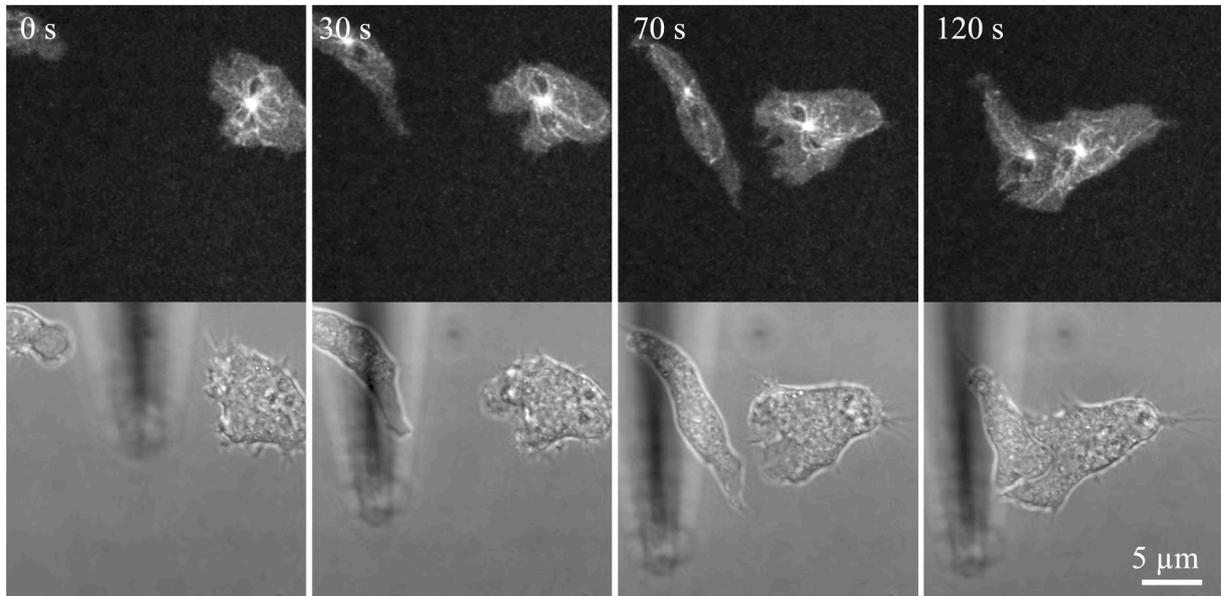
#### **3.6.1 Einfluss von Nocodazol auf Chemotaxis**

Der erste sichtbare Schritt der Entwicklung von *Dictyostelium* besteht darin, dass die Zellen durch cAMP miteinander kommunizieren und aggregieren. Die Fähigkeit, das Signal wahrzunehmen und sich auf die Quelle hin zu bewegen, kann in Chemotaxisexperimenten überprüft werden.

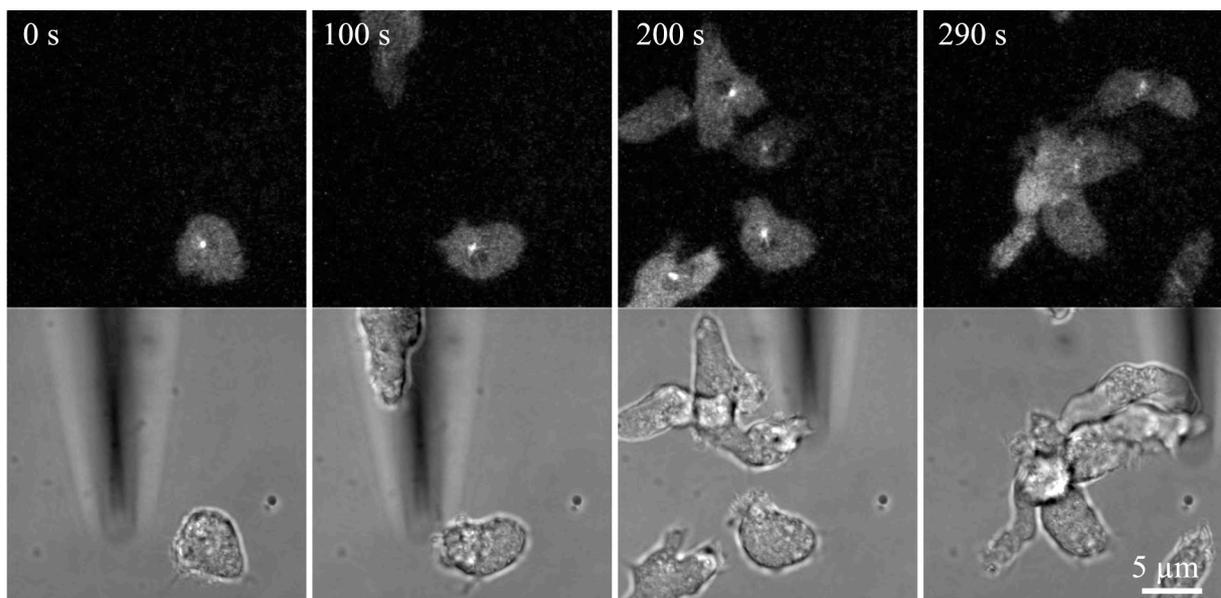
Um zu testen, wie wichtig Mikrotubuli in dieser Phase der Entwicklung sind, wurden GFP-Tubulin exprimierende Zellen drei Stunden nach dem Überführen in Phosphatpuffer und damit drei Stunden vor dem eigentlichen Chemotaxisversuch mit der Mikrotubuli-depolymerisierenden Chemikalie Nocodazol behandelt. Es wurden dann einzelne Zellen, die unter dem Mikroskop nur noch besonders kurze Mikrotubuli aufwiesen, beobachtet.

Es zeigte sich, dass sogar Zellen, die so gut wie keine Mikrotubuli mehr hatten, normal reagierten (Abbildung 32). Die Form der Zellen war zwar etwas weniger langgestreckt, dennoch bewegten sich die Zellen vergleichbar mit Wildtypzellen auf die Kapillare zu. Die starke Polarisierung ist also nicht essentiell für diese gerichtete Bewegung und die Mobilität scheint unabhängig von Mikrotubuli möglich zu sein.

## A Kontrolle



## B Behandlung mit Nocodazol

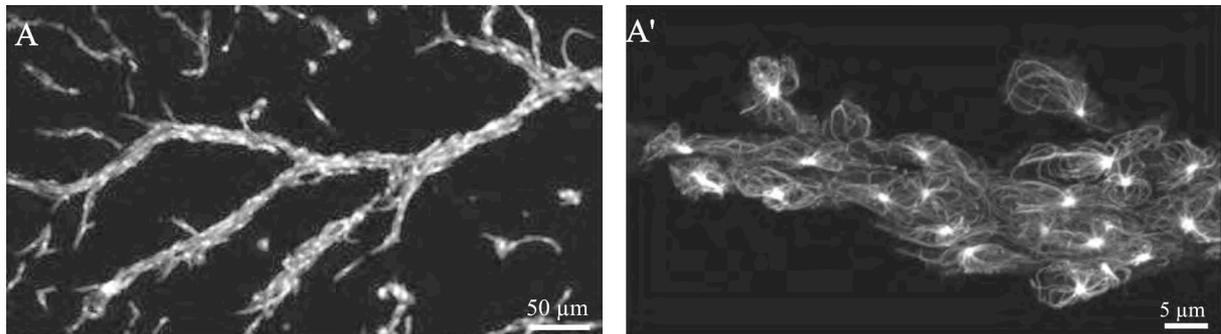


**Abbildung 32: Mikrotubuli sind nicht essentiell für Chemotaxis.** GFP-Tubulin exprimierende Zellen wurden für 6 Stunden in Phosphatpuffer geschüttelt. In den letzten 3 Stunden wurde entweder 10 µg/ml Nocodazol oder als Kontrolle die entsprechende Menge DMSO zugesetzt. In einem Chemotaxisexperiment wurde das Verhalten der Zellen im Phasenkontrast beobachtet (jeweils untere Reihe) und der Zustand der Mikrotubuli durch Fluoreszenz-Mikroskopie verfolgt (jeweils obere Reihe). Siehe auch Filmsequenzen 10 (Kontrolle) und 11 (Nocodazol).

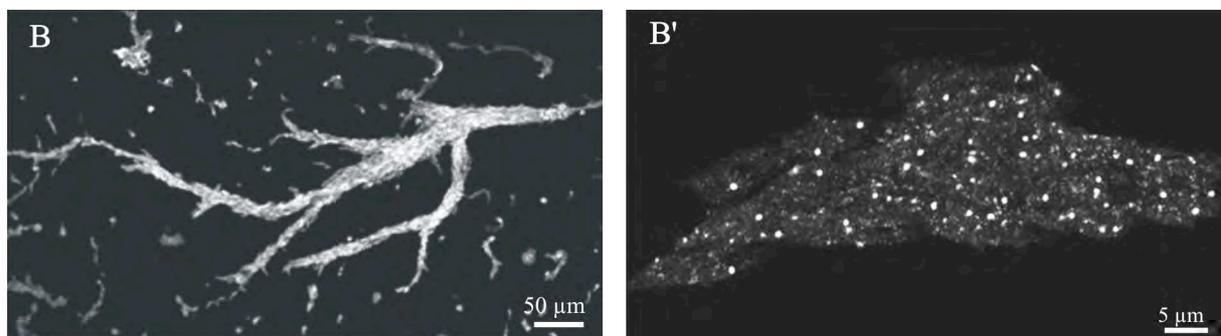
### 3.6.2 Einfluss von Nocodazol auf die Bildung von Aggregationsströmen

Im nächsten Schritt der Entwicklung wandern die Zellen nicht mehr nur einzeln auf Signale zu, sondern finden sich zu Strömen zusammen. Auch hier war bislang nicht untersucht, ob dieser Prozess ein funktionierendes Mikrotubuli-Cytoskelett benötigt. Da Zellströme auf Agarplatten mikroskopisch schwierig zu untersuchen sind, wurden die Versuche auf Deckgläsern unter Phosphatpuffer durchgeführt. Hierfür wurde je ein Deckglas in eine Vertiefung einer 24-Loch-Platte gelegt. Darauf wurde eine Zellsuspension gegeben, aus der sich die Zellen auf die Deckglasoberfläche absetzen sollten. Die Menge an Zellen pro Deckglas entsprach der Dichte auf den Agarplatten für die Entwicklungsbeobachtung mit geringer Zelldichte. Nach einer kurzen Periode, in der sich die Zellen auf den Deckgläsern absetzen konnten, wurde dann der Überstand abgenommen und durch Nocodazol-haltigen, bzw. als Kontrolle Nocodazol-freien Puffer ersetzt. Nach einer Inkubation von ca. 12 Stunden konnten in allen Löchern Zellströme beobachtet werden (Abbildung 33). Das Nocodazol verhinderte also nicht, dass die Zellen auf diese Weise miteinander interagieren.

#### Kontrolle



#### Behandlung mit 2 µg/ml Nocodazol



**Abbildung 33: Für die Bildung von Zellströmen sind Mikrotubuli nicht essentiell.** Z-Projektion konfokaler Aufnahmen von Aggregationsströme gebildet aus Kontrollzellen (A und A') und Zellen, die mit 2 µg/ml Nocodazol behandelt worden waren (B und B'). Die Immunfluoreszenzpräparate wurden mit einem Antikörper gegen Tubulin gefärbt.

Es musste aber kontrolliert werden, ob die Nocodazolbehandlung tatsächlich zur vollständigen Depolymerisation der Mikrotubuli geführt hatte. Hierfür wurden die Zellströme auf den Deckgläsern fixiert und mit einem gegen Tubulin gerichteten Antikörper gefärbt. Für die Fixierung der Zellströme war die Glutaraldehyd-Fixierung am besten geeignet, da dadurch die Zellen sehr gut sowohl an das Deckglas als auch aneinander fixiert werden. Bei der Verwendung von schwächeren Fixierungen gingen bei der Immunfärbung deutlich mehr Zellen und Aggregate verloren. Unter dem konfokalen Mikroskop zeigte sich, dass die Kontrollzellen in den Zellströmen ein vollständiges Mikrotubuli-Cytoskelett aufwiesen. Die mit Nocodazol behandelten Zellen dagegen enthielten fast keine Mikrotubuli mehr, nur manchmal waren noch ganz kurze Stümpfe am Centrosom sichtbar (Abbildung 33 B').

*Dictyostelium*-Zellen sind also in der Lage, sich in der Abwesenheit von Mikrotubuli zumindest bis zur Aggregation zu entwickeln. Sie können in Anwesenheit einer Mikrotubulidepolymerisierenden Droge Signale wahrnehmen, sich der Signalquelle annähern und Signale weitergeben, so dass es zur Bildung von Strömen kommt. Die Mikrotubuli spielen folglich in der Entwicklung von *Dictyostelium* keine entscheidende Rolle.

## 4 Diskussion

### 4.1 Suche nach bekannten centrosomalen Proteinen im Genom von *Dictyostelium discoideum*

Andersen *et al.* haben mit Hilfe der Massenspektrometrie nach neuen Bestandteilen des Säugercentrosoms gesucht (Andersen *et al.*, 2003). Hierbei war es ihnen gelungen, 64 mögliche neue centrosomale Proteine zu ermitteln, von denen 23 als GFP-Fusionsproteine am Centrosom lokalisiert werden konnten. Sollten sich auch die anderen 41 Kandidaten bestätigen lassen, wären in diesem Ansatz insgesamt 111 bekannte und neue centrosomale Proteine identifiziert worden. Hinzu kommen noch einige weitere bekannte, aber nicht gefundene Proteine. Man käme damit auf über 120 centrosomale Proteine beim Menschen. Interessant ist, dass zu diesen in *Dictyostelium* nur 38 Homologe gefunden werden konnten. Dies könnte zum Teil technische Gründe haben. Laut Andersen *et al.* enthalten 75 % der 64 neu identifizierten Proteine „Coiled Coil“-Strukturen. Diese treten sehr häufig auf und haben eine sehr ähnliche Aminosäurezusammensetzung auch in nicht homologen Proteinen. Daher ist es schwierig, homologe Proteine durch BLASTP zu identifizieren. Außerdem weisen die Centrosomen der Säugetiere eine deutlich andere Morphologie auf als die Centrosomen von *Dictyostelium*. Es wäre also nicht überraschend, wenn auch die Proteinzusammensetzung nicht identisch wäre, bzw. die Proteine einander nicht ähnlich genug wären, um sie durch BLASTP-Suche zu finden. Die Hauptgemeinsamkeit des Centrosoms in den verschiedenen Organismen ist es, die Minusenden von Mikrotubuli zu nukleieren und zu stabilisieren. Folgerichtig sind Proteine, die dafür essentiell sind, wie  $\gamma$ -Tubulin, Spc97 und Spc98, konserviert. Die oben genannten Zahlen bedeuten, dass uns noch mindestens 60 centrosomale Proteine in *Dictyostelium* unbekannt sind. Die Suche nach Homologen hat zwar die Anzahl von wahrscheinlichen Bestandteilen von 10 auf 38 erhöht, reichte aber bei weitem nicht aus, um unser Wissen über die Zusammensetzung des Centrosoms von *Dictyostelium* zu vervollständigen.

## 4.2 Identifizierung neuer centrosomaler Proteine durch Massenspektrometrie

### 4.2.1 Aufreinigung der Centrosomen

Bei den ersten Versuchen, durch Massenspektrometrie neue centrosomale Proteine zu identifizieren, hatte sich gezeigt, dass die alte Präparationsmethode nicht ausreichend reine Centrosomen lieferte. Vor allem ribosomale Proteine dominierten und überlagerten andere Signale bei der Messung. Außerdem konnte mit Immunfluoreszenz-Mikroskopie von isolierten Centrosomen noch sehr viel DNA nachgewiesen werden. Da aber DNA-Verunreinigungen nicht nur die Elektrophorese beeinträchtigen, sondern auch DNA-bindende Proteine mit sich bringen, war es sinnvoll, eine DNase-Behandlung in die Präparation zu integrieren. Hierfür war eine Inkubation bei Raumtemperatur notwendig, die DNase konnte daher erst zu einem späten Zeitpunkt eingesetzt werden, bei dem die Centrosomen schon gut aufgereinigt und weitgehend proteasefrei waren. Hierdurch konnte die DNA-Menge in der Präparation deutlich verringert werden (Abbildung 8). Dennoch konnten durch die Massenspektrometrie immer noch DNA-bindende Proteine, wie z. B. Histone, gefunden werden. Eine mögliche Erklärung hierfür ist die feste Verbindung, die in *Dictyostelium* vermutlich zwischen den Centrosomen und den Centromeren besteht (Kaller *et al.*, 2006). Nur durch die Verwendung von Pyrophosphat war es möglich, das Centrosom vom Kern abzutrennen, ohne es selbst dabei zu zerstören. Dennoch ist es nicht wahrscheinlich, dass man dabei die Chromosomen vollständig vom Centrosom abtrennt.

Ein weiteres Problem für die Aufreinigung ergibt sich durch die Verwendung von Dichtegradienten. Hierbei können nur Partikel voneinander getrennt werden, die eine unterschiedliche Dichte aufweisen. Partikel, die gleich oder zumindest ähnlich dicht sind wie die Centrosomen, können also nicht entfernt werden. Hinzu kommt, dass die Dichte der Centrosomen selbst variiert, sie sich folglich auf einen großen Bereich im Gradienten verteilen (Gräf *et al.*, 1998). Um dennoch eine ausreichende Ausbeute zu gewährleisten, muss ein recht grob aufgebauter Gradient mit großen Dichteunterschieden zwischen den einzelnen Schichten verwendet werden. Dadurch wird aber auch ein großes Spektrum an anderen Partikeln mit aufgereinigt. Um dies zu verringern, musste an anderer Stelle optimiert werden. Eine gute Möglichkeit bot sich durch die feste Kopplung des Centrosoms an den Zellkern. Durch die Zentrifugation des Zelllysats über ein Saccharosekissen wurde das Cytoplasma besser von den Kernen abgetrennt als ohne die Verwendung eines Kissens.

Durch die Integration dieser beiden Schritte, also einer DNase-Behandlung und der Aufreinigung der Zellkerne über ein Saccharosekissen, konnte die Präparation erheblich verbessert werden. Bei der mikroskopischen Analyse der Centrosomen war nur noch eine geringe Mengen an DNA zu erkennen und die Massenspektrometrie zeigte die Verringerung der Proteinverunreinigungen auf. Allerdings ist die Behandlung der Centrosomen während der Präparation notwendigerweise nicht besonders schonend, da an mehreren Stellen des Präparationsprotokolls Scherkräfte eingesetzt werden, um anheftende Verunreinigungen von den Centrosomen abzutrennen. Es könnte also sein, dass man bei dem Versuch, möglichst viele Verunreinigungen zu entfernen, auch Teile der Corona abstreift. Dies würde vor allem zu einem Verlust jener Proteine führen, die weit außen am Centrosom gebunden sind. Allerdings ist es eine Frage der Definition, ob solche Proteine noch als echte centrosomale angesehen werden. Da das Centrosom nach außen nicht klar abgegrenzt ist, z. B. durch eine Membran, ist der Übergang zwischen dem Organell und dem Cytoplasma fließend. Die meistverwendete Definition ist, dass alles zum Centrosom zählt, was auch nach der Entfernung der Mikrotubuli noch dort lokalisiert ist. Da aber selbst bei Anwendung des neuen Präparationsprotokolls noch  $\alpha$ - und  $\beta$ -Tubulin am Centrosom nachweisbar sind (siehe 3.2.6), ist nicht vollständig auszuschließen, dass noch Mikrotubuli-Reste vorhanden sind. In diesem Fall würden auch nach der neuen Methode präparierte Centrosomen die Definition rein centrosomaler Proteingemische nicht erfüllen. Vermutlich handelt es sich aber bei dem nachgewiesenen Tubulin nur noch um einzelne Dimere an den Nukleationskomplexen, da mikroskopisch keine Mikrotubuli-Fragmente mehr sichtbar sind.

#### **4.2.2 Auftrennung und Massenspektrometrie der centrosomalen Probe**

Die Identifizierung von Proteinen aus Centrosomen, sowie der mitotischen Spindel und dem Basalkörper mittels massenspektrometrischer Detektion ist in der Literatur von einigen Autoren bereits beschrieben worden. Da es mangels einer klaren Grenze schwierig ist, das Centrosom vollständig vom Cytoplasma abzutrennen, ist es sinnvoll, einen differentiellen Ansatz für die Analyse zu wählen, um so Kontaminationen besser aussortieren zu können. Ein relativ quantifizierender Ansatz, der eine Unterscheidung von centrosomal und nicht centrosomal ermöglicht, wurde von Andersen *et al.* (2003) zur Bestimmung der Proteinkomposition des Centrosoms aus einer humanen Zelllinie erstmals durchgeführt. In diesem Fall wurde ein sogenanntes „quantitatives Protein Correlation Profiling“ verwendet, bei dem centrosomale von nicht-centrosomalen Proteinen durch unterschiedliche Mengenverteilungen in Zentrifugationsfraktionen eines Dichtegradienten unterschieden werden. Hierbei macht man es sich zunutze, dass die Centrosomen bei der Zentrifugation noch weitgehend intakt sind und somit

alle centrosomalen Proteine in jeder Fraktion zueinander im gleichen Mengenverhältnis stehen. Erstellt man zunächst für bekannte centrosomale Proteine das Verteilungsprofil über den Gradienten, so sind alle anderen Proteine, die diesem Profil folgen, ebenfalls als centrosomal anzusehen.

Bei Andersens *et al.* wurde nur eine eindimensionale Trennung der Peptide durchgeführt. Um die Anzahl der identifizierten Proteine zu vergrößern, wurden in dieser Arbeit drei verschiedene quantifizierende Ansätze verwendet: zwei auf der Grundlage von gelbasierter, zweidimensionaler Auftrennung sowie eine Methode basierend auf Flüssigkeitschromatographie. Bei der Auftrennung der Proben in 2D- bzw. 16-BAC-Gelen wurde zusätzlich zu konventionellen Vergleichen zweier Fraktionen auf separaten Gelen das DIGE-Verfahren angewendet. Hierdurch war es möglich, Centrosomen an- und abgereicherte Fraktionen in einem Gel miteinander zu vergleichen.

Bei der Probenvorbereitung für die 2D-Gelelektrophorese zeigte sich, dass nicht alle Bestandteile einer Centrosomenpräparation in dem verwendeten Auftragspuffer löslich waren. Dies könnte den Verlust von centrosomalen Proteinen bedeuten. Es wäre allerdings auch möglich, dass es sich bei den unlöslichen Bestandteilen um Verunreinigungen handelt. Bestärkt wird diese Hypothese dadurch, dass die entsprechenden Banden in sehr unterschiedlicher Intensität bei unabhängigen Präparationen auftraten. Sollte es sich dabei um mitaufgereinigte Vesikel handeln, würde dies auch erklären, warum sie in dem SDS-freien Quellungspuffer nicht löslich waren.

Durch die Anwendung verschiedener Separationstechniken war es möglich, die Anzahl der gefundenen Proteine zu erhöhen. Allerdings erwiesen sich die drei Auftrennungsmethoden als unterschiedlich effektiv (Tabelle 7).

**Tabelle 7: Anzahl der mit den verschiedenen Methoden identifizierten Proteine**

	iTRAQ	16-BAC	2D	gesamt
bekannte centrosomale Proteine	7	4	4	11
Kandidaten	22	5	12	33
vermutete Verunreinigungen	200	13	25	217
gesamt	229	22	41	261

Bei Verwendung der gelbasierten Methoden müssen vor der Messung einzelne Proteinspots ausgeschnitten werden. Damit dies möglich ist, muss eine ausreichende Proteinmenge vorhanden sein. Außerdem kommt es sowohl bei 2D-Gelen wie auch bei 16-BAC-Gelen zu Verlusten von Proteinen bei der Übertragung von der ersten auf die zweite Dimension. All

dies führte dazu, dass bei diesen Verfahren nur insgesamt 63 Proteine identifiziert wurden. Mit der iTRAQ-Methode konnten dagegen viel mehr Proteine gemessen werden, da hier keine Verluste durch manuelle Arbeitsschritte und den Gellauf auftreten. Allerdings sind hier von den 233 gefundenen Proteinen 204, also mehr als 85 %, höchstwahrscheinlich Verunreinigungen. Diese Methode erzeugt also erhebliche Datenmassen, die aber nicht besonders verlässlich sind.

### 4.2.3 Mögliche Fehlerquellen bei der Klassifizierung

Die Klassifizierung von Proteinen als Verunreinigung wurde recht strikt durchgeführt. So wurden z. B. alle am Stoffwechsel beteiligten Proteine aussortiert. Es ist auch sehr wahrscheinlich, dass die meisten von diesen tatsächlich nicht am Centrosom zu finden sind. Allerdings zeigt ein Beispiel aus einem Säugetiermodell, dass durchaus ein Zusammenhang zwischen Stoffwechselproteinen und dem Cytoskelett bestehen kann (Lloyd und Hardin, 1999). Ein weiteres Beispiel für mögliche Fehler ist das Protein Clathrin. Es ist bekannt, dass Clathrin eine wichtige Funktion bei Membranbewegungen hat. Hier sorgt es in Form eines „Clathrin-Mantels“ z. B. dafür, dass Zellen Liganden aus der Umgebung aufnehmen können. Von diesem Wissen ausgehend, hätte man Clathrin als Verunreinigung klassifiziert. Kürzlich konnten jedoch Royle *et al.* zeigen, dass dieses Protein für die Funktion der mitotischen Spindel wichtig ist und direkt an die Spindel bindet (Royle *et al.*, 2005). Und in dieser Arbeit konnte durch eine GFP-Fusion nachgewiesen werden, dass es sich bei dem Clathrin von *Dictyostelium* tatsächlich um ein centrosomales Protein handelt.

Ein weiteres Selektionskriterium war der Anreicherungsfaktor der Proteine, also das Verhältnis, in dem sie in der centrosomalen und der nicht-centrosomalen Probe gemessen wurden. Wenn aber schwach gebundene Proteine durch die Scherkräfte vor und während der ersten Dichtegradientenzentrifugation vom Centrosom abgetrennt werden, so landen sie in einer nicht-centrosomalen Fraktion. Dies würde dazu führen, dass der Anreicherungsfaktor solcher Proteine weniger groß ist und möglicherweise unter der gewählten Grenze liegt. Hiermit würde das Protein fälschlicherweise aussortiert. Dies könnte zum Beispiel für DdEB1 zutreffen. Dieses Mikrotubuli-bindende Protein wurde an isolierten Centrosomen ziemlich weit außen an der Corona lokalisiert und konnte in dieser Untersuchung nicht nachgewiesen werden.

Proteine, die mit zwei oder gar allen drei Auftrennungsmethoden (2D, 16-BAC oder iTRAQ) gefunden werden konnten, scheinen interessanter als solche, die nur einmal identifiziert worden sind. Aber auch das bringt Fehler mit sich. Verunreinigungen, die mit den Centrosomen angereichert wurden, können ebenfalls mehrfach gefunden werden. Ein Beispiel

hierfür ist das Protein CAPB, welches mit jeder Methode nachweisbar war und damit als sehr guter Kandidat galt. Eine Immunfluoreszenzfärbung von isolierten Centrosomen zeigte aber, dass sich das Protein nicht direkt am Centrosom befindet, sondern vermutlich an Partikeln, die zusammen mit den Centrosomen aufgereinigt worden waren.

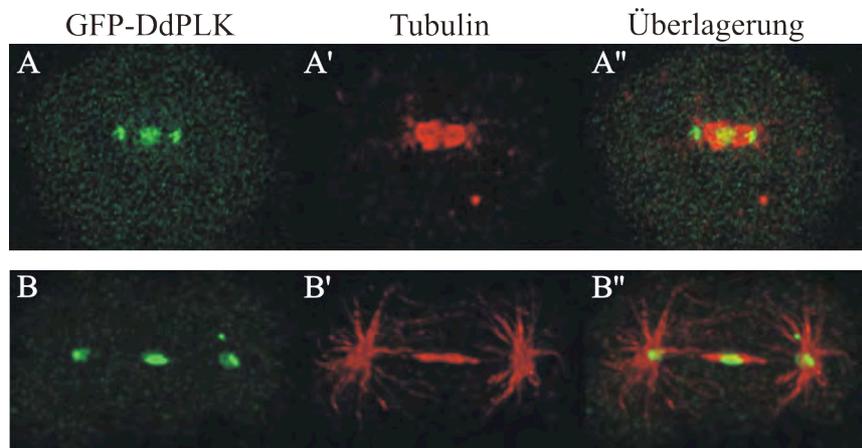
#### 4.2.4 Identifizierte Proteine

Durch die Kombination verschiedener Techniken wurden 261 Proteine in der Centrosomenpräparation nachgewiesen. Hiervon werden 33 als mögliche neue centrosomale Proteine angesehen. Für Clathrin, 14-3-3 und das unbekannte Protein DDB0191988 konnte auch schon eine Lokalisierung am Centrosom bestätigt werden. Es ist allerdings nicht anzunehmen, dass alle weiteren Kandidaten ebenfalls tatsächlich centrosomale Proteine sind. Und betrachtet man für die gefundenen bekannten Proteine das Verhältnis zwischen centrosomalen Proteinen und Verunreinigungen (11 zu 221), so könnte man auch auf ein ähnlich schlechtes Ergebnis bei den unbekannt Proteinen schließen. Da aber z. B. nahezu alle ribosomalen Proteine, oder auch sehr viele Aktin-bindende Proteine, bekannt sind, aber nur wenige centrosomale Proteine anhand einer Ähnlichkeit zu erkennen sein dürften (siehe 4.1), ist es wahrscheinlich, dass es sich dennoch bei vielen unbekannt Proteinen um Treffer handelt. Gewissheit darüber könnten aber nur weitere Experimente bringen, beispielsweise Lokalisierungsstudien mittels GFP-Fusionen.

Fraglich ist allerdings, warum einige bekannte Bestandteile des *Dictyostelium*-Centrosoms nicht nachgewiesen werden konnten. Hierzu zählt z. B. das gut untersuchte Protein DdEB1 (Rehberg und Gräf, 2002). Es befindet sich sehr weit außen in der Corona; es wäre also möglich, dass es durch die verschärften Aufreinigungsbedingungen verloren gegangen ist (siehe 4.2.1).

Ein weiterer Punkt ist, dass nicht alle Proteine während des gesamten Zellzyklus am Centrosom lokalisieren. Dies betrifft vor allem Proteine, die regulative Aufgaben erfüllen, wie Kinasen. Dadurch ist bei diesen Proteinen ebenfalls damit zu rechnen, dass sie einen zu geringen Anreicherungsfaktor erzielen. Ein Beispiel hierfür ist beim Menschen das Protein PLK1, welches zur Familie der Polo-Kinasen gehört und nur während der Mitose am Centrosom lokalisiert, nicht aber in der Interphase (Golsteyn *et al.*, 1995). Auch bei *Dictyostelium* existiert eine dieser Kinasen (DdPLK). Auch hier konnte mit Hilfe eines GFP-Fusionskonstruktes die Kinase nur während der Mitose am Centrosom nachgewiesen werden (Abbildung 34). Da aber bei einer Präparation nur ein kleiner Anteil der Centrosomen aus mitotischen Zellen stammen dürfte, ist gut zu erklären, warum in diesem Massenspektrometrieansatz, wie auch in dem von Andersen *et al.* (2003), diese Kinase nicht am

Centrosom identifiziert werden konnte. Aber möglicherweise sollte man bei solch kurzfristigen Gästen am Centrosom besser von Centrosom-assoziierten und nicht von centrosomalen Proteinen sprechen.



**Abbildung 34: GFP-DdPLK lokalisiert während der Mitose am Centrosom und am Mittelbereich der Spindel.** Immunfluoreszenz-Mikroskopie von Zellen, die GFP-DdPLK (A und B, grün) exprimieren, gefärbt mit einem Antikörper gegen Tubulin (A' und B', rot). A zeigt eine frühe Anaphase-Spindel, B eine Spindel in der Telophase.

## 4.3 Untersuchung von DdDCX

### 4.3.1 Aufbau und Lokalisation von DdDCX

Das an der Krankheit Lissenzephalie beteiligte Protein DCX ist beim Menschen essentiell für die korrekte Wanderung von Neuronen bei der Entwicklung des Gehirns (Gleeson *et al.*, 1999). Untersuchungen gibt es bisher nur in Vertebraten. In niederen Organismen wie *D. melanogaster* und *C. elegans* konnten keine homologen Proteine gefunden werden, welche ebenfalls zwei Mikrotubuli-bindende DC-Domänen enthalten, aber keine Kinasen sind. Es war also nicht zu erwarten, dass ein solches homologes Protein in *Dictyostelium discoideum* existiert. Dennoch gibt es eines, und DdDCX weist eine Identität von 29 % verglichen mit HsDCX auf. Allerdings liegt diese Übereinstimmung hauptsächlich im Bereich der DC-Domänen. Das menschliche DCX enthält zusätzlich einen C-terminalen Bereich, der reich an Prolin und Serin ist und für die Interaktion mit anderen Proteinen verantwortlich gemacht wird. Beispielsweise bindet dort das Protein Neurabin II, welches die Interaktion von DCX mit Aktin reguliert (Tsukada *et al.*, 2003; Tsukada *et al.*, 2005). In *Dictyostelium* konnte bei Durchsichtung des Genoms kein homologes Protein zu Neurabin II gefunden werden. Und die Tatsache, dass der Interaktionsbereich dafür am DdDCX fehlt, spricht dafür, dass auch keines existiert. Anders verhält es sich mit der Untereinheit  $\gamma 1$  des „Clathrin Adaptor Komplexes“

AP-1, welche ebenfalls an den C-Terminus von DCX bindet, und zwar an die Aminosäureabfolge YLPL (Friocourt *et al.*, 2001). In *Dictyostelium* existiert zwar ein  $\gamma$ 1-Homolog, aber das Aminosäuremotiv ist in der DdDCX-Sequenz nicht enthalten. Eine eindeutige Erklärung für das Fehlen dieses beim menschlichen DCX wichtigen Bereichs kann im Moment nicht gegeben werden. Möglicherweise übernehmen andere Bereiche die Funktion des C-Terminus, etwa der zwischen den DC-Domänen liegende, ebenfalls Prolin- und Serinreiche Abschnitt. Es wäre aber auch denkbar, dass die bei HsDCX am C-Terminus stattfindenden Interaktionen in *Dictyostelium* nicht benötigt werden.

Die Lokalisationsstudien von DdDCX stimmten mit den veröffentlichten Daten für DCX aus Säugern überein. Sowohl durch Immunfluoreszenz-Mikroskopie mit einem spezifischen, polyklonalen Antikörper wie auch durch Expression von Fusionsproteinen wurde eine Färbung der Mikrotubuli und des Centrosoms sichtbar. Allerdings handelt es sich bei DdDCX nicht um ein echtes centrosomales Protein, da es nicht an isolierten Centrosomen nachgewiesen werden konnte. Auch menschliches DCX bindet an Mikrotubuli, und zwar *in vivo* und *in vitro* (Gleeson *et al.*, 1999; Kim *et al.*, 2003). Eine Lokalisation am Centrosom wurde aber ebenfalls nicht nachgewiesen.

#### 4.3.2 Funktion von DdDCX

Ein Hinweis auf die Funktion von DdDCX zeigte sich bei einer Northernblot-Analyse. Diese ergab, dass DdDCX entwicklungsreguliert ist und die mRNA erst in der Aggregationsphase in größeren Mengen erzeugt wird. Auch die Proteinmenge erreicht erst nach neun Stunden unter Hungerbedingungen das Maximum; in vegetativ wachsenden Zellen ist mit dem polyklonalen Antikörper kein Protein nachweisbar. Dies ist für ein Mikrotubuli-assoziiertes Protein ungewöhnlich. Es gibt allerdings Daten darüber, dass auch einige Kinesine erst in der Entwicklung angeschaltet werden (de Hostos *et al.*, 1998). Dieses Expressionsmuster ließ vermuten, dass die Funktion des Proteins in der Entwicklung, genauer gesagt bei der Aggregation der Zellen, liegt. Für diese Phase ist charakteristisch, dass die Zellen nicht mehr als Individuen agieren, sondern miteinander kommunizieren. Auch beim Menschen, bei der Wanderung der Neuronen während der Gehirnentwicklung, ist die Informationsübermittlung zwischen Zellen essentiell. Die neu gebildeten Neuronen erfahren durch die Kommunikation mit radialen Gliazellen, welchen Weg sie einschlagen müssen.

Die Bindung von DdDCX an Aktin und die Fähigkeit des Proteins, Aktinfilamente zu bündeln, könnten weitere Hinweise auf die Funktion des Proteins sein. Aktinpolymerisation ist essentiell für die Zellbewegung, und die Regulation der Aktindynamik spielt dabei eine

wichtige Rolle. Es wäre also möglich, dass DdDCX daran beteiligt ist, die gerichtete Bewegung der Zellen in der Aggregationsphase zu steuern.

Leider bewirkten weder Überexpression von Fusionsproteinen, noch die Deletion von DdDCX einen erkennbaren Phänotyp. Daraus ließ sich also kein Schluss auf die Funktion des Proteins ziehen. Es stellte sich deshalb die Frage, warum dieses entwicklungsregulierte Protein überhaupt konserviert ist. Eine denkbare Erklärung ist, dass das Proteins den Ausfall eines anderen Proteins kompensiert kann, das heißt, DdDCX als Ersatz bei Verlust des Anderen dienen kann, oder umgekehrt. Bei Säugern kann eine Überexpression von LIS1 die Folgen einer DCX-Mutation deutlich vermindern (Tanaka *et al.*, 2004). Hier kann also LIS1 die Funktion von DCX übernehmen und seinen Ausfall kompensieren. Ob ein ähnlicher Sachverhalt auch in *Dictyostelium* vorliegt, sollte durch die Herstellung einer Doppelmutante geklärt werden. Hierfür musste aber erst überprüft werden, welche Rolle LIS1 in der Entwicklung von *Dictyostelium* spielt.

#### **4.4 Die Rolle von DdLIS1 in der Entwicklung und das Zusammenspiel mit DdDCX**

In vegetativ wachsenden Zellen hat das DdLIS1 mehrere wichtige Funktionen. Die Punktmutation, die vermutlich durch Faltungsprobleme zu einem partiellen Ausfall des Proteins führt (Caspi *et al.*, 2003), bewirkt in den Zellen einige deutliche Veränderungen, die sowohl das Mikrotubuli- wie auch das Aktin-Cytoskelett betreffen. In der Entwicklung zeigten die Mutanten dagegen keinen starken Defekt. Sie bildeten in normaler Geschwindigkeit normal große Aggregate und Fruchtkörper. Zusammen mit der Erkenntnis, dass DdLIS1 nicht entwicklungsreguliert ist, könnte man also annehmen, dass DdLIS1 keine wichtige Rolle in der Entwicklung von *Dictyostelium* spielt. Möglicherweise reichen aber schon geringe Mengen des Proteins aus. Letzteres erscheint wahrscheinlicher, da bei einem LIS1-Defekt durchaus einige Zellen bei der Aggregation zurückbleiben. Vermutlich ist in diesen Zellen die Menge an funktionellem DdLIS1 kleiner als im Durchschnitt, so dass hier der Phänotyp besonders stark ausgeprägt ist.

Hinzu kommt, dass die gleiche Erklärung gelten könnte, die für das Fehlen eines Phänotyps der DdDCX-Nullmutante in den Raum gestellt wurde (siehe oben). Möglicherweise kann DdDCX den Ausfall von DdLIS1 in der Entwicklung kompensieren. Um dem auf die Spur zu kommen, wurden mehrere Untersuchungen durchgeführt. Als erstes wurde gezeigt, dass DdLIS1 und DdDCX miteinander interagieren. Dann wurde getestet, ob sich die Proteinmenge von DdLIS1 in der DdDCX-Nullmutante im Lauf der Entwicklung verändert. Die

Versuche in Abschnitt 3.5.3 zeigten klar, dass dies nicht der Fall ist. Sollte also DdLIS1 tatsächlich die Funktion von DdDCX übernehmen, so müsste hierfür die normale Menge des Proteins ausreichend sein. Umgekehrt war GFP-fusioniertes DdDCX nicht in der Lage, die Funktion von DdLIS1 in vegetativen Zellen zu übernehmen. Es erscheint also unwahrscheinlich, dass DdDCX und DdLIS1 einander kompensieren können, auch wenn nicht ausgeschlossen werden kann, dass das GFP-DCX-Fusionsprotein nicht voll funktionsfähig ist.

Die Kombination der Punktmutation in DdLIS1 mit der Deletion von DdDCX führte jedoch zu einer klaren Störung der Entwicklung. Dies deutet an, dass DdLIS1 zwei prinzipielle Funktionen hat. Zum einen in vegetativen Zellen unabhängig von DdDCX, zum anderen während der Entwicklung im Zusammenspiel mit DdDCX, wobei eines der Beiden in normaler Menge ausreicht, also nicht wie beim Menschen eine Überexpression notwendig ist, um das Fehlen des Anderen zu kompensieren.

Der Defekt, den die Zellen der Doppelmutante aufweisen, ist nicht einfach zu charakterisieren. Die Beobachtung des Entwicklungszyklus ergab, dass die Zellen eine Störung bei der Aggregation haben. Wie jedoch eindeutig aus dem Chemotaxisversuch zu erkennen war, können die Zellen sehr wohl cAMP wahrnehmen und sich gerichtet auf die Quelle zubewegen. Auch sind sie in der Lage, Aggregationsströme zu bilden. Das bedeutet, dass sie selber cAMP synthetisieren und sezernieren können, denn sonst würde jede Zelle einzeln auf das Aggregationszentrum zulaufen (Kessin, 2003). Allerdings brauchen sie für die Bildung von Aggregationsströmen zuerst einen externen Anstoß, der im Versuch von den sich entwickelnden Wildtypzellen gegeben wurde. Es wäre also denkbar, dass cAMP überhaupt nur als Reaktion auf externes cAMP ausgeschüttet wird. Wahrscheinlicher ist allerdings, dass es sich hier um eine Frage der cAMP-Dosis handelt. Hier gibt es zwei Möglichkeiten: Entweder sezernieren die Zellen geringere Mengen des Botenstoffs als Wildtypzellen, oder sie benötigen eine höhere Konzentration davon, ehe sie reagieren.

#### **4.5 Die Rolle von Mikrotubuli in der Entwicklung von *Dictyostelium***

Die Untersuchung von DdLIS1 und DdDCX hatte gezeigt, dass diese beiden Proteine an der Entwicklung von *Dictyostelium* beteiligt sind. Ihre wichtigste Gemeinsamkeit ist ihre Eigenschaft, an Mikrotubuli zu binden. Es war also nahe liegend zu vermuten, dass auch Mikrotubuli bei diesem Prozess wichtig sind. Für die beiden menschlichen Proteine ist bekannt, dass sie Mikrotubuli stabilisieren. Ein Ausfall eines der Proteine sollte folglich zu instabileren Filamenten führen. Daher wird auch spekuliert, dass so die Migration der Neuronen gehemmt wird und es zum Krankheitsbild der Lissenzephalie kommt (Francis *et al.*, 1999).

Durch Experimente mit der Mikrotubuli-destabilisierenden Chemikalie Nocodazol wurde getestet, wie wichtig Mikrotubuli für *Dictyostelium* bei der Chemotaxis und der Bildung von Zellströmen tatsächlich sind. Es zeigte sich, dass die Zellen auch in Abwesenheit von Mikrotubuli in der Lage waren, sich gerichtet auf eine cAMP-Quelle hinzubewegen und sogar Aggregationsströme zu bilden. Demnach scheinen Mikrotubuli für diese Prozesse erstaunlicherweise nicht essentiell zu sein.

Es muss allerdings erwähnt werden, dass diese Versuche unter den normalen Laborbedingungen stattfanden. In der Natur herrschen wesentlich weniger gleichmäßige Bedingungen und es ist ein schwierigeres, unebeneres Gelände bei der Aggregation zu überwinden. Es wäre möglich, dass hier Mikrotubuli für die Zellen durchaus wichtig sind, um sich zu entwickeln und am Ende Fruchtkörper zu bilden.

Auch wurde nicht getestet, wie sich die behandelten Zellen in direkter Konkurrenz zu nicht behandelten Zellen verhalten. Hier könnten die Zellen ohne Mikrotubuli einen Wettbewerbsnachteil gegenüber Zellen mit Mikrotubuli haben, auch wenn sie alleine keine Defekte aufwiesen. Beschrieben ist so ein Fall für das Kinesin K7: Eine Nullmutante hatte keinen nachweisbaren Phänotyp, bei einem Mischungsexperiment zeigten die mutanten Zellen aber eine andere Verteilung im Slug und im Fruchtkörper als die Wildtypzellen (de Hostos *et al.*, 1998).

Auf jeden Fall konnte mit diesen Versuchen nachgewiesen werden, dass Mikrotubuli in *Dictyostelium* keine besonders wichtige Rolle spielen. Es ist also unwahrscheinlich, dass der Phänotyp der Doppelmutante aus einer fehlenden Stabilisierung der Mikrotubuli durch die beiden Mikrotubuli-assoziierten Proteine resultiert.

#### **4.6 Suche nach einem von Mikrotubuli unabhängigen Grund für den Phänotyp der Doppelmutante**

Gesucht wird also eine Funktion von DdLIS1 und DdDCX, die nicht durch deren Bindung an Mikrotubuli vermittelt wird. Eine Möglichkeit hierfür ist ein Zusammenspiel mit dem Aktin-Cytoskelett. Für DdLIS1 konnte eine Interaktion mit dem Protein Rac1A nachgewiesen werden (Rehberg *et al.*, 2005). Diese kleine GTPase ist ein bekannter Regulator für Aktin-Polymerisation und könnte somit die Verbindung von DdLIS1 zur Aktin-Dynamik darstellen. DdDCX bindet sogar direkt an Aktin. Dies konnte durch einen Aktin-Sedimentationsversuch nachgewiesen werden, der zusätzlich noch eine Bündelung von Aktinfilamenten durch DdDCX zeigte. Beide Proteine stehen also in Verbindung mit Aktin. Allerdings haben die Zellen der Doppelmutante kein Problem bei der Zellbewegung, wie es bei einer

Fehlregulation des Aktin-Cytoskeletts zu erwarten wäre. Welchen Einfluss Aktin auf die Wahrnehmung oder die Sekretion von cAMP haben könnte, ist unbekannt.

Eine weitere Hypothese lässt sich aus einer von Säugern bekannten Funktion von LIS1 ableiten. Das Protein ist eine der drei Untereinheiten des Enzymkomplexes PAF-AH (Arai, 2002). Dieser inaktiviert durch Deacetylierung das Phospholipid PAF (Plättchen aktivierender Faktor), das hauptsächlich als intrazellulärer Botenstoff fungiert. Durch den Einfluss von PAF auf neuronale Differenzierungsvorgänge besteht auch hier ein Zusammenhang mit der Krankheit Lissenzephalie. Mutationen in LIS1 können auf diese Weise auch unabhängig von Dynein und Mikrotubuli eine Störung der Wanderung von Neuronen in der Gehirnentwicklung bewirken (Tokuoka *et al.*, 2003).

PAF ist auch in *Dictyostelium* nachgewiesen worden (Bussolino *et al.*, 1991). Es konnte isoliert werden und bewirkt wie PAF aus Säugetieren die Aggregation von isolierten Blutplättchen. Zusätzlich gibt es einen Zusammenhang zwischen diesem Botenstoff und der Entwicklung der Amöbe. Unter Hungerbedingungen erhöht sich die intrazelluläre Konzentration von PAF, das Maximum wird etwa nach neun Stunden erreicht. Außerdem kann die PAF-Aktivität durch die Gabe von cAMP stimuliert werden (Sordano *et al.*, 1993). Es wird daher angenommen, dass PAF eine Rolle in der frühen Entwicklung, also der Aggregation spielt. Wie genau, konnte aber noch nicht herausgefunden werden. Der einzige bekannte Effekt von PAF auf die Signaltransduktion ist die Stimulation der Aufnahme von Kalziumionen (Schaloske *et al.*, 1995).

Diese Eigenschaften von PAF in *Dictyostelium* passen sehr gut mit denen von DdDCX und der Doppelmutante zusammen. DdDCX ist in den Zellen in der gleichen Phase wie PAF in größeren Mengen vorhanden. Der Botenstoff und das Protein scheinen also zu einem ähnlichen Zeitpunkt benötigt zu werden. Und auch bei der Doppelmutante zeigte sich ein Phänotyp in der Aggregationsphase der Zellen.

Es wäre also durchaus möglich, dass ein Zusammenhang zwischen DdLIS1, DdDCX und PAF besteht und dass sich damit der Phänotyp der Doppelmutante erklären ließe. Ob dies tatsächlich der Fall ist, wird Gegenstand zukünftiger Forschungen sein. Wenn es möglich wäre, hier Klarheit zu bekommen, könnte dies auch zum besseren Verständnis der Vorgänge in menschlichen Neuronen beitragen, die zu der schwerwiegenden Krankheit Lissenzephalie führen.

## 5 Literatur

- Adachi, H., Hasebe, T., Yoshinaga, K., Ohta, T. und 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**, 1808-14.
- Affolter, M. und Weijer, C. J.** (2005). Signaling to cytoskeletal dynamics during chemotaxis. *Dev. Cell* **9**, 19-34.
- Andersen, J. S., Wilkinson, C. J., Mayor, T., Mortensen, P., Nigg, E. A. und Mann, M.** (2003). Proteomic characterization of the human centrosome by protein correlation profiling. *Nature* **426**, 570-4.
- Arai, H.** (2002). Platelet-activating factor acetylhydrolase. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* **68-69**, 83-94.
- Bain, G., Grant, C. E. und Tsang, A.** (1991). Isolation and characterization of cDNA clones encoding polypeptides related to a *Dictyostelium discoideum* cyclic AMP binding protein. *J. Gen. Microbiol.* **137**, 501-8.
- Barr, F. A., Sillje, H. H. und Nigg, E. A.** (2004). Polo-like kinases and the orchestration of cell division. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **5**, 429-40.
- Bornens, M. und Moudjou, M.** (1999). Studying the composition and function of centrosomes in vertebrates. *Methods Cell Biol.* **61**, 13-34.
- Boveri, T.** (1887). Über die Differenzierung der Zellkerne während der Furchung des Eies von *Ascaris megacephala*. *Anat. Anz.* **2**, 688-693.
- Bretschneider, T., Jonkman, J., Kohler, J., Medalia, O., Barisic, K., Weber, I., Stelzer, E. H., Baumeister, W. und Gerisch, G.** (2002). Dynamic organization of the actin system in the motile cells of *Dictyostelium*. *J. Muscle Res. Cell Motil.* **23**, 639-49.
- Brinkley, B. R.** (2001). Managing the centrosome numbers game: from chaos to stability in cancer cell division. *Trends Cell Biol.* **11**, 18-21.
- Bussolino, F., Sordano, C., Benfenati, E. und Bozzaro, S.** (1991). *Dictyostelium* cells produce platelet-activating factor in response to cAMP. *Eur. J. Biochem.* **196**, 609-15.
- Cagney, G. und Emili, A.** (2002). *De novo* peptide sequencing and quantitative profiling of complex protein mixtures using mass-coded abundance tagging. *Nat. Biotechnol* **20**, 163-70.
- Caspi, M., Atlas, R., Kantor, A., Sapir, T. und Reiner, O.** (2000). Interaction between LIS1 and doublecortin, two lissencephaly gene products. *Hum. Mol. Genet.* **9**, 2205-13.
- Caspi, M., Coquelle, F. M., Koifman, C., Levy, T., Arai, H., Aoki, J., De Mey, J. R. und Reiner, O.** (2003). LIS1 Missense Mutations: variable phenotypes result from unpredictable alterations in biochemical and cellular properties. *J Biol Chem* **278**, 38740-8.
- Claviez, M., Pagh, K., Maruta, H., Baltés, W., Fisher, P. und Gerisch, G.** (1982). Electron microscopic mapping of monoclonal antibodies on the tail region of *Dictyostelium* myosin. *Embo J.* **1**, 1017-1022.
- Damer, C. K. und O'Halloran, T. J.** (2000). Spatially regulated recruitment of clathrin to the plasma membrane during capping and cell translocation. *Mol. Biol. Cell* **11**, 2151-9.
- Dauderer, C. und Gräf, R. O.** (2002). Molecular analysis of the cytosolic *Dictyostelium* gamma-tubulin complex. *Eur. J. Cell Biol.* **81**, 175-84.

- Dauderer, C., Schliwa, M. und Gräf, R.** (1999). *Dictyostelium discoideum*: a promising centrosome model system. *Biol. Cell* **91**, 313-20.
- Dauderer, C., Schliwa, M. und Gräf, R.** (2001). *Dictyostelium* centrin-related protein (DdCrp), the most divergent member of the centrin family, possesses only two EF hands and dissociates from the centrosome during mitosis. *Eur. J. Cell Biol.* **80**, 621-30.
- de Hostos, E. L., McCaffrey, G., Sugang, R., Pierce, D. W. und Vale, R. D.** (1998). A developmentally regulated kinesin-related motor protein from *Dictyostelium discoideum*. *Mol. Biol. Cell* **9**, 2093-106.
- des Portes, V., Pinard, J. M., Billuart, P., Vinet, M. C., Koulakoff, A., Carrie, A., Gelot, A., Dupuis, E., Motte, J., Berwald-Netter, Y. et al.** (1998). A novel CNS gene required for neuronal migration and involved in X-linked subcortical laminar heterotopia and lissencephaly syndrome. *Cell* **92**, 51-61.
- Devreotes, P.** (1989). *Dictyostelium discoideum*: a model system for cell-cell interactions in development. *Science* **245**, 1054-8.
- Dobyns, W. B., Reiner, O., Carrozzo, R. und Ledbetter, D. H.** (1993). Lissencephaly. A human brain malformation associated with deletion of the LIS1 gene located at chromosome 17p13. *Jama* **270**, 2838-42.
- Doxsey, S.** (2001). Re-evaluating centrosome function. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2**, 688-98.
- Dumontier, M., Hocht, P., Mintert, U. und Faix, J.** (2000). Rac1 GTPases control filopodia formation, cell motility, endocytosis, cytokinesis and development in *Dictyostelium*. *J. Cell Sci.* **113** (Pt 12), 2253-65.
- Eichinger, L., Pachebat, J. A., Glockner, G., Rajandream, M. A., Sugang, R., Berriman, M., Song, J., Olsen, R., Szafranski, K., Xu, Q. et al.** (2005). The genome of the social amoeba *Dictyostelium discoideum*. *Nature* **435**, 43-57.
- Euteneuer, U., Gräf, R., Kube-Granderrath, E. und Schliwa, M.** (1998). *Dictyostelium gamma-tubulin*: molecular characterization and ultrastructural localization. *J. Cell Sci.* **111** (Pt 3), 405-12.
- Euteneuer, U. und Schliwa, M.** (1992). Mechanism of centrosome positioning during the wound response in BSC-1 cells. *J. Cell Biol.* **116**, 1157-66.
- Faix, J., Kreppel, L., Shaulsky, G., Schleicher, M. und Kimmel, A. R.** (2004). A rapid and efficient method to generate multiple gene disruptions in *Dictyostelium discoideum* using a single selectable marker and the Cre-loxP system. *Nucleic Acids Res.* **32**, e143.
- Faix, J., Weber, I., Mintert, U., Kohler, J., Lottspeich, F. und Marriott, G.** (2001). Recruitment of cortexillin into the cleavage furrow is controlled by Rac1 and IQGAP-related proteins. *Embo J.* **20**, 3705-15.
- Feng, Y. und Walsh, C. A.** (2001). Protein-protein interactions, cytoskeletal regulation and neuronal migration. *Nat Rev Neurosci* **2**, 408-16.
- Francis, F., Koulakoff, A., Boucher, D., Chafey, P., Schaar, B., Vinet, M. C., Friocourt, G., McDonnell, N., Reiner, O., Kahn, A. et al.** (1999). Doublecortin is a developmentally regulated, microtubule-associated protein expressed in migrating and differentiating neurons. *Neuron* **23**, 247-56.
- Friocourt, G., Chafey, P., Billuart, P., Koulakoff, A., Vinet, M. C., Schaar, B. T., McConnell, S. K., Francis, F. und Chelly, J.** (2001). Doublecortin interacts with mu subunits of clathrin adaptor complexes in the developing nervous system. *Mol. Cell Neurosci.* **18**, 307-19.

- Fukasawa, K., Choi, T., Kuriyama, R., Rulong, S. und Vande Woude, G. F.** (1996). Abnormal centrosome amplification in the absence of p53. *Science* **271**, 1744-7.
- 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.
- Gard, D. L., Hafezi, S., Zhang, T. und Doxsey, S. J.** (1990). Centrosome duplication continues in cycloheximide-treated *Xenopus* blastulae in the absence of a detectable cell cycle. *J. Cell Biol.* **110**, 2033-42.
- Gleeson, J. G., Lin, P. T., Flanagan, L. A. und Walsh, C. A.** (1999). Doublecortin is a microtubule-associated protein and is expressed widely by migrating neurons. *Neuron* **23**, 257-71.
- Golsteyn, R. M., Mundt, K. E., Fry, A. M. und Nigg, E. A.** (1995). Cell cycle regulation of the activity and subcellular localization of Plk1, a human protein kinase implicated in mitotic spindle function. *J. Cell Biol.* **129**, 1617-28.
- Gönczy, P., Bellanger, J. M., Kirkham, M., Pozniakowski, A., Baumer, K., Phillips, J. B. und Hyman, A. A.** (2001). zyg-8, a gene required for spindle positioning in *C. elegans*, encodes a doublecortin-related kinase that promotes microtubule assembly. *Dev. Cell* **1**, 363-75.
- Gräf, R.** (2001a). Isolation of centrosomes from *Dictyostelium*. *Methods Cell Biol.* **67**, 337-57.
- Gräf, R.** (2001b). Maltose-binding protein as a fusion tag for the localization and purification of cloned proteins in *Dictyostelium*. *Anal. Biochem.* **289**, 297-300.
- Gräf, R., Dauderer, C. und Schliwa, M.** (1999). Cell cycle-dependent localization of monoclonal antibodies raised against isolated *Dictyostelium* centrosomes. *Biol. Cell* **91**, 471-7.
- Gräf, R., Dauderer, C. und Schliwa, M.** (2000). *Dictyostelium* DdCP224 is a microtubule-associated protein and a permanent centrosomal resident involved in centrosome duplication. *J. Cell Sci.* **113** (Pt 10), 1747-58.
- Gräf, R., Dauderer, C. und Schulz, I.** (2004). Molecular and functional analysis of the *Dictyostelium* centrosome. *Int. Rev. Cytol.* **241**, 155-202.
- Gräf, R., Euteneuer, U., Ho, T. H. und 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. und Schliwa, M.** (1998). Isolation of nucleation-competent centrosomes from *Dictyostelium discoideum*. *Eur. J. Cell Biol.* **76**, 167-75.
- Hartinger, J., Stenius, K., Hogemann, D. und Jahn, R.** (1996). 16-BAC/SDS-PAGE: a two-dimensional gel electrophoresis system suitable for the separation of integral membrane proteins. *Anal. Biochem.* **240**, 126-33.
- Hashimoto, R., Seki, T., Takuma, Y. und Suzuki, N.** (1993). The 'double cortex' syndrome on MRI. *Brain Dev.* **15**, 57-9; discussion 83-4.
- Hattori, M., Adachi, H., Tsujimoto, M., Arai, H. und Inoue, K.** (1994). Miller-Dieker lissencephaly gene encodes a subunit of brain platelet-activating factor acetylhydrolase. *Nature* **370**, 216-8.
- Herbert, B.** (1999). Advances in protein solubilisation for two-dimensional electrophoresis. *Electrophoresis* **20**, 660-3.

- Hestermann, A. und Gräf, R.** (2004). The XMAP215-family protein DdCP224 is required for cortical interactions of microtubules. *BMC Cell Biol* **5**, 24.
- Hinchcliffe, E. H., Miller, F. J., Cham, M., Khodjakov, A. und Sluder, G.** (2001). Requirement of a centrosomal activity for cell cycle progression through G1 into S phase. *Science* **291**, 1547-50.
- Hinchcliffe, E. H. und Sluder, G.** (2001). "It takes two to tango": understanding how centrosome duplication is regulated throughout the cell cycle. *Genes Dev.* **15**, 1167-81.
- Horesh, D., Sapir, T., Francis, F., Wolf, S. G., Caspi, M., Elbaum, M., Chelly, J. und Reiner, O.** (1999). Doublecortin, a stabilizer of microtubules. *Hum. Mol. Genet.* **8**, 1599-610.
- Hoyt, M. A., Totis, L. und Roberts, B. T.** (1991). *S. cerevisiae* genes required for cell cycle arrest in response to loss of microtubule function. *Cell* **66**, 507-17.
- Inoue, S.** (1997). The role of microtubule assembly dynamics in mitotic force generation and functional organization of living cells. *J. Struct. Biol.* **118**, 87-93.
- Kaller, M., Euteneuer, U. und Nellen, W.** (2006). Differential effects of heterochromatin protein 1 isoforms on mitotic chromosome distribution and growth in *Dictyostelium discoideum*. *Eukaryot. Cell* **5**, 530-43.
- Keller, L. C., Romijn, E. P., Zamora, I., Yates, J. R., 3rd und Marshall, W. F.** (2005). Proteomic analysis of isolated *chlamydomonas* centrioles reveals orthologs of ciliary-disease genes. *Curr. Biol.* **15**, 1090-8.
- Kellogg, D. R., Moritz, M. und Alberts, B. M.** (1994). The centrosome and cellular organization. *Annu. Rev. Biochem.* **63**, 639-74.
- Kessin, R. H.** (2003). Cell motility: Making streams. *Nature* **422**, 481-2.
- Khodjakov, A. und 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.
- Kim, M. H., Cierpicki, T., Derewenda, U., Krowarsch, D., Feng, Y., Devedjiev, Y., Dauter, Z., Walsh, C. A., Otlewski, J., Bushweller, J. H. et al.** (2003). The DCX-domain tandems of doublecortin and doublecortin-like kinase. *Nat. Struct. Biol.* **10**, 324-33.
- Kimmel, A. R. und Parent, C. A.** (2003). The signal to move: *D. discoideum* go orienteering. *Science* **300**, 1525-7.
- Koch, K. V., Reinders, Y., Ho, T. H., Sickmann, A. und Graf, R.** (2006). Identification and isolation of *Dictyostelium microtubule*-associated protein interactors by tandem affinity purification. *Eur. J. Cell Biol.*
- Koonce, M. P., Kohler, J., Neujahr, R., Schwartz, J. M., Tikhonenko, I. und Gerisch, G.** (1999). Dynein motor regulation stabilizes interphase microtubule arrays and determines centrosome position. *Embo J.* **18**, 6786-92.
- Koonce, M. P. und Samso, M.** (1996). Overexpression of cytoplasmic dynein's globular head causes a collapse of the interphase microtubule network in *Dictyostelium*. *Mol. Biol. Cell* **7**, 935-48.
- Krefft, M., Voet, L., Gregg, J. H., Mairhofer, H. und Williams, K. L.** (1984). Evidence that positional information is used to establish the prestalk-prespore pattern in *Dictyostelium discoideum* aggregates. *Embo J.* **3**, 201-206.
- Kuspa, A., Dingermann, T. und Nellen, W.** (1995). Analysis of gene function in *Dictyostelium*. *Experientia* **51**, 1116-23.

- Kyhse-Anderson, J.** (1984). Electrophoretic transfer 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.
- Lange, B. M., Bachi, A., Wilm, M. und Gonzalez, C.** (2000). Hsp90 is a core centrosomal component and is required at different stages of the centrosome cycle in *Drosophila* and vertebrates. *Embo J.* **19**, 1252-62.
- Leventer, R. J., Pilz, D. T., Matsumoto, N., Ledbetter, D. H. und Dobyns, W. B.** (2000). Lissencephaly and subcortical band heterotopia: molecular basis and diagnosis. *Mol. Med. Today* **6**, 277-84.
- Li, G., Alexander, H., Schneider, N. und Alexander, S.** (2000). Molecular basis for resistance to the anticancer drug cisplatin in *Dictyostelium*. *Microbiology* **146 (Pt 9)**, 2219-27.
- Li, J. B., Gerdes, J. M., Haycraft, C. J., Fan, Y., Teslovich, T. M., May-Simera, H., Li, H., Blacque, O. E., Li, L., Leitch, C. C. et al.** (2004). Comparative genomics identifies a flagellar and basal body proteome that includes the BBS5 human disease gene. *Cell* **117**, 541-52.
- Lin, C. H., Thompson, C. A. und Forscher, P.** (1994). Cytoskeletal reorganization underlying growth cone motility [published erratum appears in *Curr Opin Neurobiol* 1995 Feb;5(1):112]. *Curr. Opin. Neurobiol.* **4**, 640-7.
- Lloyd, P. G. und Hardin, C. D.** (1999). Role of microtubules in the regulation of metabolism in isolated cerebral microvessels. *Am. J. Physiol.* **277**, C1250-62.
- Malchow, D., Nagele, B., Schwarz, H. und Gerisch, G.** (1972). Membrane-bound cyclic AMP phosphodiesterase in chemotactically responding cells of *Dictyostelium discoideum*. *Eur J Biochem* **28**, 136-42.
- Mazia, D.** (1987). The chromosome cycle and the centrosome cycle in the mitotic cycle. *Int. Rev. Cytol.* **100**, 49-92.
- Murata, T., Sonobe, S., Baskin, T. I., Hyodo, S., Hasezawa, S., Nagata, T., Horio, T. und Hasebe, M.** (2005). Microtubule-dependent microtubule nucleation based on recruitment of gamma-tubulin in higher plants. *Nat. Cell Biol.* **7**, 961-8.
- Noegel, A. A. und Luna, J. E.** (1995). The *Dictyostelium* cytoskeleton. *Experientia* **51**, 1135-43.
- Ochiai, H., Schwarz, H., Merkl, R., Wagle, G. und Gerisch, G.** (1982). Stage-specific antigens reacting with monoclonal antibodies against contact site A, a cell-surface glycoprotein of *Dictyostelium discoideum*. *Cell Differ.* **11**, 1-13.
- Omura, F. und Fukui, Y.** (1985). *Dictyostelium* MTOC: Structure and linkage to the nucleus. *Protoplasma* **127**, 212-221.
- Pazour, G. J., Agrin, N., Leszyk, J. und Witman, G. B.** (2005). Proteomic analysis of a eukaryotic cilium. *J. Cell Biol.* **170**, 103-13.
- Pietromonaco, S. F., Seluja, G. A., Aitken, A. und Elias, L.** (1996). Association of 14-3-3 proteins with centrosomes. *Blood Cells Mol. Dis.* **22**, 225-37.
- Pihan, G. A., Purohit, A., Wallace, J., Knecht, H., Woda, B., Quesenberry, P. und Doxsey, S. J.** (1998). Centrosome defects and genetic instability in malignant tumors. *Cancer Res.* **58**, 3974-85.

- 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.
- Rabilloud, T.** (1996). Solubilization of proteins for electrophoretic analyses. *Electrophoresis* **17**, 813-29.
- Rabilloud, T., Adessi, C., Giraudel, A. und Lunardi, J.** (1997). Improvement of the solubilization of proteins in two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis* **18**, 307-16.
- Raff, J. W. und Glover, D. M.** (1989). Centrosomes, and not nuclei, initiate pole cell formation in *Drosophila* embryos. *Cell* **57**, 611-9.
- Raper, K. B.** (1935). *Dictyostelium discoideum*, a new species of slime mold from decaying forest leaves. *J. Agr. Res.* **50**, 135-147.
- Rehberg, M. und Gräf, R.** (2002). *Dictyostelium* EB1 is a genuine centrosomal component required for proper spindle formation. *Mol. Biol. Cell* **13**, 2301-10.
- Rehberg, M., Kleylein-Sohn, J., Faix, J., Ho, T. H., Schulz, I. und Gräf, R.** (2005). *Dictyostelium* LIS1 is a centrosomal protein required for microtubule/cell cortex interactions, nucleus/centrosome linkage, and actin dynamics. *Mol. Biol. Cell* **16**, 2759-71.
- Reinders, Y., Schulz, I., Gräf, R. und Sickmann, A.** (2005). Identification of novel centrosomal proteins in *D. discoideum* by comparative proteomic approaches. *Journal of Proteome Research* **5**(3), 589-598
- Rieder, C. L., Faruki, S. und Khodjakov, A.** (2001). The centrosome in vertebrates: more than a microtubule-organizing center. *Trends Cell Biol.* **11**, 413-9.
- Ross, P. L., Huang, Y. N., Marchese, J. N., Williamson, B., Parker, K., Hattan, S., Khainovski, N., Pillai, S., Dey, S., Daniels, S. et al.** (2004). Multiplexed protein quantitation in *Saccharomyces cerevisiae* using amine-reactive isobaric tagging reagents. *Mol. Cell Proteomics* **3**, 1154-69.
- Royle, S. J., Bright, N. A. und Lagnado, L.** (2005). Clathrin is required for the function of the mitotic spindle. *Nature* **434**, 1152-7.
- Sapir, T., Cahana, A., Seger, R., Nekhai, S. und Reiner, O.** (1999a). LIS1 is a microtubule-associated phosphoprotein. *Eur. J. Biochem* **265**, 181-8.
- Sapir, T., Eisenstein, M., Burgess, H. A., Horesh, D., Cahana, A., Aoki, J., Hattori, M., Arai, H., Inoue, K. und Reiner, O.** (1999b). Analysis of lissencephaly-causing LIS1 mutations. *Eur. J. Biochem* **266**, 1011-20.
- Sapir, T., Horesh, D., Caspi, M., Atlas, R., Burgess, H. A., Wolf, S. G., Francis, F., Chelly, J., Elbaum, M., Pietrokovski, S. et al.** (2000). Doublecortin mutations cluster in evolutionarily conserved functional domains. *Hum. Mol. Genet.* **9**, 703-12.
- Schaloske, R., Sordano, C., Bozzaro, S. und Malchow, D.** (1995). Stimulation of calcium influx by platelet activating factor in *Dictyostelium*. *J. Cell Sci.* **108** (Pt 4), 1597-603.
- Schliwa, M.** (1984). Mechanisms of intracellular organelle transport. *Cell Muscle Motil.* **5**, 1-82,403-6.
- Schliwa, M., Euteneuer, U., Gräf, R. und Ueda, M.** (1999). Centrosomes, microtubules and cell migration. *Biochem. Soc. Symp.* **65**, 223-31.

- Schliwa, M. und Höner, B.** (1993). Microtubules, centrosomes and intermediate filaments in directed cell movement. *Trends Cell Biol.* **3**, 377-380.
- Schliwa, M., van Blerkom, J. und Pryzwansky, K. B.** (1982). Structural organization of the cytoplasm. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **46**, 51-67.
- Schulz, I., Reinders, Y., Sickmann, A. und Gräf, R.** (2006). An improved method for *Dictyostelium* centrosome isolation. *Methods in molecular biology* im Druck.
- Sluder, G., Miller, F. J. und Rieder, C. L.** (1986). The reproduction of centrosomes: nuclear versus cytoplasmic controls. *J. Cell Biol.* **103**, 1873-81.
- Small, J. V., Geiger, B., Kaverina, I. und Bershadsky, A.** (2002). How do microtubules guide migrating cells? *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **3**, 957-64.
- Snyder, M.** (1994). The spindle pole body of yeast. *Chromosoma* **103**, 369-80.
- Sordano, C., Cristino, E., Bussolino, F., Wurster, B. und Bozzaro, S.** (1993). Platelet activating factor modulates signal transduction in *Dictyostelium*. *J. Cell Sci.* **104 (Pt 1)**, 197-202.
- Stearns, T.** (2001). Centrosome Duplication. A Centriolar Pas de Deux. *Cell* **105**, 417-20.
- Steinberg, G. und Fuchs, U.** (2004). The role of microtubules in cellular organization and endocytosis in the plant pathogen *Ustilago maydis*. *J. Microsc.* **214**, 114-23.
- Sultana, H., Rivero, F., Blau-Wasser, R., Schwager, S., Balbo, A., Bozzaro, S., Schleicher, M. und Noegel, A. A.** (2005). Cyclase-associated protein is essential for the functioning of the endo-lysosomal system and provides a link to the actin cytoskeleton. *Traffic* **6**, 930-46.
- Tanaka, T., Serneo, F. F., Higgins, C., Gambello, M. J., Wynshaw-Boris, A. und Gleeson, J. G.** (2004). Lis1 and doublecortin function with dynein to mediate coupling of the nucleus to the centrosome in neuronal migration. *J. Cell Biol.* **165**, 709-21.
- Tokuoka, S. M., Ishii, S., Kawamura, N., Satoh, M., Shimada, A., Sasaki, S., Hirotsune, S., Wynshaw-Boris, A. und Shimizu, T.** (2003). Involvement of platelet-activating factor and LIS1 in neuronal migration. *Eur J Neurosci* **18**, 563-570.
- Tonge, R., Shaw, J., Middleton, B., Rowlinson, R., Rayner, S., Young, J., Pognan, F., Hawkins, E., Currie, I. und Davison, M.** (2001). Validation and development of fluorescence two-dimensional differential gel electrophoresis proteomics technology. *Proteomics* **1**, 377-96.
- Tsukada, M., Prokscha, A., Oldekamp, J. und Eichele, G.** (2003). Identification of neurabin II as a novel doublecortin interacting protein. *Mech. Dev.* **120**, 1033-43.
- Tsukada, M., Prokscha, A., Ungewickell, E. und Eichele, G.** (2005). Doublecortin association with actin filaments is regulated by neurabin II. *J. Biol. Chem.* **280**, 11361-8.
- Ueda, M., Schliwa, M. und Euteneuer, U.** (1999). Unusual centrosome cycle in *Dictyostelium*: correlation of dynamic behavior and structural changes. *Mol. Biol. Cell.* **10**, 151-60.
- Unlu, M., Morgan, M. E. und Minden, J. S.** (1997). Difference gel electrophoresis: a single gel method for detecting changes in protein extracts. *Electrophoresis* **18**, 2071-7.
- Van Haastert, P. J. und Devreotes, P. N.** (2004). Chemotaxis: signalling the way forward. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **5**, 626-34.
- Vaughan, K. T.** (2005). Microtubule plus ends, motors, and traffic of Golgi membranes. *Biochim. Biophys. Acta* **1744**, 316-24.

- Wasteneys, G. O.** (2002). Microtubule organization in the green kingdom: chaos or self-order? *J. Cell Sci.* **115**, 1345-54.
- Wessel, D. und 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. und Gerisch, G.** (1997). Microfilament dynamics during cell movement and chemotaxis monitored using a GFP-actin fusion protein. *Curr. Biol.* **7**, 176-83.
- Whitehead, C. M., Winkfein, R. J. und Rattner, J. B.** (1996). The relationship of HsEg5 and the actin cytoskeleton to centrosome separation. *Cell Motil. Cytoskeleton* **35**, 298-308.
- Wigge, P. A., Jensen, O. N., Holmes, S., Soues, S., Mann, M. und Kilmartin, J. V.** (1998). Analysis of the *Saccharomyces* spindle pole by matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI) mass spectrometry. *J. Cell Biol.* **141**, 967-77.
- Williams, K. L. und Newell, P. C.** (1976). A genetic study of aggregation in the cellular slime mould *Dictyostelium discoideum* using complementation analysis. *Genetics* **82**, 287-307.
- Williams, R. S., Boeckleler, K., Gräf, R., Müller-Taubenberger, A., Li, Z., Isenberg, R. R., Wessler, D., Soll, D. R., Alexander, H. und Alexander, S.** (2006). Towards a molecular understanding of human diseases using *Dictyostelium discoideum*. *Trends Mol. Med.* im Druck.
- Winsor, B. und Schiebel, E.** (1997). Review: An overview of the *Saccharomyces cerevisiae* microtubule and microfilament cytoskeleton. *Yeast* **13**, 399-434.
- Xiang, X.** (2003). LIS1 at the microtubule plus end and its role in dynein-mediated nuclear migration. *J. Cell Biol.* **160**, 289-90.
- Yokoyama, K., Kaji, H., Nishimura, K. und Miyaji, M.** (1990). The role of microfilaments and microtubules in apical growth and dimorphism of *Candida albicans*. *J Gen Microbiol* **136**, 1067-75.
- Zhang, C., Hughes, M. und Clarke, P. R.** (1999). Ran-GTP stabilises microtubule asters and inhibits nuclear assembly in *Xenopus* egg extracts. *J. Cell Sci.* **112 (Pt 14)**, 2453-61.

## Anhang

**Tabelle 8: In der Centrosomenpräparation identifizierte Proteine.** Dictybase-Nummer (DDB), Name des Proteins und Methode, mit der es identifiziert wurde.

Proteinname (Funktion oder Lokalisation)	DDB	2D	16-BAC	iTraq
putative nuclear transport factor similar to nuclear transport factor 2	DDB0167060			x
CG5854 protein, nucleotide-sugar metabolism	DDB0167100	x		x
DDB0167169	DDB0167169	x		
DDB0168319	DDB0168319			x
nucleotide-sugar metabolism	DDB0169112			x
Long chain fatty acid CoA ligase	DDB0169220	x		
CCT chaperonin beta subunit	DDB0183841			x
DDB0183864 (Kern)	DDB0183864			x
Putative RNA helicase	DDB0184074			x
DDB0184253	DDB0184253	x		
ATP synthase F1 subunit alpha.	DDB0184316			x
Similar to cytochrome c-1	DDB0184465			x
ribosomal protein L36	DDB0185019			x
CABP1-related protein p31/p34	DDB0185023	x	x	x
clathrin heavy chain	DDB0185029			x
protein disulfide isomerase	DDB0185040			x
ubiquitin ligase subunit SKP1	DDB0185043			x
heat shock cognate protein Hsc70-2	DDB0185047			x
ANT-like protein, hsp32 (Kern)	DDB0185048			x
protein phosphatase type 1-like catalytic subunit	DDB0185058	x		x
40S ribosomal protein S4	DDB0185063		x	x
Gamma tubulin	DDB0185068	x		x
rps15a	DDB0185069			x
vacuolar H <sup>+</sup> -ATPase E subunit	DDB0185070			x
ribosomal protein L7	DDB0185073			x
GAPDH	DDB0185087			x
Guanine nucleotide-binding protein beta subunit-like protein (Cytoplasma)	DDB0185122	x		
NAD(+) ADP-ribosyltransferase-3	DDB0185173			x
vacuolar H <sup>+</sup> ATPase B subunit	DDB0185207			x
porin	DDB0185213			x
vacuolar ATPase subunit DVA41	DDB0185227			x
Elongation factor 1-gamma	DDB0185297	x		
Eukaryotic translation elongation factor 1 gamma	DDB0185297			x
M04G12.2 protein (Proteolyse)	DDB0185484			x
Cytochrome b	DDB0185740	x		
SapA Fragment (Lysosom)	DDB0185956			x
Similar to ribose-phosphate pyrophosphokinase	DDB0186131			x
P47985 Ubiquinol-cytochrome c reductase iron-sulfur subunit, mitochondrial precursor	DDB0186273			x
DDB0186471 (Nucleinsäure-bindend)	DDB0186471		x	

Proteinname (Funktion oder Lokalisation)	DDB	2D	16-BAC	iTraq
DDB0186654 (Kern)	DDB0186654			x
ribosomal protein L18a	DDB0186729			x
Peroxisomal targeting signal-1 receptor	DDB0186780	x		
DEAD-box protein abstrakt (DNA Helikase)	DDB0187443	x		
DDB0187447	DDB0187447			x
P14326 Vegetative specific protein H5	DDB0187546			x
BC5V2_0_00400, methyltransferase	DDB0187734			x
DDB0187822 (Glycolysis)	DDB0187822	x		
Ubiquitin-conjugating enzyme E2	DDB0188059	x		
DDB0188190	DDB0188190			x
RE62270p, putative coatomer	DDB0188394			x
Ubiquitin/actin fusion protein 2.	DDB0188457			x
DDB0188558 (Lysosom)	DDB0188558			x
DDB0188657	DDB0188657			x
DDB0188761 (Transkriptionfaktor)	DDB0188761			x
DDB0188920	DDB0188920	x		
aktin binding protein	DDB0188978			x
DDB0189496	DDB0189496			x
methyltransferase	DDB0189501			x
Phospholipase	DDB0189754	x		x
DDB0189869(DNA Helikase)	DDB0189869			x
Microtubule-associated protein CP224	DDB0189914	x	x	
DDB0190611	DDB0190611	x		x
DDB0190639 (sno RNA Metabolismus)	DDB0190639			x
ATP synthase beta-subunit	DDB0190669			x
RNA helicase	DDB0190682			x
fttB, 14-3-3 protein	DDB0190707			x
DDB0190801 (Zink-bindend)	DDB0190801	x		
penta EF hand calcium binding protein A	DDB0191092			x
60S ribosomal protein L3	DDB0191094		x	x
putative CMF receptor CMFR1	DDB0191095			x
Flavohemoglobin	DDB0191099	x		
ADP-ribosylation factor	DDB0191101			x
coronin	DDB0191115			x
elongation factor 1 alpha	DDB0191134			x
Histone H3	DDB0191157			x
heat shock cognate protein, hsc90, hsp90	DDB0191163		x	
rps10	DDB0191166			x
beta tubulin	DDB0191169			x
elongation factor 1 beta	DDB0191174	x		
cap34, actin capping protein	DDB0191243			x
profilin II	DDB0191249			x
se type 1-like catalytic subunit	DDB0191258			x
major vault protein-alpha	DDB0191259			x
Similar to ATP-dependent, RNA helicase	DDB0191262			x
cystathionine beta-synthase	DDB0191292			x

Proteinname (Funktion oder Lokalisation)	DDB	2D	16-BAC	iTraq
phosphoglucomutase A	DDB0191348			x
Putative elongation factor	DDB0191363			x
alpha tubulin	DDB0191380			x
Calreticulin precursor (ER, Phagozytose)	DDB0191384	x		
H(+)-transporting ATPase	DDB0191419			x
NADH dehydrogenase	DDB0191420			x
HIV1 TAT-binding protein	DDB0191435			x
Myosin (Fragment)	DDB0191444			x
Spindle pole body component 98	DDB0191482		x	x
rps17	DDB0191513			x
Small aggregate formation protein (Cytosol)	DDB0191525			x
talin homologue	DDB0191526			x
40S ribosomal protein S9	DDB0191528			x
DDB0191699 (Zink-bindend)	DDB0191699		x	x
DDB0191988	DDB0191988	x		x
DDB0192051	DDB0192051	x		
BAER450Cp (Mitochondrienmembran)	DDB0192069			x
actin binding protein, filamin	DDB0201554			x
kinesin family member 13 (Eg5-Homolog)	DDB0201557	x		
ADP/ATP translocase	DDB0201558			x
vacuolar H <sup>+</sup> -ATPase A subunit	DDB0201563			x
rpl11	DDB0201601			x
rps7	DDB0201604			x
rpl14	DDB0201610			x
rpl6	DDB0201614			x
p21-Arc	DDB0201632			x
60S ribosomal protein L27a	DDB0201638			x
vegetative specific protein H4	DDB0201644			x
glutamine amidotransferase	DDB0201646			x
40S ribosomal protein S3	DDB0201667			x
methyltransferase	DDB0202301			x
P25087 Sterol 24-C-methyltransferase	DDB0202574			x
Putative FK506-binding protein	DDB0203130			x
DDB0204075	DDB0204075			x
DDB0204076	DDB0204076			x
DDB0204297 (RNA Prozessierung)	DDB0204297			x
DDB0204561	DDB0204561	x		
CCT chaperonin gamma subunit.	DDB0204641			x
AhpC/TSA family protein	DDB0204808			x
Interaptin	DDB0204990	x		x
MNG10, small nucleolar ribonucleoprotein complex	DDB0205232			x
Ribosomal protein L7AE-like	DDB0205289			x
ATP citrate lyase	DDB0205389			x
DDB0205913	DDB0205913			x
Polyubiquitin	DDB0206057			x
DDB0206211 (Calcium-bindend)	DDB0206211	x	x	x

Proteinname (Funktion oder Lokalisation)	DDB	2D	16-BAC	iTraq
DDB0206256	DDB0206256			x
DDB0206497	DDB0206497			x
NAD+ dependent glutamate dehydrogenase	DDB0206512			x
34 kDa actin binding protein	DDB0214810			x
Myosin light chain kinase	DDB0214815	x		
60S ribosomal protein L19	DDB0214854			x
alanyl-tRNA synthetase	DDB0214894			x
ubiquitin	DDB0214921			x
Ub52	DDB0214925			x
ARP2/3 complex 34 kDa subunit	DDB0214935			x
60S ribosomal protein L28	DDB0214936		x	x
glycoprotein 130	DDB0214937			x
orfSGP	DDB0214941			x
1,4-alpha-glucan branching enzyme	DDB0214943			x
bifunctional UMP-synthetase	DDB0214958			x
cofilin	DDB0214987			x
formin homology domain-containing protein, actin-binding protein	DDB0214996			x
cysteine proteinase	DDB0215002			x
cathepsin D	DDB0215012			x
DnaJ homologue with dual localization in the cytoplasm and cortex	DDB0215016	x		x
GMP synthetase	DDB0215334			x
rps25	DDB0215350			x
penta EF hand calcium binding protein B	DDB0215364			x
mitochondrial Hsp70 precursor	DDB0215366			x
coactosin, cyclic AMP-regulated protein	DDB0215369			x
cluA, Putative eukaryotic translation initiation factor	DDB0215379			x
ribosomal protein S2	DDB0215391			x
GTP-binding nuclear protein RAN/TC4	DDB0215409	x	x	x
Imidazoleglycerol-phosphate synthase subunit H-like	DDB0215963	x		x
SppA	DDB0216187			x
Ras GTPase	DDB0216229			x
DD-1 similar to protein kinase C inhibitor	DDB0216234			x
histone H2A	DDB0216271			x
histone H4	DDB0216310			x
hypoxanthine phosphoribosyltransferase	DDB0216388			x
Rubredoxin reductase	DDB0216426			x
membrane, AS transport	DDB0216590			x
DDB0216598	DDB0216598			x
Exoenzyme S	DDB0217192	x		
JC2V2_0_01443 (ribosomal)	DDB0217404			x
DDB0218175 (RNA Prozessierung)	DDB0218175			x
Polyubiquitin	DDB0218177			x
Probable 60S ribosomal protein L37-A	DDB0218763			x
DDB0218791 (Mitochondrien, Elektronentransport)	DDB0218791			x
MKIAA0187 protein, similar to ribosome assembly	DDB0219277			x
Putative 2-oxoglutarate dehydrogenase E1 component	DDB0219311			x

Proteinname (Funktion oder Lokalisation)	DDB	2D	16-BAC	iTraq
DD-1 protein, pki	DDB0219436			x
Elongation factor Tu (EC 3.6.1.48)	DDB0219464			x
P07830 Actin 15 (Actin A8)	DDB0219536			x
DDB0219564	DDB0219564			x
Cysteine proteinase 1 precursor (EC 3.4.22.-)	DDB0219654	x		
3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA-synthase	DDB0219924	x		
actin-like protein	DDB0219936			x
esterase/lipase/thioesterase domain-containing protein	DDB0220110			x
discoidin I, D chain	DDB0220114			x
Actin	DDB0220447	x	x	x
ubiquitin activating enzyme E1	DDB0220497			x
citrate synthase, mitochondrial	DDB0220638			x
eukaryotic translation initiation factor 2 alpha (eIF2alpha)	DDB0229412			x
cathepsin L-like proteinase	DDB0229857			x
DDB0229861, putative countin receptor Cnr4	DDB0229861	x		
putative O-methyltransferase	DDB0229909			x
putative O-methyltransferase	DDB0229910			x
60S ribosomal protein L13	DDB0229951		x	x
rpl15	DDB0229953			x
ribosomal protein L18	DDB0229960			x
Non-ribosomal peptide synthetase	DDB0229962			x
GTP-binding protein Sar1A (Transport Er zu Golgi)	DDB0229965			x
putative mitochondrial substrate carrier	DDB0229992			x
Polyethylene glycol dehydrogenase	DDB0230016			x
40S ribosomal protein S5	DDB0230022			x
40S ribosomal protein S8	DDB0230025		x	x
rps14	DDB0230056			x
sulfate adenylyltransferase	DDB0230064			x
S-adenosylmethionine synthetase	DDB0230070			x
putative fatty acid synthase	DDB0230071			x
serine hydroxymethyltransferase	DDB0230072			x
phosphoribosylamine-glycine ligase	DDB0230084			x
AICAR transformylase / IMP cyclohydrolase	DDB0230095			x
inosine-5'-monophosphate dehydrogenase	DDB0230098			x
asparagine synthetase	DDB0230140			x
ribosomal protein L22	DDB0230146			x
ribosomal protein L23	DDB0230148			x
Ribosomal protein L23a	DDB0230149			x
ribosomal protein L27	DDB0230153			x
rpl29	DDB0230154			x
CTP synthase	DDB0230162			x
Malate dehydrogenase	DDB0230188			x
2-oxoglutarate dehydrogenase E2 component	DDB0230198			x
rps16	DDB0231057			x
rps18	DDB0231058			x
40S ribosomal protein S19-3	DDB0231059			x

Proteinname (Funktion oder Lokalisation)	DDB	2D	16-BAC	iTraq
40S ribosomal protein S23	DDB0231063		x	x
40S ribosomal protein S26	DDB0231064			x
40S ribosomal protein S27	DDB0231065			x
phosphoenolpyruvate carboxykinase	DDB0231108			x
histone H3	DDB0231141			x
60S ribosomal protein L31	DDB0231149			x
ribosomal protein L32	DDB0231150		x	x
ribosomal protein L10E	DDB0231191		x	
ribosomal protein L13a	DDB0231192			x
60S ribosomal protein L4	DDB0231241		x	x
transketolase, glycolaldehydtransferase	DDB0231244			x
threonyl-tRNA synthetase	DDB0231248			x
isoleucyl-tRNA synthetase	DDB0231258			x
rpl9	DDB0231259			x
glucose 6-phosphate-1-dehydrogenase	DDB0231285			x
seryl-tRNA synthetase	DDB0231305			x
aspartyl-tRNA synthetase	DDB0231308			x
asparagine-tRNA ligase	DDB0231333			x
60S ribosomal protein L6	DDB0231338		x	
60S ribosomal protein L7a	DDB0231339			x
Rac guanyl-nucleotide exchange factor (Zellcortex)	DDB0231342			x
phosphoglycerate mutase	DDB0231354			x
tryptophan 2,3-dioxygenase	DDB0231363			x
4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase	DDB0231604	x		
fumarylacetoacetase	DDB0231609			x
peroxiredoxin	DDB0231647			x
putative glycophosphotransferase	DDB0231863			x
GlycosylTRansferase	DDB0231973			x
Phox domain containing protein	DDB0232211		x	
putative actin binding protein	DDB0232276	x		x
Hsp-70-related intracellular vitamin D binding protein (DNA Reparatur)	DDB0232925			x
inner centromere p., binding to aurora-related kinase	DDB0232941		x	
Severin	DDB0232954	x		x
PSMD1 protein, Fragment (Ubiquitin-abhängigen Proteincatabolismus)	DDB0232977			x
Q13200 26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 2 (26S proteasome regulatory subunit S2)	DDB0232978			x
21D7, endopeptidase	DDB0232980			x
DDB0232994 (Ubiquitin-abhängigen Proteincatabolismus)	DDB0232994			x
ribosomal protein L35	DDB0231152			x

**Tabelle 9: Anreicherungsfaktoren der identifizierten Proteine, die als centrosomal oder als unbekannt eingestuft wurden.** 1-3: bekannte Proteine des *Dictyostelium*-Centrosoms, 4-11: aus anderen Organismen bekannte Centrosomale Proteine, 12-44: Kandidaten für neue centrosomale Proteine.

	Name (Homologie oder Funktion)	DDB	2D-DIGE	2D-Silber	BAC-DIGE	BAC-Silber	iTRAQ
1	Gamma tubulin	DDB0185068	1,60	1,90			(1,4)
2	Microtubule-associated protein CP224	DDB0189914	4,30		3,00		
3	Spindle pole body component 98	DDB0191482				2,00	2,1
4	fttB, 14-3-3 protein	DDB0190707					2,5
5	heat shock cognate protein, hsc90, hsp90	DDB0191163				4,50	12,1
6	beta tubulin	DDB0191169					3,2
7	protein phosphatase type 1-like catalytic subunit	DDB0191258					3,6
8	alpha tubulin	DDB0191380					5,8
9	kinesin family member 13 (Eg5 Homolog)	DDB0201557	2,80				
10	GTP-binding nuclear protein RAN/TC4	DDB0215409	1,50	5,30		4,90	7,1
11	ubiquitin activating enzyme E1	DDB0220497					(1,3)
12	DDB0167169 (unbekannt)	DDB0167169	6,2				
13	DDB0168319 (unbekannt)	DDB0168319					3,3
14	DDB0184253 (unbekannt)	DDB0184253		10,20			
15	CABP1-related protein p31/p34	DDB0185023	3,2	5,0	9,0	4,8	3,4
16	clathrin heavy chain	DDB0185029					9,1
17	heat shock cognate protein Hsc70-2	DDB0185047					1,7
18	DDB0187447 (unbekannt)	DDB0187447					2,7
19	DDB0188190 (unbekannt)	DDB0188190					1,7
20	DDB0188657 (unbekannt)	DDB0188657					1,6
21	DDB0188920 (unbekannt)	DDB0188920	1,50				
22	DDB0189496 (unbekannt)	DDB0189496					18,0
23	DDB0190611 (catalytic activity)	DDB0190611		13,80			36,4
24	DDB0190801 (zink ion binding)	DDB0190801	2,20				
25	major vault protein-alpha	DDB0191259					1,8
26	DDB0191699 (zink ion binding)	DDB0191699				1,80	1,5
27	DDB0191988 (protein folding)	DDB0191988	7,20				(1,3)
28	DDB0192051 (putative vesicular transport)	DDB0192051	2,60				
29	DDB0204075 (unbekannt)	DDB0204075					11,2
30	DDB0204076 (unbekannt)	DDB0204076					24,0
31	DDB0204561 (unbekannt)	DDB0204561		3,50			
32	DDB0205913 (unbekannt)	DDB0205913					2,1
33	DDB0206211 (calcium ion binding)	DDB0206211	3,10	3,80		3,20	(1,1)
34	DDB0206256 (unbekannt)	DDB0206256					3,0
35	DDB0206497 (unbekannt)	DDB0206497					5,2
36	orfSGP (unbekannt)	DDB0214941					5,3
37	heat shock protein (DnaJ homologue with dual localization in the cytoplasm and cortex)	DDB0215016		4,50			2,2
38	DD-1 pro (similar to protein kinase C inhibitor)	DDB0216234					3,0
39	DDB0216598 (unbekannt)	DDB0216598					2,4
40	DD-1 protein (pki)	DDB0219436					3,0
41	DDB0219564 (unbekannt)	DDB0219564					2,6
42	DDB0229861 (putative countin receptor Cnr4)	DDB0229861	1,50				
43	Phox domain containing protein (signal transduction)	DDB0232211				2,00	
44	DDB0232941 (inner centromere protein)	DDB0232941				1,50	

---

## Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name: Irene Schulz  
Geburtsdatum: 04.07.1976, München

### Schulbildung

1982-1986 Ostpreussen-Grundschule, München  
1986-1995 Wilhelm-Hausenstein-Gymnasium, München  
06/1995 Allgemeine Hochschulreife

### Hochschulausbildung

10/1995-03/2001 Studium der Biologie an der LMU in München:  
Hauptfach Zoologie (zellbiologische Orientierung),  
Nebenfächer Genetik, Biochemie, Ökologie

11/1997 Vordiplomprüfungen

03/1998-04/1998 studentische Hilfskraft in der Arbeitsgruppe von Prof. M. Schliwa  
am Adolf-Butenandt Inst. f. Zellbiologie der LMU

07/1998-03/1999 studentische Hilfskraft in der Arbeitsgruppe von Prof. C. David  
am Zoologischen Institut der LMU

02/2000-11/2000 Diplomarbeit in der Arbeitsgruppe von PD Dr. G. Steinberg am  
genetischen Institut der LMU (Thema: Einfluss molekularer  
Motoren auf Organisation und Dynamik der Interphase-  
Mikrotubuli in *Ustilago maydis*)

03/2001 Diplomhauptprüfungen

04/2001-05/2001 Wiss. Mitarbeiterin bei PD Dr. G. Steinberg am MPI für  
terrestrische Mikrobiologie in Marburg

06/2001-08/2006 Promotionsstudium in der Arbeitsgruppe von PD Dr. R. Gräf  
(Abt. Prof. Dr. M. Schliwa) am Adolf-Butenandt Inst. f.  
Zellbiologie der LMU

## Danksagung

Vielen Dank an Prof. Manfred Schliwa für sein stetes Interesse an meiner Arbeit und seine Unterstützung. Außerdem danke ich ihm und seiner Frau Usch für das kritische Lesen dieser Arbeit.

Ein besonders großes Dankeschön an den Meister, Dr. (bald Prof.) Ralph Gräf! Einen besseren Betreuer kann man sich gar nicht vorstellen. Immer für einen da, immer geduldig und immer mit vollem Eifer mit Rat und Tat dabei. Nur sein Musikgeschmack... Es hat wirklich Spaß gemacht, in seinem Labor zu arbeiten.

Aber dazu haben natürlich auch noch andere beigetragen. Daher viele Dank auch an meine lieben Labor-Kollegen Katrin Koch, Markus Rehberg, Andrea Hestermann (wo auch immer sie gerade steckt), Christine Daunderer und die drei Praktikanten, die alle treu zur Diplomarbeit zurückgekehrt sind, Julia Kleylein-Sohn, Matthias Samereier und Sebastian Weidenthaler.

Und was hätte ich nur ohne Thi-Hieu Ho gemacht? Und damit meine ich nicht nur, dass sie eine fantastische TA ist, die mir immer so viel abgenommen hat, wie sie nur konnte. Nein, vielleicht wichtiger ist, dass sie immer für mich da war und mir zugehört hat, egal ob ich gerade über Frust bei der Arbeit oder über Liebeskummer klagte. Liebe Hieu, vielen, vielen Dank!

Dann natürlich die ganzen Mädels: Bettina Ebbing, Renate Dombi, Jolante Reth, Zeynep Oekten und Maria Beer. Vielen Dank für die gute Laune, die vielen kleinen Gefallen und dass ihr mich nie habt verhungern lassen, wenn ich mal wieder vor lauter Centrosomenpräppen zu nichts gekommen bin!

Vielen Dank auch an Michael Schleicher, dessen Tür immer für mich offen war und wo ich mir jederzeit Tipps und Hilfestellungen abholen konnte. Das gleiche gilt auch für Hans Faix und Annette Müller-Taubenberger, auch wenn sie gar keine Tür hatten.

Bedanken möchte ich mich auch bei Meino Rohlfs und den übrigen fleißigen Dicty-Forschern, sowie den ganzen Schliwas für die gute Zusammenarbeit und das gute Klima im Institut.

Aber ich möchte auch nicht vergessen, wie es am Anfang war und dass ich einige Kollegen am Institut überlebt habe. Vielen Dank daher auch an Christian Horn, Andi Schneider und Lars Israel, die mir meinen Start im Labor versüßt haben. Ich habe es sehr bedauert, dass sie das Institut verließen und das nicht nur, weil die Computer dann nicht mehr so richtig liefen.

Zu guter Letzt ein riesiges Dankeschön an meine Eltern für ihre moralische wie finanzielle Unterstützung und an Sascha Meyer für sein geduldiges Korrekturlesen und seine Nachsicht, wenn ich wieder mal wegen eines schiefgelaufenen Experiments unausstehlich war.

Vielen Dank Euch allen!