

1. Deutsche Zusammenfassung

Der Basalapparat der zellwandlosen einzelligen Grünalge *Spermatozopsis similis* besteht aus zwei Basalkörpern (9 MT-Triplets) und verschiedenen basalkörperassoziierten Strukturen. Dort dient je ein Basalkörper als Nukleationsort für die Bildung eines Axonemas (9 MT-Dupletts + 2 zentrale MT-Röhren). Der Basalapparat organisiert außerdem eine definierte Anzahl von zellulären Mikrotubuli in Gestalt der zwei- und fünfsträngigen Geißelwurzeln, die mit Zellorganellen (Augenfleck, kontraktile Vakuole und Golgiapparat) assoziiert sind. Hierdurch verleiht der Basalapparat der Zelle sowohl Polarität als auch Form und organisiert intrazelluläre Strukturen. Die beiden Basalkörper sind mit einer Vielzahl von Fibrillen (System-I-, System-II-, s- und d-Fibrillen) unterschiedlicher Ultrastruktur und biochemischer Zusammensetzungen (Centrin, SF-Assemblin, 90 kDa- und 95 kDa-Protein) verbunden, sowie mit der Plasmamembran, den mikrotubulären Geißelwurzeln und dem Zellkern (Ringo, 1967), (Geimer, 1998b). Die Fibrillen sind an den Basalkörpern nicht symmetrisch verteilt und haben weder gleiche Größen noch Formen. Die Information für den Aufbau einer solchen Polarität (longitudinal und lateral) bzw. für die Links-Rechts-Asymmetrie der Fibrillen liegt wahrscheinlich in den verschiedenen Komponenten, die den Basalapparat aufbauen. Möglicherweise spielen posttranslational modifizierte Tubuline eine entscheidende Rolle bei der Positionierung der Fibrillen an den Mikrotubuli-Triplets der Basalkörper und sind somit für den Aufbau des polaren asymmetrischen Basalapparates verantwortlich. Der Basalapparat von *Spermatozopsis similis* ist besonders geeignet, mögliche strukturelle als auch funktionelle Aufgaben modifizierter Tubuline verstehen zu lassen, da er in großem Maßstab hochrein isoliert werden kann und seine Ultrastruktur genau charakterisiert ist (Melkonian und Preisig, 1984), (Geimer, 1998b).

Zur Identifizierung der verschiedenen Tubuline – auch von möglichen neuen, bisher unbekanntem Modifikationen – wurden zunächst monoklonale Antikörper gegen Tubuline aus dem Basalapparat von *S. similis* hergestellt. Nach Subklonierung konnten 30 Zellkulturlinien etabliert werden, die monoklonale Antikörper gegen Tubulin (1D-Immunoblot) aus dem Basalapparat von *S. Similis* produzierten.

Die Trennung modifizierter Tubuline im 2D-PAGE wurde im Rahmen dieser Arbeit durch eine isoelektrische Fokussierung mit immobilisierten pH-Gradienten (IPG) optimiert. Die α -Tubulin-Bande konnte erstmals in mind. 27 und die β -Tubulin-Bande in mind. 17 einzeln voneinander separierte Proteine aufgetrennt werden. So konnten 2D-Western-Blots immunologisch mit den hier produzierten monoklonalen Antikörpern sowie mit bekannten Antikörpern gegen Tubulinmodifikationen untersucht werden.

Desweiteren wurden die Einzelpunkte der Tubulin-Banden (Isoformen) massenspektrometrischen Untersuchungen unterzogen. Die Ergebnisse weisen auf eine bislang unbekanntem Vielfalt von möglichen Modifikationen am Tubulin hin. So beschränken sich die Modifikationen nicht wie bisher angenommen nur auf den C-Terminus. Außerdem zeigte die Massenspektrometrie erstmals eine Glycinylierung der Aminosäure Glutamin auf. Die modifizierten Aminosäuren liegen in Bereichen des Tubulin-Dimers, die Bindungen mit anderen Proteinen oder Substanzen eingehen, die Interaktionen zwischen den Dimeren im Mikrotubulus regulieren und in der Nukleotid-Bindungstasche.

Zur Bestimmung der genauen Lokalisation im Basalapparat wurden die monoklonalen Antikörper für Immunfluoreszenzmikroskopie verwendet. Anhand der Ergebnisse der Immunfluoreszenz ließen sich die monoklonalen Antikörper in drei Gruppen einteilen: eine Gruppe von Antikörpern markierte das komplette Cytoskelett, eine weitere Gruppe lokalisierte spezifisch im Basalapparat, und eine dritte Gruppe führte zu Fluoreszenzsignalen im Basalapparat und mikrotubulären Geißelwurzeln.

Ein neues Protein des Basalapparates, bei dem es sich nicht um ein Tubulin handelt, konnte mit dem monoklonalen Antikörper # 1 identifiziert werden.

2. Englische Zusammenfassung / Abstract

The microtubular cytoskeleton of the unicellular green flagellate *Spermatozopsis similis* consists of two axonemes, two basal bodies (centrioles) and microtubular flagellar roots which run from the basal bodies down into the cell body. A variety of fibers are associated with these basal bodies. Some fibers connect the pair of basal bodies (e.g. distal connecting fiber), others link the basal bodies to the plasma membrane (e.g. transitional fibers) and others act as linkers between basal bodies and root microtubules (e.g. s-fiber). However, the molecular basis of this fibre diversity is unknown. The fibers are distributed in a left-right asymmetry. For *S. similis*, a method has been developed to obtain pure preparations of intact basal apparatus. This enabled the identification of several proteins from isolated algal basal bodies, which have then been mapped to various ultrastructural features. Centrin, SF-Assemblin, BAp95, BAp90 and BAp210 were discovered as components of different filament types. Hence, the basal apparatus of *S. similis* is a useful model system to analyze how basal apparatus proteins target to the basal body.

The prominent ultrastructural feature of centrioles/basal bodies is the presence of triplet microtubules. The multiple tubulin genes of protists often code for very similar or even identical proteins. Thus, posttranslational modifications provide an important mechanism for generation of tubulin diversity. To identify the molecular basis for interaction of specific basal body proteins with particular regions of each basal body, it is essential to know whether specific isoforms or different types of tubulin confer positional information to the basal body.

In the present work, I have approached the question of tubulin diversity in *S. similis* by generating monoclonal antibodies (mab) raised against tubulin from isolated basal apparatuses (~50 kDa protein electroeluted from acrylamid band). My objective was to recover the full diversity of possible antibodies to known and unknown tubulin modifications. Therefore, 30 monoclonal antibodies were successfully sub-cloned and 68 more remained at the stage of hybridoma supernatant and all these showed specific reactions in immunoblotting studies.

A high-resolution two-dimensional gel electrophoresis (2D) revealed that forms of α - and β -tubulin existed in multiple charge variants. At least 27 isoelectric variants of α -tubulin and 17 of β -tubulin were separated. The new monoclonal antibodies, as well as commercially available antibodies against tubulin and tubulin-modifications were characterized by 2D-immunoblotting. Mass spectrometric analyses of 2D separated tubulinspots, indicated an extensive diversity of posttranslational modifications. These modifications occur not only at the carboxy-terminal domain of $\alpha\beta$ -tubulins, as was previously postulated, but occur frequently within the molecule. All modifications discovered are located at specific sites which are known to mediate association with other proteins or agents or interactions within the MT.

To analyze the sub cellular distribution of posttranslational modifications in basal apparatuses, the isolated monoclonal antibodies were characterized by immunofluorescence. In immunofluorescence studies, 13 antibodies labelled all microtubules within the cell, 12 were specific for the basal bodies, 3 stained the basal bodies and the microtubular roots and the remaining 2 antibodies showed no signal.

With the monoclonal antibody #1 we identified a new protein as a component of the basal apparatus.