

**GFP-Markierung von Cytoskelettproteinen
in *Chlamydomonas reinhardtii*
(Chlorophyceae)**

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von
Jutta Schoppmeier
aus Köln

Köln 2004

Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. K.-F. Lehtreck

Prof. Dr. K. Harter

Tag der mündlichen Prüfung: 07.07.2004

Kurzzusammenfassung

Die Fusion von „green fluorescent protein“ (GFP) an Proteine ist eine geeignete Methode zur Untersuchung von dynamischen Prozessen *in vivo*. Die Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* ist ein Modellorganismus für die Analyse der eukaryotischen Geißel. In dieser Arbeit sollte die GFP-Technik für die Analyse von Proteinen des Basalapparates der Geißel untersucht werden. „Striated fiber assemblin“ (SFA), Centrin und „deflagellation induced protein of 13 kDa“ (DIP13), wurden N- (nur SFA) und C-terminal mit GFP fusioniert und stabil in *C. reinhardtii* transformiert.

SFA ist Hauptbestandteil der quergestreiften Mikrotubuli-assoziierten Fasern (SMAFs). GFP-markiertes SFA wurde in diese Fasern eingebaut. N-terminal mit GFP fusioniertes SFA glich in seinen Eigenschaften dem Wildtypprotein und die Länge der Fasern nahm mit der Expressionsstärke zu. Die Kopfdomäne von SFA wird für die Faserbildung benötigt; „Photobleaching“-Experimente sprechen gegen eine ausgeprägte Dynamik der Fasern. Die C-terminale GFP Fusion von SFA besaß eine erhöhte Löslichkeit, und die Polymere waren instabil bei höheren Temperaturen. Die Analyse von *Chlamydomonas* Mutanten zeigte, dass die Anordnung der GFP-SFA Polymere von der Basalkörperanzahl und der Centrinmenge beeinflusst wird. Das Calcium-bindende Protein Centrin ist in den „nucleus basal body connectors“ (NBBCs) und der Verbindungsfibrille zwischen den Basalkörpern lokalisiert. Hier wurde bei moderater Expression auch Centrin-GFP nachgewiesen. Überexpression führte zum Abbau der NBBCs, während die Verbindungsfibrille stabil war. In Induktionsversuchen wird das Fusionsprotein zunächst nur in die NBBCs eingebaut. Die Ergebnisse zeigten, dass Centrinfilamente unterschiedliche molekulare Eigenschaften besitzen. *In vivo* Beobachtungen zeigten weiterhin, dass die NBBCs elastisch sind.

DIP13 ist homolog zum humanen Autoantigen NA14 und im Basalapparat lokalisiert; hier war auch DIP13-GFP zu finden. Allerdings führte die Überexpression dieses Fusionsproteins zu Aggregatbildung, Reduktion des Wildtypproteins und einem veränderten Phänotyp, der durch verlangsamtes Zell- und Geißelwachstum sowie dem Fehlen von Geißeln und erhöhter Letalität gekennzeichnet war.

Obwohl die GFP-Markierung die Eigenschaften der untersuchten Proteine veränderte, konnten neue Informationen zur Funktion der Proteine und der aus ihnen gebildeten Strukturen gewonnen werden.

Abstract

Fusion of green fluorescent protein (GFP) to proteins is a powerful method to investigate dynamic processes in vivo. The green flagellate *Chlamydomonas reinhardtii* is a model organism for studying the eukaryotic flagella. In this work the GFP-tagging of proteins was employed in order to analyse proteins of the flagellar basal apparatus. Striated fiber assembling (SFA), centrin and deflagellation induced protein of 13 kDa (DIP13) were tagged with GFP at the C-terminal domain. In addition SFA was tagged at the N-terminal domain. The chimeric genes were stably transformed in *C. reinhardtii*.

SFA is the mayor component of the striated microtubule associated fibers (SMAFS). GFP tagged SFA was incorporated into this fibers. N-terminal tagged SFA had similar properties like the wild-type protein. The length of the fibers increased with the strength of expression. The head domain of SFA is essential for fiber formation and photo-bleaching experiments did not show a pronounced dynamic of the fibers. The C-terminally GFP-tagged SFA showed an increased solubility and the polymers were unstable at higher temperatures. The correct number and arrangement of the fibers depended on the number of basal bodies and the amount of centrin as revealed by analysis of *C. reinhardtii* mutants. Centrin, a calcium binding protein, is localized in the nucleus basal body connectors (NBBCs) and the distal connecting fiber interconnects the two basal bodies. Moderate levels of expression allowed centrin-GFP to be incorporated into these structures. Over-expression of centrin-GFP disrupted the NBBCs whereas the connecting fiber was not affected. Shortly after induction of centrin-GFP the fusion-protein was observed at the NBBCs but was absent from the connecting fiber. In vivo observations using a strain with moderate centrin-GFP expression revealed flexible properties of the NBBCs.

Wild-type DIP13, a homolog to human autoantigen NA14, as well as the GFP-fusion were located in the flagellar basal apparatus. However over-expression of DIP13-GFP resulted in aggregation of the protein, a reduced amount of wild-type protein and an altered phenotype. The cells had shorter flagella or even lacked flagella, cell growth was delayed, and lethality was increased.

Although GFP-tagging alters the properties of the analysed proteins, this work gained new insights in the functions of the proteins and of the structures that are build out of these proteins.

Inhaltsverzeichnis	
Abbildungsverzeichnis	V
Tabellenverzeichnis	VI
Abkürzungsverzeichnis	VII
1 Einleitung	1
1.1 Einführung	1
1.2 Der Basalapparat und die Geißel von <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	3
1.3 SF-Assemblin	5
1.4 Centrin	6
1.5 DIP13	7
1.6 <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> als Modellorganismus	8
1.7 „Green Fluorescent Protein“ (GFP)/GFP in <i>C. reinhardtii</i>	10
1.8 Ziele dieser Arbeit	12
2 Material und Methoden	14
2.1 Materialien	14
2.1.1 Antikörper und deren Verdünnung	14
2.1.2 Verwendete „Kits“	14
2.2 Algenstämme und Kulturbedingungen	15
2.2.1 Algenstämme	15
2.2.2 Kulturbedingungen der Algen	15
2.2.3 Algenkulturmedium TAP (Tris-Acetat-Phosphat)	15
2.2.4 <i>Chlamydomonas</i> Minimal-Medium (M)	16
2.3 Molekularbiologische Methoden	17
2.3.1 Verwendete Vektoren und Klonierung der GFP-Konstrukte	17
2.3.1.1 Klonierung der verschiedenen GFP-SFA Konstrukte	17
2.3.1.2 Klonierung der verschiedenen Centrin-GFP Konstrukte	18
2.3.1.3 Klonierung von DIP13-GFP	19

2.3.1.4	Klonierung weiterer GFP-Konstrukte	20
2.3.2	Isolierung von genomischer DNA aus <i>C. reinhardtii</i>	20
2.3.3	Isolierung von RNA aus <i>C. reinhardtii</i>	20
2.3.4	PCR („Polymerase Chain Reaction“)	22
2.3.5	cDNA Synthese	22
2.3.6	Southern-Blot	22
2.3.7	Sonden-Hybridisierung und immunologische Detektierung für Southern-Blot	23
2.3.8	Transformation von <i>C. reinhardtii</i>	24
2.4	Präparative Methoden	25
2.4.1	Analyse von <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> Transformanten	25
2.4.2	Herstellung von Gameten-Autolysin	25
2.4.3	Entgeißelung und Geißelregeneration von <i>C. reinhardtii</i>	26
2.4.4	In vivo Beobachtung und „Photobleaching“	26
2.4.5	Probenaufbereitung für die SDS-PAGE	27
2.4.5.1	Präparation ganzer Zellen für die SDS-PAGE	27
2.4.5.2	Cytoskelettpräparation für die SDS-PAGE	27
2.5	Proteinbiochemische Methoden	27
2.5.1	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	27
2.5.2	Elektrotransfer der Proteine	29
2.5.3	Färbungen	29
2.5.3.1	Ponceau-Färbung	29
2.5.3.2	Amidoschwarz-Färbung	30
2.5.4	Proteinbestimmung	30
2.6	Immunologische Methoden	30
2.6.1	Western-Blot	30
2.6.2	Indirekte Immunfluoreszenz	31
2.6.2.1	Indirekte Immunfluoreszenz an Methanol-permeabilisierten Zellen	32

2.6.2.2 Indirekte Immunfluoreszenz an isolierten Cytoskeletten	32
2.7 Elektronenmikroskopie	33
3 Ergebnisse	34
3.1 Expression von GFP-SFA in <i>C. reinhardtii</i>	34
3.1.1 Analyse von GFP-SFA exprimierenden <i>C. reinhardtii</i> Stämmen	35
3.1.2 GFP-SFA Fasern sind hitzestabil	36
3.1.3 Die Kopfdomäne von SFA ist notwendig für die Faserbildung	36
3.1.4 Centrin-RNAi in GFP-SFA Zellen	44
3.1.5 Expression von GFP-SFA in der <i>vfl2</i> Centrin Mutante	46
3.1.6 GFP-SFA als Marker in <i>uni</i> Mutanten von <i>C. reinhardtii</i>	51
3.1.7 Analyse der GFP-SFA Fasern durch „Photobleaching“	51
3.2 Expression von Centrin-GFP in <i>C. reinhardtii</i>	55
3.2.1 Analyse von Centrin-GFP exprimierenden <i>C. reinhardtii</i> Stämmen	55
3.2.2 Eine starke Expression von Centrin-GFP destabilisiert die Cytoskelette	62
3.2.3 Die Centrin-GFP Überexpression hat keine Auswirkung auf den Phänotyp	62
3.2.4 Untersuchung der C-terminalen Domäne von Centrin	66
3.2.5 Untersuchung der Kopfdomäne von Centrin-GFP	72
3.2.6 Centrin-GFP Expression in der <i>vfl2</i> und der <i>uni1-2</i> Mutante	72
3.2.7 In vivo Beobachtung von Centrin-GFP 3 Zellen	73
3.2.8 Centrin-GFP unter der Kontrolle des <i>NITI</i> Promotors	73
3.3 Expression von DIP13-GFP in <i>C. reinhardtii</i>	80
3.3.1 Analyse von DIP13-GFP exprimierenden <i>C. reinhardtii</i> Stämmen	80
3.3.2 Die starke Expression von DIP13-GFP führt zur Verkürzung der Geißeln	82
3.3.3 Die Expression von DIP13-GFP führt zur verlangsamten Geißelregeneration	84
3.4 GFP-Markierung weiterer Cytoskelettproteine in <i>C. reinhardtii</i>	94
4 Diskussion	98
4.1 Die GFP-Markierung von SF-Assemblin (SFA) in <i>C. reinhardtii</i>	98

4.1.1	Wie wird die Länge der SMAFs reguliert?	99
4.1.2	Funktionen der verschiedenen SFA Domänen	100
4.1.3	GFP-SFA ist ein Marker für die mikrotubulären Geißelwurzeln	102
4.1.4	Die Dynamik der SMAFs	104
4.2	Die GFP-Markierung von Centrin in <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	106
4.2.1	Der Aufbau von Centrin-haltigen Strukturen des Basalapparates	108
4.2.2	Die Funktion der NBBCs	112
4.3	Die GFP-Markierung und mögliche Funktionen von DIP13 in <i>C. reinhardtii</i>	113
4.4	Ist die GFP-Markierung in <i>C. reinhardtii</i> eine geeignete Methode zur Analyse von Basalapparatproteinen?	115
5	Zusammenfassung	120
6	Literaturverzeichnis	123
7	Anhang	134
	Danksagung	
	Erklärung	
	Lebenslauf	

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Schematische, vereinfachte Darstellung des Basalapparates von <i>C. reinhardtii</i>	13
Abb. 2: Vektorkarten	21
Abb. 3: Analyse von GFP-SFA exprimierenden <i>C. reinhardtii</i> Zellen	39
Abb. 4: Der Effekt von Hitze auf GFP-SFA und SFA-GFP exprimierende Zellen	41
Abb. 5: Untersuchung der N-terminalen Domäne von SFA	43
Abb. 6: Der Effekt von Centrin-RNAi auf GFP-SFA Fasern	49
Abb. 7: Expression von GFP-SFA in der <i>vfl2</i> Mutante von <i>C. reinhardtii</i>	50
Abb. 8: Indirekte Immunfluoreszenz an Cytoskeletten von GFP-SFA <i>uni</i> Mutanten	54
Abb. 9: „Photobleaching“ von GFP-SFA Fasern	54
Abb. 10: Analyse von Centrin-GFP exprimierenden <i>C. reinhardtii</i> Zellen	59
Abb. 11: Analyse von isolierten Cytoskeletten der Centrin-GFP Stämme	61
Abb. 12: Die Überexpression von Centrin-GFP destabilisiert die Cytoskelette	65
Abb. 13: Mitosen von Centrin-GFP 8 Zellen	65
Abb. 14: Schematische Darstellung der verschiedenen Centrin-GFP Konstrukte	67
Abb. 15: Analyse der C-terminalen Domäne von Centrin-GFP	69
Abb. 16: Western-Blot Analyse von Centrin-GFP/ Δ 39-169 exprimierenden Zellen	77
Abb. 17: Indirekte Immunfluoreszenz von Centrin-GFP <i>vfl2</i> und <i>uni1-2</i> Zellen	77
Abb. 18: In vivo Beobachtung von Centrin-GFP 3 Zellen	77
Abb. 19: Induktion von Centrin-GFP mit dem <i>NIT1</i> Promotor	79
Abb. 20: Analyse von DIP13-GFP exprimierenden <i>C. reinhardtii</i>	87
Abb. 21: Indirekte Immunfluoreszenz an DIP13-GFP exprimierenden Zellen	89
Abb. 22: Semiquantitative PCR zum Nachweis von DIP13-GFP mRNA	89
Abb. 23: Analyse von DIP13-GFP Stämmen während des Kulturwachstums	91
Abb. 24: Geißelregeneration von DIP13-GFP exprimierenden Zellen	93
Abb. 25: Expression von α 1-Tubulin mRNA	96
Abb. 26: Modell zur Destabilisierung der NBBCs in Centrin-GFP 8 Zellen	110

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Zusammensetzung der SDS-Gele	28
Tab. 2: Geißelanzahl der GFP-SFA/CentrinRNAi Zellen	44
Tab. 3: Centrinsystem im GFP-SFA/CentrinRNAi C11 Stamm	45
Tab. 4: Geißelanzahl der <i>vfl2</i> Stämme	47
Tab. 5: pH-Schock Entgeißelung der Centrin-GFP Stämme	63
Tab. 6: GFP-Aggregate am Kern von stark exprimierenden Centrin-GFP Stämmen	70
Tab. 7: Stabilität der Cytoskelette in C-terminal veränderten Centrin-GFP Stämmen	71
Tab. 8: Vergleich von Centrin-GFP und anti-GFP Signal in Nit-Centrin-GFP 5.8	75
Tab. 9: DIP13-GFP G10: Geißelanzahl während des Kulturwachstums	83
Tab. 10: Weitere – nicht positive – GFP-markierte Proteine in <i>C. reinhardtii</i>	97
Tab. 11: Vergleich der Stämme GFP-SFA/CentrinRNAi und <i>vfl2</i> /GFP-SFA	104

Abkürzungsverzeichnis

A. dest.	Millipore gefiltertes Wasser
AK	Antikörper
AP	alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ASL	Argininosuccinal Lyase
ATP	Adenosintriphosphat
BK	Basalkörper
Bp	Basenpaare
BSA	“bovine serum albumin”, Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa
cDNA	copy Desoxyribonukleinsäure
DAPI	4',6'-Diamidin-2'-phenylindol-dihydrochlorid
DIP13	deflagellation induced protein of 13 kDa
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EST	expressed sequence tag
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
g	Gramm
GFP	green fluorescent protein
h	Stunde
HEPES	N-2-Hydroxyethylenpiperazin-N`-2-ethanolsulfonsäure
IFT	intraflagellar transport
Kb	Kilobasen
kDa	Kilo-Dalton
l	Liter
M	Molar
mA	Milli Ampere
mAK	monoklonaler Antikörper
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
MAP	Mikrotubuli-assoziiertes Protein
MeOH	Methanol
min	Minute
ml	Milliliter
MT	Mikrotubuli
MTOC	Mikrotubuli-organisierendes Zentrum
NBBC	nucleus-basal body connector
o. g.	oben genannte
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PCM	pericentriolares Material
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglycol
PVDF	Polyvinylidendifluorid
pAK	polyklonaler Antikörper
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA Interferenz

RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transcriptase PCR
rpm	Umdrehungen pro Minute
SDS	Sodiumdodecylsulfat
sek	Sekunde
SFA	striated fiber assemblin
SMAF	striated microtubule-associated fiber
SPB	Spindelpolkörper
s. o.	siehe oben
s. u.	siehe unten
TAP	Tris-Acetat-Phosphat
TEMED	N,N,N,N-Tetramethyldiamin
TRIS	Tris(hydroxamethyl)-aminomethan
Tween 20	Polyoxyethylen-sorbitan-monolaurat
u. a.	unter anderem
U	unit
UTR	nicht translatierte Region
V	Volt
vgl.	vergleiche
z. B.	zum Beispiel
μ	Mikro

1 Einleitung

1.1 Einführung

Die Flexibilität und die Komplexität eukaryotischer Zellen beruht auch auf einem Netzwerk verschiedener Filamente, die zusammengefasst als Cytoskelett bezeichnet werden. Das Cytoskelett ist verantwortlich für die Zellform, die Polarität der Zelle, die intrazellulären Bewegungen und für die gerichtete Fortbewegung von Zellen. Eine Form dieser Fortbewegung wird durch die Motilität von Cilien und Geißeln bewirkt (Kreis und Vale, 1993).

Neben Actinfilamenten und Intermediärfilamenten sind die Mikrotubuli ein Hauptbestandteil des Cytoskelettes. Mikrotubuli (MT) sind röhrenförmige Strukturen mit einem Durchmesser von 25 nm. Sie sind aus 13 Protofilamenten aufgebaut, welche wiederum aus α - und β -Tubulinheterodimeren bestehen. Die beiden Enden eines Mikrotubuli unterscheiden sich durch ein schnell wachsendes Plusende und ein langsam wachsendes Minusende. Die MT sind in der Zelle meist als radiales Gerüst ausgerichtet, wobei die Minusenden in Mikrotubuli-organisierenden Zentren (s. u.) stabilisiert werden (Kellogg et al., 1994). An dieser Stabilisierung ist der γ -Tubulin Ringkomplex beteiligt (Zheng et al., 1995). Das Plusende der Mikrotubuli ist frei und unterliegt einem Wechsel von schneller Depolymerisation und langsamem Wachstum. Dieser Prozess wird als dynamische Instabilität bezeichnet (Mitchison und Kirschner, 1984). Die Mikrotubuli erfüllen ihre vielfältigen Funktionen in der Zelle mit Hilfe von drei Proteinklassen. Die Mikrotubuli-assoziierten Proteine (MAPs) stabilisieren und fördern die Polymerisation von MT. Die Motorproteine der MT ermöglichen die Bewegung entlang der Mikrotubuli, indem sie die chemische Energie der ATP- (Adenosintriphosphat) Hydrolyse nutzen. Dies bewirkt den intrazellulären Transport und die Motilität durch Geißeln. Außerdem können weitere Proteine mit den Mikrotubuli assoziiert sein. Diese Proteine stellen eine heterogene Gruppe dar, die u. a. Enzyme der Glykolyse, Kinasen und G-Proteine umfasst (Mandelkow und Mandelkow, 1995).

Die Bildung von Mikrotubuli findet an Mikrotubuli-organisierenden Zentren (MTOCs) (Pickett-Heaps, 1969) statt. Obwohl die MTOCs die gemeinsame Funktion der Nukleation und Organisation der Mikrotubuli besitzen, ist deren Struktur in verschiedenen Or-

ganismen sehr unterschiedlich (Zimmermann et al., 1999). Das wichtigste MTOC vieler tierischer Organismen ist das Centrosom (Kalt und Schliwa, 1993; Kellogg et al., 1994). Am Centrosom werden die meisten Mikrotubuli der Interphase und die Mikrotubuli der Mitosespindel gebildet. Es besteht aus zwei Centriolen, die in das pericentriolare Material (PCM) eingebettet sind. Die Mikrotubuli werden in diesem PCM gebildet (Kalt und Schliwa, 1993; Kellogg et al., 1994). Die Spindelpolkörper (SPB) in Hefen und anderen Pilzen sind das funktionelle Äquivalent der Centrosomen höherer Tiere. Dabei handelt es sich bei *Saccharomyces cerevisiae* um eine dreischichtige Struktur, die die Kernmembran durchspannt und die Mikrotubuli des Cytoplasmas sowie des Zellkerns organisiert (Bullitt et al., 1997; Adams und Kilmartin, 2000). Höhere Pflanzen besitzen keine Centrosomen mit Centriolen. Man spricht hierbei von flexiblen acentriolaren MTOCs, die nur aus dem PCM bestehen und die Nukleation von MTs an verschiedenen Stellen in der Zelle ermöglichen (Maiza, 1984). Die aktivste Stelle für die Nukleation der Mikrotubuli in Pflanzen ist die Kernoberfläche (Marc, 1997). Das MTOC begeißelter Grünalgen ist der Basalapparat der Geißel (s. u.). Die Basalkörper, ein Bestandteil des Basalapparates, sind baugleich mit den Centriolen.

Die Basalkörper/Centriolen sind Zylinder aus neun miteinander verbundenen Mikrotubulitriplets mit einem Durchmesser von ca. 200 nm (Wolfe, 1972). Obwohl die Ultrastruktur der Centriolen hoch konserviert ist, findet man Abweichungen in einigen Organismen. In *Caenorhabditis elegans* oder *Toxoplasma gondii* bestehen die Centriolen aus neun Mikrotubulisingletts anstatt aus Triplets. *Mastigamoeba* und *Drosophila* besitzen hingegen neun Dupletts (Beisson und Wright, 2003). Eine Funktion der Basalkörper ist die Bildung und Organisation der Geißeln bzw. Cilien. Die Geißeln dienen der Bewegung, sind aber auch an der Aufnahme von Sinnesreizen oder der Nahrungsaufnahme beteiligt. Die Basalkörper können in Centriolen umgewandelt werden. Unmittelbar vor dem Eintritt in die Mitose werden z. B. bei der Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* die Geißeln eingezogen und die Basalkörper an die Spindelpole verlagert (Cavalier-Smith, 1974). Centriolen spielen eine Rolle bei der Zellteilung, indem sie die Centrosomen organisieren und den Verlauf des Zellzyklus beeinflussen (Marshall, 2001).

In den letzten Jahren sind eine Reihe von Proteinen entdeckt worden, die in den MTOCs verschiedener Eukaryoten vorkommen bzw. mit den Centriolen/Basalkörpern assoziiert sind (Überblick: Kalt und Schliwa, 1993; Marshall, 2001; Beisson und Wright, 2003).

Neben Centrin (vgl. 1.4) sind verschiedene Mitglieder der Tubulinfamilie bekannt, die mit den Basalkörpern/Centriolen assoziiert bzw. an deren Funktionen beteiligt sind (Oakley, 2000; Dutcher, 2001). So sind α -, β - und γ -Tubulin in allen Eukaryoten vertreten und essentiell für die Mikrotubuli Polymerisation (Dutcher, 2001). Dabei stellen α - und β -Tubulin die Grundbausteine der Mikrotubuli dar, und γ -Tubulin ist wichtig für deren Nukleation (Wiese und Zheng, 1999) und die Verdoppelung von Centriolen (Ruiz et al., 1999; Shang et al., 2002). Zu den Tubulinen, die an den Centriolen lokalisiert sind, gehören weiterhin δ -, ε -, η -, und ζ -Tubulin. Diese scheinen im Gegensatz zu γ -Tubulin nicht ubiquitär in Eukaryoten zu sein (Dutcher, 2001). So wurden z. B. in den Genomen von *S. cerevisiae*, *S. pombe* und *Arabidopsis thaliana* keine homologen Sequenzen zu δ -, ε -, η -, und ζ -Tubulin gefunden. Dies könnte daran liegen, dass diese Organismen keine Centriolen besitzen und dadurch diese Tubuline dort nicht benötigt werden (Dutcher, 2001). δ -Tubulin wurde zuerst in *C. reinhardtii* beschrieben. Die Basalkörper der *uni3-1* Mutante, in der das δ -Tubulin Gen mutiert ist, besitzen Mikrotubulidupletts anstatt Triplets. δ -Tubulin erfüllt somit eine Funktion bei der Bildung des C-Tubulus (Dutcher und Trabuco, 1998). Auch in *Paramecium tetraurelia* wurde gezeigt, dass δ -Tubulin eine Rolle bei der Bildung des C-Tubulus spielt (Garreau de Loubresse et al., 2001). In *C. reinhardtii*, *Paramecium* und *Xenopus* soll ε -Tubulin wichtig für die Verdoppelung der Centriolen (Dutcher et al., 2002; Dupuis-Williams et al., 2002; Chang et al., 2003) und die Organisation des PCMs sein (Chang et al., 2003). Die *bld2* Mutante von *C. reinhardtii*, die eine Störung im ε -Tubulin Gen hat (Dutcher et al., 2002), besitzt keine Geißeln. Die Basalkörper bestehen nur aus einem Ring von neun Mikrotubulisingletts (Goodenough und St. Clair, 1975). Auch η -Tubulin soll an der Verdoppelung der Centriolen beteiligt sein, wie es durch Temperatur-sensitive Mutanten für *Paramecium* gezeigt wurde (Ruiz et al., 2000).

1.2 Der Basalapparat und die Geißel von *Chlamydomonas reinhardtii*

Die Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* ist ein bevorzugtes Modell für die Analyse der Struktur und der Funktion der Basalkörper sowie der Geißel (vgl. 1.6). *C. reinhardtii* besitzt zwei Geißeln am anterioren Ende der Zelle. An der Basis der Geißeln ist der Basalapparat lokalisiert, das MTOC der Grünalgen (Abb. 1). Der Basalapparat besteht aus zwei Basalkörpern, die die Geißeln tragen, zwei Probasalkörpern und weiteren assoziierten Strukturen (Andersen et al., 1991). Der Basalapparat dient als Ausgangspunkt

für die Axonemen und organisiert das mikrotubuläre System der Zelle in der Interphase und während der Mitose (Ringo, 1967). Die Basalkörper werden durch proximale und distale Verbindungsfibrillen miteinander verbunden (Ringo, 1967). Die distale Verbindungsfibrille (dVF) enthält Centrin (vgl. 1.4). Von den proximalen Enden der Basalkörper ragen vier mikrotubuläre Geißelwurzeln in die Zelle. Bei *Chlamydomonas* sind zwei viersträngige und zwei zweisträngige mikrotubuläre Geißelwurzeln kreuzförmig angeordnet. Weiterhin sind proximal an den Basalkörpern die fibrillären Geißelwurzeln assoziiert (Andersen et al., 1991). Letztere werden in System-I-Fibrillen und System-II-Fibrillen unterschieden. Die System-I-Fibrillen (Syn.: „striated microtubule associated fibers“ SMAFs) verlaufen parallel zu den mikrotubulären Geißelwurzeln. Sie bestehen hauptsächlich aus SF-Assemblin (s. u.; Lechtreck und Melkonian, 1991a; Lechtreck und Silflow, 1997). Die kontraktile System-II-Fibrillen (Syn.: „nucleus-basal body connectors“ NBBCs) verbinden die Basalkörper mit dem Kern und enthalten Centrin (s. u.; Salisbury et al., 1984; Wright et al., 1985; Schulze et al., 1987).

Die eukaryotische Geißel ist aus über 250 Proteinen aufgebaut, die an ihrer Bildung, dem Erhalt und der Funktion der Geißel beteiligt sind (Dutcher, 1995). Die Funktion der Geißeln in *C. reinhardtii* besteht in der Fortbewegung der Zellen und der Zell-Zell Erkennung während der Paarung der haploiden Gameten (Überblick: Silflow und Lefebvre, 2001). Die Struktur eukaryotischer Geißeln ist hoch konserviert. Sie bestehen aus einem Zylinder aus 9 Mikrotubulidupletts, indem zwei zentrale Mikrotubuli lokalisiert sind (9 + 2 Struktur). Assoziiert mit den Mikrotubuli sind Dyneinarme, „radial spoke“ Proteine und andere Strukturen (Ringo, 1967). Der gesamte Komplex wird als Axonema bezeichnet. Zwischen der Geißel und den Basalkörpern ist die Übergangregion lokalisiert, die in Grünalgen aufgrund ihres Aufbaus und ihres Aussehens im Querschnitt als sternförmige Struktur bezeichnet wird (Ringo, 1967; vgl. Abb. 23C, c). Ein Bestandteil der Übergangsregion ist Centrin; ob aber eine Centrin-vermittelte Kontraktion der sternförmigen Struktur den Geißelabwurf auslöst, ist umstritten (s. u.; Sanders und Salisbury, 1994).

Für den Aufbau und den Erhalt der Geißel ist der Transport von Bausteinen in der Geißel notwendig. Dies erfolgt durch den „intra flagellar transport“ (IFT). IFT ist die bidirektionale Bewegung von Proteinpartikeln über die Länge der Geißel (Cole, 2003). Die Strukturen, die von Kozminski et al., (1993a) unter der Geißelmembran entdeckt wur-

den, sind aus mindestens 16 Untereinheiten aufgebaut (Cole, 2003). Durch den IFT werden die Geißelbausteine u. a. an das distale Ende der Geißel gebracht (Rosenbaum et al., 1999), wo deren hauptsächlicher Einbau stattfindet (Johnson und Rosenbaum, 1992). Neben dem Einbau von Geißelproteinen an der Spitze, kann der Einbau allerdings auch über die gesamte Länge der Geißel erfolgen (Piperno et al., 1996) oder von der Basis her aus (Rosenbaum und Child, 1967). Ein Beispiel für den proximalen Einbau ist das p210-homologe Protein aus *D. bioculata* (Schoppmeier und Lechtreck, 2002). Neben dem Aufbau der Geißel ist auch noch ungeklärt, wie die Länge der Geißel reguliert wird (Marshall und Rosenbaum, 2001; Song und Dentler, 2001; Marshall, 2002; Schoppmeier und Lechtreck, 2003).

1.3 SF-Assemblin

Striated fiber assemblin (SFA) ist Hauptbestandteil der nicht kontraktilen, quergestreiften Mikrotubuli-assoziierten Fasern (SMAFs). SMAFs sind entlang der kreuzförmig angeordneten mikrotubulären Geißelwurzeln lokalisiert (Abb. 1; Lechtreck und Melkonian, 1991a). Die Fasern sind aus 2-nm Proteinfilamenten aufgebaut und zeigen eine Querstreifung mit einer axialen Wiederholung von ca. 30 nm. SFA wurde erstmals aus gereinigten Basalapparatfraktionen der einzelligen Grünalge *Spermatozopsis similis* isoliert (Lechtreck und Melkonian, 1991b). Die erste komplette Sequenz wurde durch die Petid-Sequenzierung von *S. similis* SFA detektiert (Weber et al., 1993). Mittlerweile sind auch die Sequenzen aus anderen Grünalgen (*D. bioculata*, *C. reinhardtii* und *C. eugametos*) bekannt und zeigen untereinander eine 54 – 73 %ige Identität (Lechtreck et al., 1996; Lechtreck und Silflow, 1997). Zudem ist das SFA der Grünalgen zu 20 % identisch mit β -Giardian aus dem begeißelten Darmparasiten *Giardia lamblia* (Dilpomonadia; Weber et al., 1993). β -Giardian ist Bestandteil der Mikrobänder in *G. lamblia* (Holberton et al., 1988). SFA-ähnliche Proteine kommen zudem in verschiedenen Apikomplexa vor, dazu gehören z. B. die von *Plasmodium falciparum* und *Toxoplasma gondii* (Lechtreck, 2003). Des Weiteren wurden auch in Diatomeen und Oomyceten SFA-ähnliche Proteine gefunden (Lechtreck, unveröffentlicht).

SFA hat ein Molekulargewicht von ca. 34 kDa und besteht aus einer nicht helikalen Kopf- und einer helikalen Stabdomäne. Die Kopfdomäne ist in den verschiedenen Grünalgen SFAs unterschiedlich lang, die Stabdomäne ist besser konserviert (Lechtreck und Silflow, 1997). In *C. reinhardtii* besteht SFA aus 276 Aminosäuren. Die Kopfdo-

mäne besteht aus 32 Aminosäuren und besitzt potentielle Phosphorylierungsstellen (Lechtreck und Silflow, 1997). Die Stabdomäne besteht aus einer Wiederholung von 28 Aminosäuren, welche wiederum aus vier Heptaden aufgebaut sind. Die Wiederholungen werden jeweils durch eine Aminosäure voneinander getrennt (Weber et al., 1993).

In Interphasezellen könnten die SMAFs aufgrund ihrer Starrheit eine stabilisierende Funktion für den Basalapparat übernehmen (Lechtreck und Melkonian, 1991b). Während der Zellteilung erfahren die SMAFs in *C. reinhardtii* eine Reorganisation, indem sie sich in der Prophase teilen und in der Metaphase als zwei punktförmige Strukturen an den Spindelpolen lokalisiert sind (Lechtreck und Silflow, 1997). Die Reduktion der SFA Expression durch RNAi zeigte, dass SFA oder die SMAFs wichtig für den Aufbau oder den Erhalt der Geißeln sind (Lechtreck et al., 2002). Solche RNAi Versuche führten zur Reduktion der Geißelanzahl, und zudem war die Regeneration der Geißeln nach der Entgeißelung gestört.

1.4 Centrin

Centrin (Syn.: Caltractin) ist Bestandteil centrosomaler Strukturen vieler Eukaryoten (Salisbury, 1995). Erstmals wurde Centrin in den Rhizoplasten (NBBCs) von *Tetraselmis striata* entdeckt (Salisbury et al., 1984). Mittlerweile ist es in vielen MTOCs eukaryotischer Zellen gefunden worden. Centrin ist u. a. im Lumen von Centriolen in Säugerzellen und an der Halbbrücke der Spindelpolkörper von Hefezellen lokalisiert (Schiebel und Bornens, 1995). In höheren Pflanzen wurde Centrin mittels Immunlokalisierung in den Plasmodesmen nachgewiesen und soll dort an der Kontrolle der Zell-Zell-Kommunikation beteiligt sein (Blackman et al., 1999).

In *Arabidopsis thaliana* existieren zwei Centrin Gene. Die Untersuchung von homozygoten *A. thaliana* Mutanten mit T-DNA Insertionen im Centrin-1 Gen ergaben allerdings, dass die Pflanzen keine auffallenden Defekte im Vergleich zum Wildtyp zeigten. Mutanten mit T-DNA Insertionen im Centrin-2 sind zur Zeit nicht bekannt (Schoppmeier und Lechtreck, unveröffentlicht).

Centrin hat ein Molekulargewicht von ca. 20 kDa und gehört zur Familie der Calciumbindenden EF-Hand Proteine (Schiebel und Bornens, 1995). Die Struktur der vier EF-Hands ist hoch konserviert (Bhattacharya et al, 1993). Die N-terminalen Domänen verschiedener Centrine sind variabel und könnten somit verantwortlich für die abweichende Lokalisierung und Funktion von Centrin in unterschiedlichen Organismen sein

(Bhattacharya et al, 1993). Wiech et al. (1996) postulieren eine Funktion der N-terminalen Domäne für Centrin-Centrin Interaktionen. Die C-terminale Domäne besitzt eine potentielle Phosphorylierungsstelle (Huang et al., 1988).

In Grünalgen ist Centrin in drei verschiedenen faserförmigen Strukturen, die mit den Basalkörpern assoziiert sind, enthalten: den NBBCs, die die Basalkörper mit dem Kern verbinden, der distalen Verbindungsfibrille, die die Basalkörper miteinander verbindet und in der sternförmigen Struktur der Übergangsregion der Geißel. Diese Strukturen zeigen alle eine Calcium-abhängige Kontraktion (Abb. 1; Salisbury, 1995). Das *VFL2* Gen aus *C. reinhardtii* codiert für Centrin und eine Punktmutation im *VFL2* Gen führt zu Defekten in den beschriebenen Centrin-haltigen Fasern (Wright et al., 1989). Im Vergleich zu Wildtypzellen haben *vfl2* Zellen eine variable Anzahl an Geißeln (*vfl*=variable flagellar number) (Kuchka und Jarvik, 1982). Centrin soll aufgrund dessen an der korrekten Verteilung der Basalkörper während der Zellteilung beteiligt sein (Wright et al., 1989; Taillon et al., 1992). Zudem ist Centrin am Calcium-induzierten Geißelabwurf beteiligt (Sanders und Salisbury, 1994). Die Reduzierung des Centringehaltes in *C. reinhardtii* auf bis zu 5 % des Wildtyp-Centringehaltes wurde durch RNAi erreicht (Koblenz et al., 2003). Diese Zellen besaßen keine Centrin-haltigen Fasern mehr, und sie zeigten einen Phänotyp mit variabler Geißelanzahl. Dies ist ein Hinweis darauf, dass Centrin für die Basalkörperbildung nötig ist. Des Weiteren wurde bei sich teilenden Centrin RNAi Zellen beobachtet, dass die Basalkörper nicht mehr an den Spindelpolen lagen. Dies könnte bedeuten, dass Centrin die Basalkörper an die Spindelpole bindet (Koblenz et al., 2003).

In *S. cerevisiae* wurde für Centrin eine Rolle bei der Verdoppelung von Centrosomen nachgewiesen. So kann eine Temperatur-sensitive Mutante von Cdc31p, dem Centrin Homolog, ihre SPB nicht mehr verdoppeln (Spang et al., 1993). Das „Silencing“ von menschlichem Centrin-2 mittels RNAi verhindert die Duplikation der Centriolen in He-La Zellen. (Salisbury et al., 2002).

1.5 DIP13

DIP13 („deflagellation induced protein of 13 kDa“) ist in *C. reinhardtii* an den Mikrotubuli des Cytoplasmas, des Basalapparates, der Basalkörper und der Geißel lokalisiert (Pfannenschmid et al., 2003). Das DIP13-Protein besteht aus 111 Aminosäuren, besitzt ein Molekulargewicht von ca. 13 kDa und ist α -helikal. Zudem besitzt es eine potentiell-

le Mikrotubulibindedomäne (KREE) (Pfnanschmid et al., 2003). DIP13 ist homolog (60 % Identität auf Aminosäureebene) zum NA14 Autoantigen im Menschen und einem nicht näher definierten Protein in Maus. Das menschliche Homolog NA14, ein coiled-coil Protein, wurde von Ramos-Morales et al. (1998) als Autoantigen in Patienten, die unter dem Sjögren's Syndrom, einer rheumatischen Erkrankung, leiden, identifiziert. Durch ein Proteomprojekt mit menschlichen Centrosomen konnte NA14 als eins von 23 neu identifizierten, centrosomal lokalisierten Proteinen identifiziert werden (Andersen et al., 2003). Der DIP13 Antikörper aus *C. reinhardtii* markierte in HeLa Zellen die Centrosomen und die Spindelpole in mitotischen Zellen. In menschlichen Spermazellen zeigte der DIP13 Antikörper eine starke Markierung der Basalkörper sowie eine schwächere Markierung der Axonemen (Pfnanschmid et al., 2003). Die Reduzierung der DIP13-Menge in *C. reinhardtii* durch RNAi verursachte Defekte in der Zellteilung und führte zu Zellen mit vermehrter Anzahl an Geißeln und Zellkernen. Dies ist ein Hinweis auf eine Funktion von DIP13 für die Zellteilung. Pfnanschmid et al. (2003) nehmen weiterhin an, dass DIP13 an der Stabilisierung der Mikrotubuli beteiligt ist.

1.6 *Chlamydomonas reinhardtii* als Modellorganismus

Die einzellige, zweigeißlige Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* besitzt ein haploides Genom von ca. 100 Megabasen. Der Vorteil eines haploiden Genoms liegt darin, dass Mutationen direkt erkennbar sind. Allerdings birgt ein solches Genom den Nachteil, dass Mutationen, die essentielle Gene betreffen, letal sind (Silflow und Lefebvre, 2001). *C. reinhardtii* ist leicht zu kultivieren und hat eine kurze Generationszeit (Harris, 2001). Weitere Vorteile von *C. reinhardtii* sind ein abgeschlossenes, aber noch nicht anotiertes Genomprojekt und umfangreiche EST-Projekte (Purton und Pazour, 2002; Shrager et al., 2003; Grossmann et al., 2003). Für Analysen des Cytoskeletts, insbesondere der Geißeln und der Basalkörper, ist *C. reinhardtii* gut geeignet. Die Geißeln sind für das Zellwachstum und das Überleben der Zellen nicht essentiell. Allerdings sind sie nötig für die Motilität der Zellen, so dass Mutationen, die die genannten Strukturen betreffen, leicht detektiert werden können (Lefebvre und Silflow, 1999). Für biochemische Analysen lassen sich die Geißeln zudem leicht isolieren (Silflow und Lefebvre, 2001).

Viele genetische und molekularbiologische Methoden stehen für das Arbeiten mit *C. reinhardtii* zur Verfügung. Die Transformation des Kerngenoms ist durch verschiedene Methoden möglich. Eine sehr einfache und kostengünstige Methode ist die Transforma-

tion des Kerngenoms durch „Schütteln“ mit Glassperlen (Kindle, 1990). Die DNA wird hierbei stabil in das Kerngenom eingebaut. Allerdings findet der Einbau unter nicht homologer Rekombination statt (Debuchy et al., 1989; Kindle et al., 1989). Dadurch können Gene durch Transformation nicht ausgeschaltet werden (Purton und Pazour, 2002). Für die Transformation von *C. reinhardtii* stehen eine Reihe von selektiven Markern zur Verfügung. Dazu gehören unter anderem das *ARG7* Gen. Dieses Gen codiert für die Argininosuccinat Lyase (ASL), welche das letzte Enzym im Arginin-Biosyntheseweg ist. ASL ist dafür verantwortlich, Argininosuccinat in Arginin und Fumarat zu konvertieren (Debuchy et al., 1989). Zur Transformation mit diesem Marker benötigt man allerdings einen *C. reinhardtii* Stamm, der eine Mutation im *ARG7* Gen trägt. Zumeist muss diese Mutation aber erst durch sexuelles Kreuzen in den zu untersuchenden Stamm eingeführt werden (Fuhrmann, 2002). Mittlerweile stehen auch andere Marker zu Verfügung, die es erlauben, beliebige *C. reinhardtii* Stämme zu transformieren, da die eingeführten Gene Resistenzen gegen bestimmte Antibiotika verleihen. Ein Beispiel dafür ist das bakterielle Gen *ble*, welches eine Resistenz gegen Phleomycin (Zeozin) verleiht (Stevens et al., 1996).

Lange Zeit war es in *C. reinhardtii* nicht möglich, eine hohe Expression von endogenen und exogenen Genen zu erzielen (Schroda et al., 2000). Kozminski et al. (1993b) konnten α -Tubulin, welches mit einem Epitop markiert war, unter der Kontrolle des *RBCS2* Promotors stärker exprimieren, als unter dem endogenen α -Tubulin Promotor. Die Einführung des ersten Introns des *RBCS2* Gens, welches Enhancerelemente enthält, führte hierbei zu einer erhöhten Expression des *ble* Gens (Lumbreras et al., 1998). Weitere Erfolge, die Expression von eingeführten Genen in *C. reinhardtii* zu verstärken, wurden erzielt, indem ein Teil des *HSP70A*-Promotors anderen Promotoren, wie z. B. den ohnehin schon starken *RBCS2*- und β_2 -*TUB* Promotoren, vorgeschaltet wurde (Schroda et al., 2000, 2002). Elemente in 5'UTRs und Introns scheinen also wichtig zu sein, um eingeführte Gene im *C. reinhardtii* Genom erfolgreich zu exprimieren. Fischer und Rochaix (2001) entwickelten einen Vektor, der die hohe Expression von endogenen und exogenen cDNAs erlaubt. Das endogene *C. reinhardtii* Gen *PsaD* enthält keinerlei Introns. Also müssen die 5'- und 3' Regionen der codierenden Region des *PsaD* Gens alle Elemente besitzen, die für eine Expression des Gens ausreichen (Fischer und Rochaix, 2001).

Neue Komponenten des Basalapparates und der Geißel wurden oft durch die Analyse von Motilitätsmutanten entdeckt (Lefebvre und Silflow, 1999). Das Studium von Mutanten gibt aber oft nur Hinweise auf Funktionen durch die Untersuchung der gestörten Strukturen. Erst die Herstellung von Antikörpern gegen neu identifizierte Proteine gibt Aufschluss über deren Lokalisation. Eine andere Form, die Proteinlokalisierung zu studieren und somit die aufwändige Herstellung von Antikörpern zu verhindern, ist die Markierung von Genen mit Epitopen. Die Markierung durch das Hämagglutinin des Influenzavirus (HA) ist für mehrere Proteine der Basalkörper und der Geißeln gelungen (Fuhrmann, 2002). Ein Beispiel dafür ist α 1-Tubulin (Kozminski et al., 1993b). Allerdings müssen Proteine, die auf solche Weise markiert wurden, auch wieder durch Antikörper detektiert werden, und ein Studium der Dynamik der so markierten Proteine in vivo ist nicht möglich. Eine Methode, die die Untersuchung von Lokalisation, Dynamik und Funktion von Proteinen in *C. reinhardtii* ermöglicht, wäre also von großem Vorteil für weitere Analysen des Basalapparates.

1.7 „Green Fluorescent Protein“ (GFP)/GFP in *C. reinhardtii*

Durch die Fusionierung von GFP („green fluorescent protein“) an ein Protein kann dessen Lokalisation und die Dynamik in vivo studiert werden. GFP ist verantwortlich für die grüne Biolumineszenz der Qualle *Aequorea victoria*. Das Photoprotein Aequorin überträgt seine Extinktionsenergie auf das GFP, welches die blaue Lumineszenz des Aequorins in die grüne Fluoreszenz konvertiert (Shimomura et al., 1962; Morin und Hastings, 1971). Das GFP besteht aus 238 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 27 kDa. (Prasher et al., 1992). Gereinigtes *A. victoria* Wildtyp-GFP absorbiert blaues Licht bei 395 nm und einem kleineren Peak von 470 nm, dabei emittiert es grünes Licht bei 509 nm. Durch Mutationen verschiedener Aminosäuren des Wildtyp-GFPs wurden die Eigenschaften des GFPs optimiert. Zum Beispiel besitzt EGFP nur noch ein Extinktionsmaximum bei 488 nm, und es zeigt eine stärkere Fluoreszenz sowie eine erhöhte Faltungsgeschwindigkeit (Tsien, 1998; Fuhrmann et al., 1999).

Die Versuche von Chalfie et al. (1994) zeigten, dass GFP als funktionelles Transgen in Prokaryoten und Eukaryoten exprimiert werden kann und haben somit GFP als zellbiologischen Marker möglich gemacht. Das GFP ist ein ideales Mittel für Promotoranalysen und durch die Fusion an Proteine ein Marker für Proteinlokalisationen, Funktionen und Beobachtungen dynamischer Vorgänge. Der Vorteil einer GFP-Markierung ist zu-

dem, dass die Zellen nicht erst aufwändig fixiert und mit Antikörpern markiert werden müssen, denn durch die Anfertigung von Präparaten für Antikörperfärbungen können Artefakte entstehen, die die Lokalisation bzw. Detektion beeinträchtigen könnten (Ludin und Matus, 1998). Allerdings besteht auch die Möglichkeit, dass durch die Fusion von GFP an ein Protein, dessen Funktion beeinträchtigt werden kann. Bei einer idealen Fusion muss sich das GFP korrekt falten und somit „leuchten“. Zudem soll das Fusionsprotein die gleiche Lokalisation und die gleichen Funktionen wie das Wildtypprotein in der Zelle übernehmen (Cubitt et al., 1995). Ein Test für die Funktionalität eines GFP-Fusionsproteins ist zum Beispiel die Koplementation einer Mutation durch das GFP-Fusionsprotein. Zur Untersuchung von verschiedenen Cytoskelettproteinen wurde GFP bereits in einer Vielzahl von Organismen angewandt (Übersicht: Ludin und Matus, 1998; Yoon et al., 2002).

Durch die Entwicklung eines an die „codon usage“ von *C. reinhardtii* adaptierten GFP (CrGFP; Fuhrmann et al., 1999) ist es nun möglich, auch in *C. reinhardtii* Proteine in vivo zu beobachten und zu untersuchen. So wurde das GFP C-terminal an das *ble* Gen und an das *Chlamyopsin* Gen (*cop*) fusioniert. Das Ble-GFP Fusionsprotein akkumuliert im Kern, und COP-GFP konnte im Augenfleck von *C. reinhardtii* beobachtet werden. Dies zeigte, dass das CrGFP als Marker für die Proteinlokalisierung in *C. reinhardtii* einsetzbar ist (Fuhrmann et al., 1999).

Bisher wurden nur zwei weitere Arbeiten über die GFP-Markierung von cytoplasmatischen Proteinen in *C. reinhardtii* veröffentlicht: SFA-GFP (Lechtreck et al., 2002) und Centrin-GFP (Ruiz-Binder et al., 2002). Die C-terminale GFP-Markierung von SF-Assemblin (SFA-GFP) zeigte, dass das Protein zu quergestreiften Fasern zusammgebaut wurde (Lechtreck et al., 2002). Allerdings wies SFA-GFP andere Löslichkeitseigenschaften als das Wildtyp-SFA auf. Zudem war es empfindlich gegenüber Änderungen der Temperatur.

Das Centrin-GFP Fusionsprotein konnte in den NBBCs, der distalen Verbindungsfibrille und in der Übergangsregion der Geißel (vgl. Abb. 1) von *C. reinhardtii* durch Fluoreszenz- und Elektronenmikroskopie nachgewiesen werden (Ruiz-Binder et al., 2002). Allerdings war das Centrin-Cytoskelett in GFP-markierten Zellen gegenüber Wildtypzellen verändert. Dazu gehörten Veränderungen in der Übergangsregion und der distalen Verbindungsfibrille. Von den Zellen, die Centrin-GFP ausprägten, zeigten nur 25 - 50 % der Zellen eine Expression des Fusionsproteins. Die in vivo Beobachtung während

der Mitose zeigte aber, dass Centrin-GFP für die Beobachtung von dynamischen Prozessen in *C. reinhardtii* geeignet ist (Ruiz-Binder et al., 2002).

1.8 Ziele dieser Arbeit

C. reinhardtii ist u. a. ein Modellsystem für die Untersuchung von Struktur und Funktion des Geißelapparates. Obwohl die GFP-Technik neue Einblicke in dynamische Prozesse, wie die Verdoppelung der Basalkörper und den Aufbau und Erhalt der Geißel liefern könnte, wurde sie in *C. reinhardtii* bisher kaum angewandt (vgl. 1.7). Deshalb sollten in dieser Arbeit verschiedene Proteine der Geißel und des Basalapparates mit GFP markiert werden, um das Potential der Methode in *C. reinhardtii* zu erkunden. Von elf verschiedenen mit GFP markierten Proteinen wurden drei erfolgreich in *C. reinhardtii* exprimiert. Im Mittelpunkt dieser Arbeit steht die Analyse dieser Fusionsprodukte. Die GFP-markierten Proteine sollten in Bezug auf ihre Lokalisation und bekannten Eigenschaften mit den Wildtypproteinen verglichen werden. Des Weiteren sollten einzelne Domänen der Proteine und dynamische Prozesse untersucht werden.

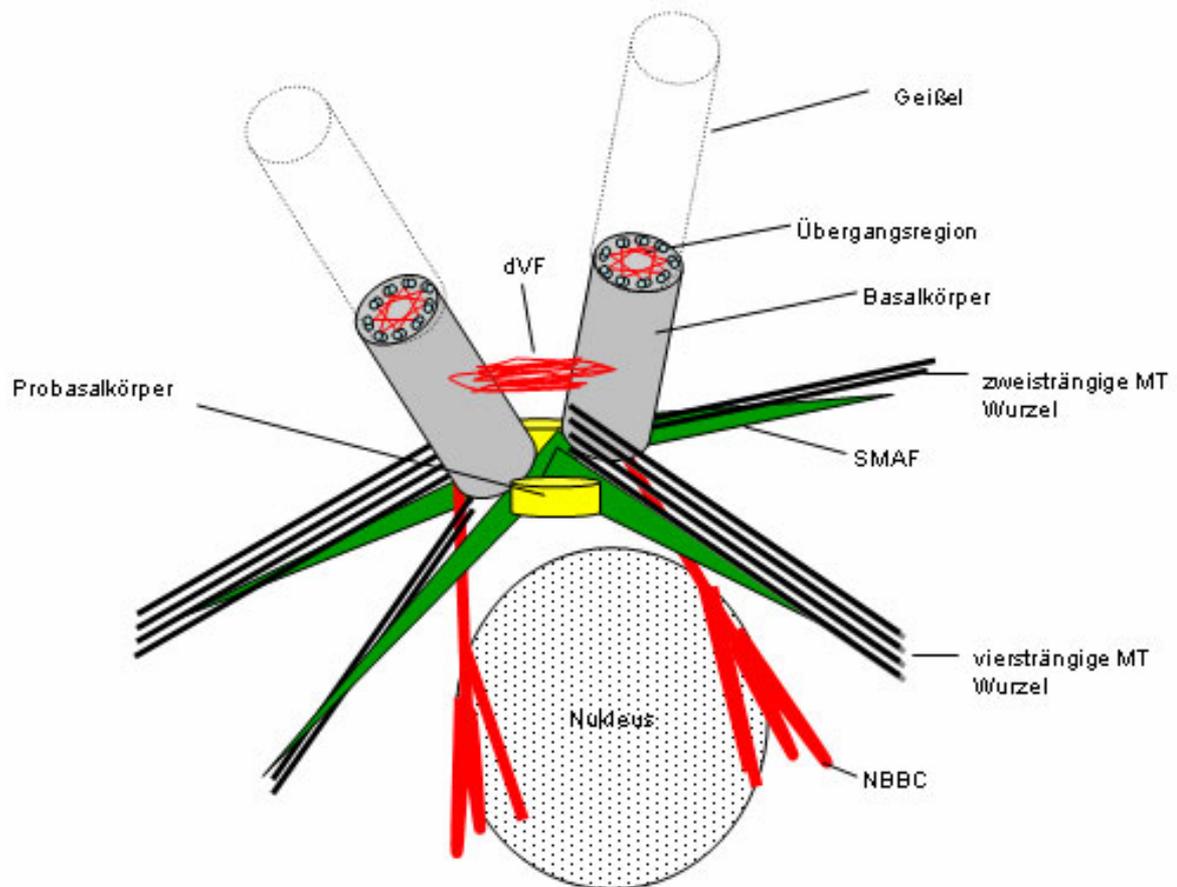


Abb. 1: Schematische, vereinfachte Darstellung des Basalapparates von *C. reinhardtii*

Der Basalapparat von *C. reinhardtii* besteht aus zwei Geißel-tragenden Basalkörpern, zwei Probasalkörpern (gelb) und mit ihm assoziierten Strukturen. Die distale Verbindungsfibrille (dVF) verbindet die Basalkörper miteinander. Proximal, in der Nähe der Basalkörper, sind die vier kreuzförmig angeordneten mikrotubulären Geißelwurzeln lokalisiert. Davon sind zwei viersträngig und zwei zweisträngig (schwarz). Mit diesen Geißelwurzeln sind die SMAFs assoziiert („striated microtubule associated fibers“, grün). Diese bestehen hauptsächlich aus SFA. Die NBBCs stellen eine Verbindung zwischen den Basalkörpern und dem Nucleus her. Sie enthalten Centrin (rot). Zudem ist Centrin in der dVF und der Übergangsregion vertreten. MT = Mikrotubuli.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

Alle benutzten und im Weiteren nicht aufgeführten Standard-Chemikalien wurden von den Firmen Roth, Merck, ICN, Serva oder AppliChem bezogen. Enzyme waren von den Firmen Invitrogen, Promega, Amersham Bioscience und MBI Fermentas.

2.1.1 Antikörper und deren Verdünnung

<u>primäre Antikörper:</u>	<u>Verdünnung:</u>	<u>IF</u>	<u>WB</u>
- pAK anti-GFP 290 (abcam)		1:500	1:4000
- pAK anti-SFA (Lehtreck und Melkonian, 1991b)		1:200	1:3000
- mAK BAS 6.8 (anti-Centrin, Geimer et al. 1997)		1:20-50	1:50
- mAK anti-acetyliertes-Tubulin (Klon 6-11B-1, Sigma)		1:300	-
- pAK anti- α -Tubulin (Silflow und Rosenbaum, 1981)		1:800	-
- pAK anti-DIP13 (Pfannenschmid et al., 2003)		1:200	1:500

sekundäre Antikörper:

- anti-Kaninchen IgG Alkalische Phosphatase Konjugat (Sigma)	-	1:4000
- anti-Maus IgG Alkalische Phosphatase Konjugat (Sigma)	-	1:4000
- anti-Kaninchen IgG FITC Konjugat (Sigma)	1:100	-
- anti-Maus IgG FITC Konjugat (Sigma)	1:100	-
- anti-Kaninchen IgG Cy3 Konjugat (Dianova)	1:300	-
- anti-Maus IgG Cy3 Konjugat (Dianova)	1:300	-

Abkürzungen: mAK = monoklonaler Antikörper; pAK = polyklonaler Antikörper; IF = Immunfluoreszenz; WB = Western-Blot

2.1.2 Verwendete „Kits“

- GFXTM Micro Plasmid Prep Kit (Amersham Biosciences)
- QIAquick Gel Extraction Kit (Quiagen)
- MinElute Gel Extraction Kit (Quiagen)
- QIAquick PCR Purification Kit (Quiagen)
- Super Script First Strand Synthesis System for RT-PCR Superscript II (Invitrogen)
- DIG-Chem-Link Labeling und Detection Set (Roche)

2.2 Algenstämme und Kulturbedingungen

2.2.1 Algenstämme

Folgende Stämme von *Chlamydomonas reinhardtii* (Chlorophyceae) wurden für diese Arbeit verwendet:

- CC-3395 arg7-8 cwd mt- (*Chlamydomonas* Genetic Center, Duke University, Durham, NC)
- CC-3395 arg7-8 cwd mt- transformiert mit *ARG7* Gen als Kontrollstamm (nachfolgend als Kontrolle bezeichnet)
- CC-620 wild type mt+ (R3 NM) (*Chlamydomonas* Genetic Center)
- CC-621 wild type mt- (NO) (*Chlamydomonas* Genetic Center)
- vfl2 #18 cw15+ (Algenkultursammlung Melkonian; Universität zu Köln)
- uni3-1 (freundlicherweise von Dr. S. Dutcher zur Verfügung gestellt)
- uni1-2, CC-2507 (*Chlamydomonas* Genetic Center)

Abkürzungen: cwd = „cell wall deficiency“; mt = „mating type“

2.2.2 Kulturbedingungen der Algen

Die Arbeiten mit den Algen erfolgten grundsätzlich unter sterilen Bedingungen. Als Stammkulturen dienten 50 ml Kulturen in nicht belüfteten 100 ml Erlenmeyerkolben. Zum Erhalt dieser Kulturen wurden diese alle vier bis fünf Wochen überimpft (Batch-Kulturen).

Die Kultivierung des Stammes CC-3395 (nicht transformiert) erfolgte bei 15 °C +/- 2 °C bei einem konstanten 14:10 Stunden Hell-Dunkel-Zyklus. Als Lichtquelle dienten Leuchtstoffröhren des Typs „universal white“ (Osram, L58 W/25) und „Biolux“ (Osram, L58W/72-965) im Verhältnis 1:1, mit einer durchschnittlichen Lichtintensität von 20-40 $\mu\text{E} \times \text{m}^{-2} \times \text{s}^{-1}$. Die transformierten *C. reinhardtii* Stämme wurden bei 22 °C +/- 2 °C kultiviert. Die Lichtverhältnisse entsprachen denen der bei 15 °C gehaltenen Kulturen.

2.2.3 Algenkulturmedium TAP (Tris-Acetat-Phosphat)

Alle hier beschriebenen *C. reinhardtii* Stämme wurden in TAP-Medium (Gorman and Levine, 1965) kultiviert. Das Medium wurde autoklaviert (20 min, 121 °C) und anschließend bis zur weiteren Verwendung bei Raumtemperatur (RT) gelagert.

Das TAP-Medium setzt sich wie folgt zusammen:

Komponenten	Endkonzentration im Medium
NH ₄ Cl	0,4 g/l
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,1 g/l
CaCl ₂ x 2H ₂ O	0,05 g/l
K ₂ HPO ₄	0,108 g/l
KH ₂ HPO ₄	0,056 g/l
Tris	2,42 g/l
Eisessig	1 ml
Na ₂ EDTA (Titriplex III)	0,05 g/l
FeSO ₄	0,0049 g/l
KOH	0,016 g/l
H ₃ BO ₃	0,016 g/l
ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	0,022 g/l
MnCl ₂ x 4 H ₂ O	0,00506 g/l
CoCl ₂ x 6 H ₂ O	0,00161 g/l
CuSO ₄ x 5 H ₂ O	0,00157 g/l
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ x 4 H ₂ O	0,0011 g/l

Der pH-Wert wurde mit Eisessig auf pH 7,0 eingestellt.

Für Arginin-bedürftige Stämme wurden dem Medium nach dem Autoklavieren jeweils 0,02 % (Endkonzentration) Arginin zugesetzt. Dazu wurde eine 10 %ige Stammlösung L-Arginin Hydrochlorid (Sigma) steril filtriert und kühl und dunkel gelagert.

Für TAP-Medium ohne Ammonium wurde NH₄Cl durch 8 ml 1 M KNO₃ ersetzt.

2.2.4 *Chlamydomonas* Minimal-Medium (M)

Für bestimmte Versuche, wie z. B. das Entgeißeln von *C. reinhardtii*, wurden die Zellen in M-Medium (Sager und Granick, 1953) kultiviert.

Das M-Medium setzt sich wie folgt zusammen:

Lösungen	Einsatz/Liter
- 10 x Spurenelementlösung (s. u.)	1 ml
- 10 % Na ₃ Citrat-2H ₂ O	5 ml
- 1 % FeCl ₃ -6H ₂ O	1 ml
- 5,3 % CaCl ₂ -2H ₂ O	1 ml
- 10 % MgSO ₄ -7H ₂ O	3 ml
- 10 % NH ₄ NO ₃	3 ml
- 10 % KH ₂ PO ₄	0,7 ml
- 10 % K ₂ HPO ₄ -3H ₂ O	1,5 ml

Die Komponenten wurden in der aufgeführten Reihenfolge zu A. dest gegeben und auf pH 6,8 eingestellt. Anschließend wurde das Medium autoklaviert und bis zur weiteren Verwendung bei Raumtemperatur gelagert.

Zusammensetzung der 10x Spurenelementlösung:

- 1 g/l H₃BO₃
- 1 g/l ZnSO₄·7H₂O
- 303 mg/l MnSO₄·H₂O
- 200 mg/l CoCl₂·6H₂O
- 200 mg/l Na₂MoO₄·2H₂O
- 40 mg/l CuSO₄

2.3 Molekularbiologische Methoden

Alle grundlegenden Methoden, wie das Klonieren von DNA-Fragmenten, enzymatische Spaltung von DNA, Gewinnung von Plasmid DNA, Agarosegelelektrophorese etc., werden nicht näher beschrieben und sind nach Standardprotokollen durchgeführt worden (Ausubel et al. 1995). Bei der Verwendung von „Kits“ (vgl. 2.1.2) wurde nach den Herstellerangaben vorgegangen.

2.3.1 Verwendete Vektoren und Klonierung der GFP-Konstrukte

Folgende Vektoren wurden für diese Arbeit verwendet:

- pCrGFP (Fuhrmann et al., 1999, BioCAT, vgl. Abb. 2A, B)
- pCB740 (Schroda et al., 2000). Der Vektor enthält den *HSP70A/RBCS2* Fusions-Promotor, sowie das Argininosuccinat Lyase Gen (*ARG7*), als selektiven Marker. Das *ARG7* Gen diente zur Komplementation des Arginin-bedürftigen *C. reinhardtii* Stammes CC-3395 (vgl. 2.2.1).
- pMS171 (M. Schroda). Der Vektor enthält das *ble* Gen (Stevens et al., 1996) zwischen dem *HSP70A/RBCS2* Promotor und der *RBCL* 3'UTR. Das *ble* Gen verleiht Resistenz gegen Phleomycin (Zeozin).
- pNCrGFP (Dr. K.-F. Lechtreck, vgl. Abb. 2C)
- pGenD (Fischer und Rochaix, 2001); cDNA Expressionsvektor (vgl. 1.6)

2.3.1.1 Klonierung der verschiedenen GFP-SFA Konstrukte

Mittels PCR mit den Primern GN-SFAf1 und GN-SFAr1 und dem Template BA1 (genomischer SFA-Klon; Lechtreck et al., 2002) wurde die kodierende Region des *SFA* Gens (GenBank Accession Number: AJ344366) ab der fünften Aminosäure (AS) bis

zum Stoppcodon amplifiziert. Dabei wurde jeweils mit dem Vorwärts- und dem Rückwärtsprimer eine BamHI Schnittstelle am Ende des PCR-Produkts eingeführt. Das PCR-Produkt von 2310 Bp wurde mit BamHI geschnitten und in die BglII Schnittstelle von pNCrGFP (vgl. Abb. 2C) kloniert. Der resultierende Vektor wurde pNCrGFP-SFA genannt. Zur Deletion von 10 (SFA Δ H4-14) bzw. 29 (SFA Δ H4-32) Aminosäuren der Kopfdomäne von SFA, wurden die Primer GN-SFA-H14n und GN-SFA-H jeweils mit GN-SFAr1 kombiniert. Das PCR-Produkt SFA Δ H4-14 wurde mit BamHI und BglII und das PCR-Produkt SFA Δ H4-32 mit BamHI geschnitten und jeweils in die BglII Schnittstelle von pNCrGFP kloniert.

Die verschiedenen Vektoren wurden mit EcoRI linearisiert. Der Vektor pCB740 wurde mit BamHI und EcoRI (*ARG7* Gen als selektiver Marker) geschnitten. Anschließend wurden diese geschnittenen Vektoren gemeinsam in CC-3395 co-transformiert (vgl. 2.3.8).

Primer: (fett = Restriktionsschnittstellen)

- GN-SFAf1 5'-CGGGATCCGTTTGAGACCCCGGG-3'
- GN-SFAr1 5'-CGGGATCCCTTATGCGCTGACCAGCTTG-3'
- GN-SFA-H 5'-CGGGATCCCTCCGCCAAGCTTGAC-3'
- GN-SFA-H14n 5'-GAAGATCTCCTATCTCCGCGGCGCCGGGACTTCTCG-3'

2.3.1.2 Klonierung der verschiedenen Centrin-GFP Konstrukte

Die kodierende Region von Centrin einschließlich 40 Bp der 5'UTR (+20 bis +1829) (Lee, et al., 1991; GenBank Accession Number: X57973) wurden mittels PCR aus genomischer *C. reinhardtii* DNA amplifiziert. Dazu wurde mit dem Vorwärtsprimer cenf1 eine XbaI und eine NheI Restriktionsschnittstelle und mit dem Rückwärtsprimer cenr1w eine XbaI Schnittstelle eingeführt. Zudem wurden mit cenr1w fünf Alanine als Linker zwischen Centrin und CrGFP eingeführt (unterstrichene Basen im cenr1w Primer). Dieses PCR Produkt von 1841 Bp wurde mit XbaI geschnitten und in die XbaI Schnittstelle von pCrGFP kloniert (vgl. Abb. 2A, B). Der pCrCentrin-GFP Vektor wurde mit NheI und EcoRI geschnitten, und das *CENTRIN::GFP::RBCS2* Konstrukt hinter den *HSP70A/RBCS2* Promotor in den mit NheI und EcoRI geschnittenen Vektor pCB740 (Schroda et al., 2000) ligiert. Der resultierende Vektor wurde pCBCentrin-GFP genannt.

Die C-terminalen Veränderungen von Centrin wurden mittels PCR eingeführt. Für die Substitution des Serins 167 zu Alanin (Centrin-GFP/S167A) wurden die Primern cenf1n

und cenS167A-r2 verwendet. Für die Substitution des Serins 167 zu Glutamat (Centrin-GFP/S167E) wurden die Primern cenf1n und cenS167E-r3 verwendet. Zur Deletion der letzten fünf Aminosäuren von Centrin -GFP (Centrin-GFP/ Δ 165-169) wurden die Primer cenf1n und cen-T5-r4 verwendet. Die resultierenden PCR-Produkte wurden entsprechend wie Centrin-GFP kloniert. Die Kopfdomäne von Centrin (+20 bis +251) wurde mittels PCR mit den Primern cenf1n und cenr2Head amplifiziert und entsprechend der anderen Centrin-GFP Konstrukte kloniert. Zur Transformation in CC-3395 (vgl. 2.3.8) wurden die resultierende Plasmide mit EcoRI linearisiert.

Primer: (fett = Restriktionsschnittstellen; unterstrichen = Alanin-Linker)

-cenf1n: 5'-GCGTCTAGAGCTAGCATCATTTATCAAAACCGTTCTAGC-3'

-cenr1w: 5'-GCGTCTAGAGCGGCAGCCGCGGCGAAGAGCGAGGTCTTCTT
CATG-3'

-cenS167A-r2: 5'-GCGTCTAGAGCGGCAGCCGCGGCGAAGAGCGCGGTC
TTCTTCATGATC-3'

-cenS167E-r3: 5'-GCGTCTAGAGCGGCAGCCGCGGCGAAGAGCTCGGTC
TTCTTCATGATC-3'

-cen-T5-r4: 5'-GCGTCTAGAGCGGCAGCCGCGGCCTTCATGATCCTGAAG
GGGAGCAG-3'

-cenr2Head: 5'-GCGTCTAGAGCGGCAGCCGCGGCATCGAAGCTGCATG
TATAGAAGTC-3'

Um Centrin-GFP unter die Kontrolle des induzierbaren *NITI* Promotors (Zhang und Lefebvre, 1997) zu bekommen, wurde das Konstrukt *CENTRIN::GFP::RBCS2* mit NheI und EcoRI aus dem Vektor pCrCentrin-GFP herausgeschnitten. Anschließend wurde dieses Konstrukt in den Vektor Nit/pCrGFP, der mit XbaI und EcoRI geschnitten wurde, ligiert. Nit/pCrGFP enthält den *NITI* Promotor in der HindIII/PstI Schnittstelle von pCrGFP. Dieser Vektor wurde freundlicherweise von B. Koblenz zur Verfügung gestellt.

2.3.1.3 Klonierung von DIP13-GFP

Die kodierende Region von *DIP13* einschließlich 79 Bp der 5'UTR (Pfannenschmid et al., 2003; Genbank Accession Number: AF131736) wurde mittels PCR aus genomischer *C. reinhardtii* DNA mit den Primern dip1f1 und dip1r1 amplifiziert. Mit dem Vorwärtsprimer dip1f1 wurden eine XbaI und eine SpeI Restriktionsschnittstelle eingeführt. Mit dem Rückwärtsprimer dip1r1 wurden eine XbaI Schnittstelle sowie zwei Alanine als Linker zwischen DIP13 und CrGFP eingeführt. Dieses PCR-Produkt von 901

Bp wurde mit XbaI geschnitten und in die XbaI Schnittstelle des Vektors pCrGFP ligiert (pCrDIP13-GFP). Der *HSP70A/RBCS2* Promotor wurde mit HindIII und NheI aus pNCrGFP herausgeschnitten und in die HindIII und SpeI Schnittstellen von pCrDIP13-GFP kloniert (NheI und SpeI haben kompatible Enden).

Zur Co-Transformation des *C. reinhardtii* Stammes CC-3395 wurde pCrHSP70A/RBCS2-DIP13-GFP mit KpnI linearisiert und der Vektor pCB740 mit BamHI und EcoRI geschnitten (*ARG7* Gen).

Primer: (fett = Restriktionsschnittstellen; unterstrichen = Alanin-Linker)

- dip1f1: 5'-GCGTCTAGACTAGTTCAGACCGCAGATTACTGTATC-3'

- dip1r1: 5'-GCGTCTAGAGCCGCAGAGCTGGCCTGCTTCTTCTTGG-3'

2.3.1.4 Klonierung weiterer GFP-Konstrukte

Die C-terminal markierten GFP-Konstrukte wurden entsprechend der Centrin-GFP Klonierung durchgeführt. Als Template für die PCR diente in den meisten Fällen genomische DNA von *C. reinhardtii* (Ausnahmen s. u.). Die Klonierung in den Vektor pNCrGFP erfolgte wie für GFP-SFA beschrieben. Die Primer, die für diese PCRs verwendet wurden, wurden wie bereits beschrieben entworfen (s. o.).

Templates für PCR:

- α -1-Tubulin: pAK5 (Silflow et al., 1985)

- MAP4BD (wurde freundlicherweise von Dr. J. Mathur zur Verfügung gestellt)

2.3.2 Isolierung von genomischer DNA aus *C. reinhardtii*

Die Isolierung der genomischen DNA aus *C. reinhardtii* erfolgte mittels Plant DNAzol Reagenz (Invitrogen). Die Zellen wurden pelletiert (Beckmann, Microfuge ETM, Tischzentrifuge) und in 0,3 ml Plant DNAzol/0,1 g Nassgewicht Zellen gemörsert. Die nachfolgenden Schritte wurden nach Herstellerangaben durchgeführt.

2.3.3 Isolierung von RNA aus *C. reinhardtii*

Die Isolierung von Gesamt-RNA erfolgte mittels TRIzol Reagenz (Invitrogen). 30 ml Zellen einer ca. 7 Tage alten *C. reinhardtii* Kultur wurden pelletiert (ca. 0,1g) und mit 1ml TRIzol versetzt. Die Lyse der Zellen erfolgte durch auf- und abpipettieren. Anschließend wurde das Lysat für 10 min bei 12000 x g und 4°C (Sigma 2K15) geklärt. Die nachfolgenden Schritte wurden nach Herstellerangaben durchgeführt.

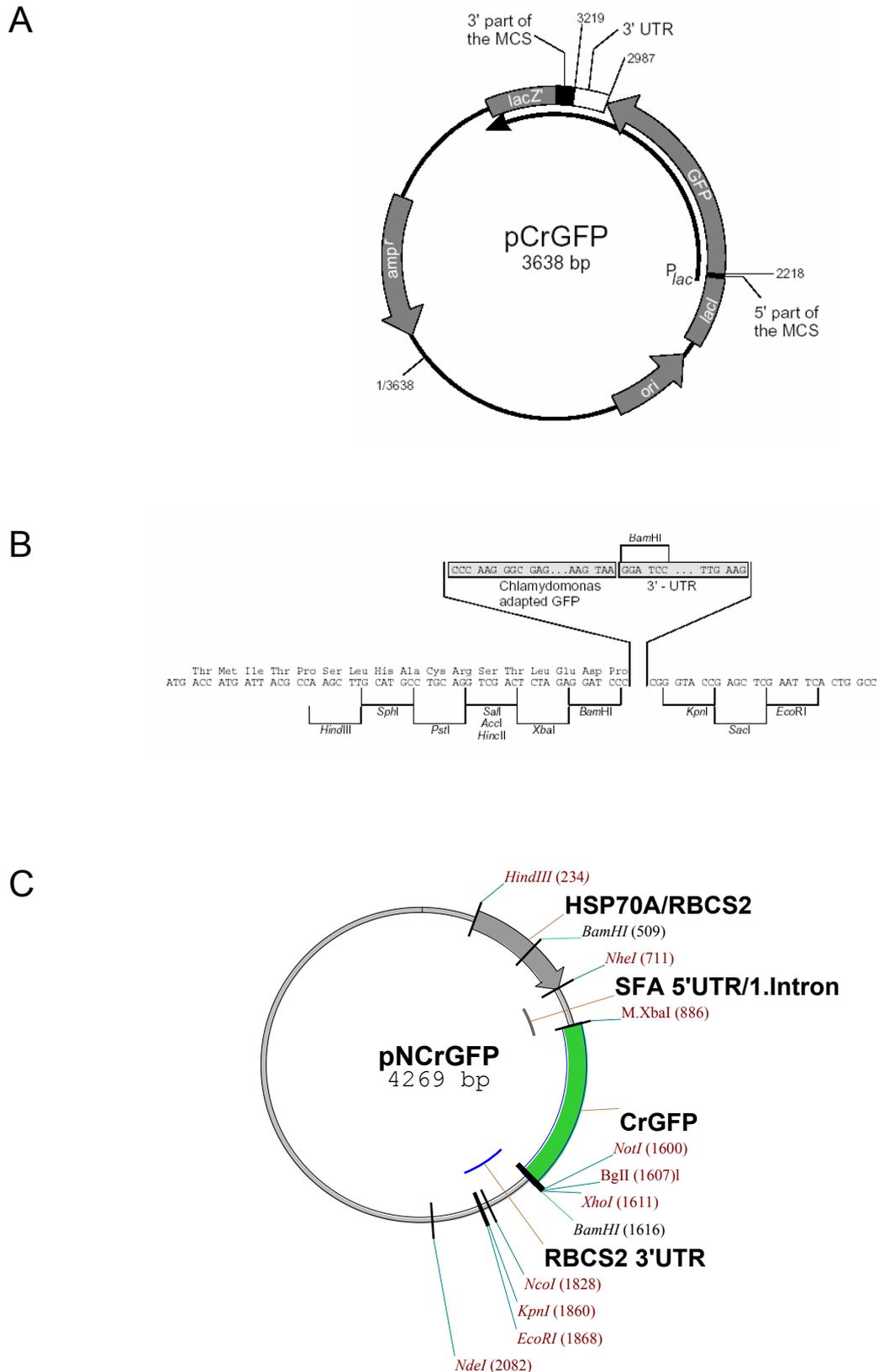


Abb. 2: Vektorkarten

A: Vektor pCrGFP und **B:** Klonierungsstelle von pCrGFP. Abbildung wurde aus dem Skript zum Vektor übernommen (BIOCAT; Fuhrmann et al., 1999).

C: pNCrGFP (Vektor wurde von Dr. K.-F. Lechtreck hergestellt)

2.3.4 PCR („Polymerase Chain Reaction“)

Ein 50 µl PCR-Ansatz zur Vervielfältigung der genomischen DNA Fragmente enthielt folgende Komponenten: 1 µl genomische DNA/Plasmid-DNA; 5 µl 10x Reaktionspuffer; 1 µl 10 mM dNTPs; 3 µl 50 mM MgCl₂; 0,5 µl Taq-Polymerase (5 U/µl GeneCrafter); je 2 µl 10 µM Vorwärts- und Rückwärtsprimer; 35,5 µl Wasser.

Die PCR Reaktionen wurden in einem Thermozykler (MWG-Biotech, Primus 96 plus) mit folgendem Standardprogramm durchgeführt: 3 min 97 °C; 25-30 Zyklen: 1 min 95 °C, 1 min 63 °C, 1 min/Kb 72 °C; 15 min 72 °C. Je nach Schmelztemperatur der Primer wurde die Bindungstemperatur für die Primer entsprechend angepasst.

Für den Nachweis spezifischer cDNAs wurden 25 µl PCR-Ansätze entsprechend durchgeführt. Dazu wurden 2,5 µl cDNA als Template eingesetzt. Die Primer zum Nachweis spezifischer cDNAs sind im Anhang 2 aufgeführt. Folgende Primerpaare wurden für die jeweiligen PCRs verwendet:

- Wildtyp-DIP13 cDNA: P1 und P2
- DIP13-GFP cDNA: P1 und P4
- α1-Tubulin-GFP cDNA: P3 und P4
- Centrin cDNA: P5 und P6
- GFP: P7 und P8
- SFA cDNA: P9 und P10

2.3.5 cDNA Synthese

Die cDNA-Synthese wurde mittels „Super Script First Strand Synthesis System for RT-PCR Superscript II“ (Invitrogen) durchgeführt. Als Ausgangsprodukt wurde Gesamt-RNA aus *C. reinhardtii* verwendet (vgl. 0). Aufgrund des hohen GC-Gehaltes von *C. reinhardtii* wurde das von Invitrogen vorgeschlagene Protokoll „First-strand cDNA Synthesis of Transcripts with High-GC Content“ durchgeführt. Es wurden 5 µg Gesamt-RNA eingesetzt.

2.3.6 Southern-Blot

Die geschnittene, genomische DNA wurde über Nacht auf einem 1,1 %igen Agarosegel bei 40 V aufgetrennt. Das Gel wurde mit Ethidium-Bromid gefärbt, dokumentiert und wie folgt unter leichtem Schütteln, bei RT behandelt:

- 5 min A. dest.

- 30 min in 10 Gel-Volumen 0,25 M HCl
- 5 min A. dest.
- 2 x 20 min in 10 Gel-Volumen Denaturierungslösung (1,5 M NaCl, 0,5 M NaOH)
- 5 min A. dest.
- 2 x 20 min in 10 Gel-Volumen Neutralisierungslösung (1,5 M NaCl, 0,5 M Tris-Cl, pH 7)

Die DNA wurde durch „Downward Capillary Transfer“ (Ausubel et al., 1995) auf eine positiv geladene Nylonmembran (Biodyne B 0,45 µm, Pall) transferiert („Blotten“). Nach der Immobilisierung der DNA durch UV-Quervernetzung und zusätzliches Backen für 1 h bei 80 °C, folgte die immunologische Detektierung.

2.3.7 Sonden-Hybridisierung und immunologische Detektierung für Southern-Blot

Die Sondenmarkierung, -hybridisierung und Detektierung wurde mit dem „DIG-Chem-Link Labeling und Detection Set“ (Roche) durchgeführt. Die Markierung der DNA-Sonde erfolgte gemäß Protokoll. Es wurden 1,5 µg DNA für die Sondenmarkierung eingesetzt.

Die Vorhybridisierung der Membran erfolgte für 45 min bei 65 °C in Church-Puffer. Anschließend wurde die Membran über Nacht mit 500 ng Sonde in 5 ml Church-Puffer bei 65 °C hybridisiert. Danach schlossen sich folgende Waschriffe an: 2 x 5 min in 2x SSC, 0,1 % SDS bei RT und 2 x 15 min in 0,5x SSC, 0,1 % SDS bei 65 °C.

Die immunologische Detektierung der DIG-markierten Proben wurde unter Schütteln bei RT wie folgt durchgeführt:

- 3 min waschen in Waschpuffer
- 1 h blockieren in 100 ml 1x Blockpuffer
- 2 h in 20 ml Antikörperlösung (1:10000 anti-Digoxigenin-alkalische Phosphatase Konjugat in 1x Blockpuffer)
- 2 x 15 min waschen in 100 ml Waschpuffer
- 2-5 min äquilibrieren in AP-Puffer (vgl. 2.6.1)
- Färberaktion alkalische Phosphatase (vgl. 2.6.1)

Hybridisierungspuffer: 1 mM EDTA, 0,5 M NaH²PO₄-H₂O pH 7,2, 7% (v/v) SDS

Waschpuffer: 0,1 M Maleinsäure, 0,15 M NaCl pH 7,5; 0,3 % (v/v) Tween 20

Blockpuffer: 10 % (w/v) Casein in 0,1 M Maleinsäure, 0,15 M NaCl pH 7,5

2.3.8 Transformation von *C. reinhardtii*

Die Transformation von *C. reinhardtii* erfolgte nach Kindle (1990) mittels der Glassperlen-Methode. Der zu transformierende *C. reinhardtii* Stamm wurde in 250 ml TAP-Medium (für Arginin-bedürftige Stämme mit 0,02 % Arginin) für 4 - 5 Tage bis zu einer Dichte von ca. $3 - 6 \times 10^6$ Zellen/ml kultiviert. Die Zellen wurden in 50 ml Reaktionsgefäßes bei ca. 650 X g (5-10 min; Hettich Rotixa/K) zentrifugiert und auf eine Konzentration von 2×10^8 Zellen/ml gebracht. Es wurden 15 ml Spitzboden-Reaktionsgefäße (Falcon) mit 0,3 g sterilen Glassperlen (0,75 - 1,0 mm, Roth) vorbereitet, in die jeweils 0,3 ml (5×10^7) Zellen gefüllt wurden. Die linearisierte Plasmid-DNA (s. u.) und 100 µl sterilfiltriertes 20 %iges PEG 8000 (Sigma) wurden zu den Zellen gegeben und für 45 sek auf höchster Stufe „gevortext“. Der Ansatz wurde danach unmittelbar mit 10 ml TAP-Medium aufgefüllt und ohne Glasperlen in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Zellen wurden dann für 2-5min bei ca. 650 x g (Hettich Rotixa/K) zentrifugiert, in 0,5 ml TAP aufgenommen und auf TAP-Agarplatten (15 g Agar auf 1 l Medium) ausplattiert. Die Agarplatten wurden nach dem Trocknen bei 22 °C (vgl. 2.2.2) gelagert.

C. reinhardtii Stämme, mit intakter Zellwand, wurden vor der oben beschriebenen Transformation mit Gameten-Autolysin, zur Auflösung der Zellwände, behandelt (vgl.2.4.2). Dazu wurden 5×10^7 Zellen pelletiert und in einer entsprechenden Menge Autolysin für 50 min bei RT geschüttelt. Anschließend wurden die Zellen pelletiert, in 0,3 ml TAP aufgenommen und wie oben beschrieben transformiert.

Pro Transformationsansatz wurden ca. 1,5 - 3 µg linearisierte Plasmid-DNA verwendet. Für Co-Transformationen mit dem *ARG7* Gen (pCB740, geschnitten mit BamHI und EcoRI) wurden die linearisierte Plasmid-DNA und pCB740 im Verhältnis 1:5 eingesetzt und die transformierten Zellen auf TAP-Agarplatten selektiert.

Für die Co-Transformation mit dem *ble* Gen (Vektor pMS171) als selektivem Marker, wurden der entsprechende linearisierte GFP-Vektor und pMS171 (linearisiert mit KpnI) im Verhältnis 1:5 bis 1:7 transformiert. Vor dem Ausplattieren der Ansätze wurden diese, zur Ausprägung der Resistenz, über Nacht und bei Dauerlicht, in TAP-Medium leicht geschüttelt. Die Selektion dieser Transformanten erfolgte auf TAP-Agarplatten mit 5 µg/ml Zeozin (Invitrogen).

Die weitere Analyse der erhaltenen Klone ist im Kapitel 2.4.1 beschrieben.

2.4 Präparative Methoden

2.4.1 Analyse von *Chlamydomonas reinhardtii* Transformanten

Nach dem Ausplattieren des Transformationsansatzes (vgl. 2.3.8) waren nach der Transformation der Arginin-bedürftigen Stämme, nach 4-7 Tagen die ersten Kolonien auf den Agarplatten sichtbar. Bei „Zeozin-Transformationen“ konnte es bis zu 2 Wochen dauern. Die Kolonien wurden in TAP-Medium in 96er Multiwell-Platten (Falcon) transferiert. Nach dem Wachstum, wurden 50 - 100 µl der Zellen entnommen, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, bei 500 x g pelletiert (Heraeus Labofuge) und in 15 - 20 µl MT-Puffer (vgl. 2.6.2) aufgenommen. Die Zellen wurde auf Poly-L-Lysin (0,1 % in A. dest., Sigma) behandelte „Multiwellslides“ (Roth) aufgetropft und nach dem Absetzen für 5-10 sek mit -20 °C kaltem Methanol fixiert. Die Analyse der Transformanten erfolgte mittels Fluoreszenzmikroskopie (vgl. 2.6.2).

2.4.2 Herstellung von Gameten-Autolysin

Zur Herstellung von Gameten-Autolysin wurde nach dem Protokoll von K. Shimogawara vorgegangen (<http://www.biology.duke.edu/chlamy/methods.html>). Die *C. reinhardtii* Stämme CC-620 (mt+) und CC-621 (mt-) wurden in 1 l Kulturgefäßen in 250 ml TAP-Medium bis zu einer Dichte von ca. 3×10^6 Zellen/ml kultiviert. Die Zellen wurden pelletiert (1050 x g, 5 min, Hettich Rotitaxa/K) und in 1 l TAP-N (NH₄Cl ersetzt durch die gleiche Konzentration an KCl) aufgenommen. Die Induktion der Gameten erfolgte für 24 h unter Dauerlicht und sanftem Schütteln in einem 2 l Erlenmeyerkolben. Die Zellen wurden anschließend für 5 min bei 3000 rpm (Sorvall RC5 Plus, GS3-Rotor) pelletiert und in 200 ml TAP-N resuspendiert. Beide Paarungs- („Mating“-) Stämme wurden in einem 2 l Erlenmeyerkolben vereinigt und die „Mating“-Reaktion fand für 1-2 Stunden bei Dauerlicht (ohne Schütteln) statt. Anschließend wurden die Zellen für 10 min bei 3000 rpm (Sorvall RC5 Plus, GS3-Rotor) abzentrifugiert und der Überstand erneut für 10 min bei 5000 rpm (s. o.) geklärt. Das Autolysin wurde aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert. Vor Verwendung des Autolysins wurde es sterilfiltriert.

2.4.3 Entgeißelung und Geißelregeneration von *C. reinhardtii*

C. reinhardtii Zellen wurden mit der pH-Schock Methode nach King (1995) entgeißelt. 15 ml der Zellen, kultiviert in M-Medium (vgl. 2.2.4), wurden ständig auf einem Magnetrührer gerührt. Durch Zugabe von 0,5 N Essigsäure wurde der pH-Wert auf pH 4,5 gebracht. Nach 30 sek erfolgte die Zugabe von 0,5 N KOH bis der pH-Wert auf pH 7 eingestellt war. Zur Kontrolle der Effizienz der Entgeißelung wurden Proben von den Zellen vor und nach dem Entgeißeln im Verhältnis 1:2 mit Lugol'scher Lösung fixiert. Die Bestimmung der Entgeißelungsrate erfolgte mit dem Mikroskop Olympus BH-2 (40er Objektiv).

Die Regeneration der Geißeln erfolgte im Licht, bei RT und unter leichtem Schütteln. Währenddessen wurden regelmäßig Proben genommen und wie oben beschrieben mit Lugol'scher Lösung fixiert. Die so fixierten Zellen wurden mit differentieller Interphasenkontrast Optik (DIC) (Nicon, Eclipse E800, 60er Ölimmersionsobjektiv) und mit einer Digitalkamera (Spot RT CCD Digital Kamera, Diagnostics Instruments) dokumentiert (vgl. 2.6.2).

Lugol'sche Lösung: 2 g KJ und 1 g J₂ gelöst in 100 ml A. dest.

2.4.4 In vivo Beobachtung und „Photobleaching“

Für in vivo Beobachtungen wurden *C. reinhardtii* Zellen 1:1 mit Agarose (TAP-Medium mit 2-3% „low-melting“ Agarose, ca. 40 °C warm) gemischt und auf einen Objektträger aufgetropft. Auf diesen Objektträger wurde vorher ein dünner Kreis mit Vaseline gezogen, um einen Abstand zwischen Objektträger und Deckgläschen zu garantieren. Anschließend wurde ein Deckgläschen aufgelegt und vorsichtig angedrückt.

Die Zellen wurden mit dem Fluoreszenzmikroskop (Nicon, Eclipse E800, 100er Ölimmersionsobjektiv) betrachtet.

Für die „Photobleaching“-Versuche stand ein konfokales Laserscanning System der Firma Leica (Leica TCS SP2) zur Verfügung. Es wurde ein Argonlaser verwendet. Die Aufnahmen vor und nach dem Bleichen wurden bei 488 nm und 41 %iger Laserintensität (3 Averages) gemacht. Das Bleichen erfolgte mit 100 %iger Laserintensität bei 476, 488 und 496 nm (40 Averages).

2.4.5 Probenaufbereitung für die SDS-PAGE

2.4.5.1 Präparation ganzer Zellen für die SDS-PAGE

Für die Herstellung von „Gesamtzellpräparaten“ für die SDS-PAGE wurden die Zellen pelletiert (500 x g 10 min, Heraeus, Labofuge 1) und in SDS-Probenpuffer (4x) resuspendiert. Die Proben wurden für 5 min bei 95 °C erhitzt und anschließend für 2 min zentrifugiert (Beckmann, Microfuge ETM, Tischzentrifuge). Bis zur weiteren Verwendung wurden die Proben bei -20 °C aufbewahrt.

SDS-Probenpuffer (4-fach konzentriert): 250mM Tris/HCl pH 6,8; 4mM EDTA; 8% (w/v) SDS; 40% (v/v) Glycerin; 2% (v/v) β-Mercaptoethanol; 0,2% (w/v) Bromphenolblau

2.4.5.2 Cytoskelettpräparation für die SDS-PAGE

10-20 ml Zellen wurden bei 500 x g (10 min, Heraeus, Labofuge 1) pelletiert. Die Überstände wurden abgenommen und die Pellets in 500 µl MT-Puffer (Mikrotubulinstabilisierender Puffer; vgl. 2.6.2) resuspendiert. Für die Lyse der Zellen wurden der Zellsuspension das gleiche Volumen MT-Puffer mit 3 % Triton X-100 zugesetzt. Die Cytoskelette (Pellet, unlösliche Fraktion) wurden anschließend bei 18320 x g für 15 min bei 4°C (Sigma 2K15) pelletiert. 150 µl des Überstandes wurden 1,35 ml MeOH versetzt und bei -20 °C für mindestens 2 h gefällt. Nach der Fällung wurde auch diese Probe bei 18320 x g (s. o.) pelletiert. Die Proben (Pellet und Überstand) wurden anschließend in 4-fach konzentriertem SDS-Probenpuffer (vgl. 2.4.5.1) aufgenommen, 5 min bei 95°C inkubiert, 2 min zentrifugiert (Beckmann, Microfuge ETM, Tischzentrifuge) und bis zur Verwendung bei -20 °C aufbewahrt.

2.5 Proteinbiochemische Methoden

2.5.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese wurde modifiziert nach Laemmli (1970) durchgeführt. Die Minigele hatten eine Trenngelstrecke von ca. 4,5cm. Es wurden überwiegend Trenngele mit einer 12,5%igen Acrylamidkonzentration verwendet. Die Zusammensetzung der Trenn-, Sammel- und Dichtungsgel ist in Tabelle 1 aufgelistet. Die Lösungen für die Gele wurden bis auf das APS pipettiert und für ca. 20 min im Exsikkator entgast. Nach Zugabe des Polymerisationsstarters APS wurden die

Gele sofort gegossen. Auf das Trenngel wurde n-Butanol geschichtet. Die Polymerisation der Minigele erfolgte für mindestens 2 h bei RT. Wenn die Polymerisation über Nacht erfolgte, wurde das n-Butanol durch Überschichtungspuffer (Trenngelpuffer 1:3 in A. dest. verdünnt) ausgetauscht und die Gele bei 4 °C aufbewahrt.

Die Elektrophorese wurde bei einer konstanten Stromstärke von 25 mA pro Gel in einer Elektrophoresekammer (Eigenbau der Werkstatt des Botanischen Instituts; Universität zu Köln) durchgeführt.

Folgende Stammlösungen wurden für die SDS-PAGE verwendet:

- Acrylamid: fertige Lösung der Fa. AppliChem, Acrylamid 4 K Lösung, Mix 37,5:1 (29,22 % Acrylamid4K; 0,78 % Bisacrylamid 4K)
- Trenngelpuffer: 1,5 M Tris/HCl pH 8,8; 0,8 % (w/v) SDS
- Sammelgelpuffer: 0,5 M Tris/HCl pH 6,8; 0,8 % (w/v) SDS
- TEMED: 100 %
- Ammoniumpersulfat (APS): 10 %ige Lösung
- Elektrodenpuffer: 25 mM Tris; 192 mM Glycin; 0,1 % (w/v) SDS

Stammlösungen	Trenngel (12,5 %)	Sammelgel	Dichtungsgel
A. dest. (ml)	1,55	1,95	-
Trenngelpuffer (ml)	1,35	-	-
Sammelgelpuffer (ml)	-	0,95	-
Acrylamid (ml)	2,10	0,65	1,50
TEMED (µl)	10	10	10
APS (µl)	20	20	15

Tab. 1: Zusammensetzung der SDS-Gele

Folgende Molekulargewichtstandards wurden zur Bestimmung der molekularen Masse der Proteine verwendet:

- MW-SDS-200 (Sigma, „High-Marker“): Myosin 205 kDa; β -Galaktosidase 116 kDa; Phosphorylase B 97,4 kDa; Rinderserumalbumin 66 kDa; Ovalbumin 45 kDa; Carboanhydrase 29 kDa
- MWS-SDS-70L (Sigma, „Low-Marker“): Rinderserumalbumin 66 kDa; Ovalbumin 45 kDa; Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase 36 kDa; Carboanhydrase 29 kDa; Trypsinogen 24 kDa; Trypsininhibitor 20,1 kDa; α -Lactalbumin 14,2 kDa

2.5.2 Elektrotransfer der Proteine

Für den Transfer von gelelektrophoretisch aufgetrennten Proteinen auf eine Transfermembran (PVDF-Membran, Millipore, ImmobilonTM-P, Porengröße 0,45 µm) wurde das Tankblot-Verfahren nach Towbin et al. (1979) angewendet. Als Filterpapier wurde Whatman (3MMChr) verwendet. Bis auf das Gel und die Membran wurden alle Bestandteile vor dem Zusammenbau sorgfältig in 4 °C kaltem Tankblotpuffer getränkt. Die Aktivierung der PVDF-Membran erfolgte für 1-2 min in Methanol und anschließend in A. dest. Die Blotapparatur wurde mit Eis gekühlt und der Proteintransfer erfolgte für 1,5 h bei 80 V.

Tankblotpuffer: 12,4 mM Tris; 83,7 mM Glycin; 10 % (v/v) Methanol

Eine Transfereinheit war wie folgt aufgebaut:

(Kathode)
gelochte Acrylplatte
Vlies
(2 Lagen Filterpapier getränkt in Tankblotpuffer)
Trenngel
PVDF-Membran
(2 Lagen Filterpapier getränkt in Tankblotpuffer)
Vlies
gelochte Acrylplatte
(Anode)

2.5.3 Färbungen

2.5.3.1 Ponceau-Färbung

Nach dem Transfer der Proteine auf die PVDF-Membranen wurden diese für 5 min in der Färbelösung inkubiert. Anschließend wurde in A. dest. entfärbt, bis die Proteinbanden sichtbar waren. Die Ponceau-Färbung ist eine reversible Färbung, die dazu dient, den Proteintransfer zu kontrollieren und die Membran nach Bedarf zu schneiden.

Ponceau S-Färbelösung: 0,2 % (w/v) Ponceau S; 3 % (v/v) Essigsäure

2.5.3.2 Amidoschwarz-Färbung

Die Transfermembran (PVDF-Membran) wurde für 3-5 min in der Färbelösung inkubiert und anschließend in Entfärbelösung entfärbt. Die Entfärbelösung wurde mehrfach ausgetauscht. Anschließend wurde die Membran zwischen zwei Filterpapieren getrocknet. Die Amidoschwarz-Färbung ist eine irreversible Färbung.

Amidoschwarz-Färbelösung: 90 % (v/v) Methanol; 10 % (v/v) Essigsäure; 0,1 % (w/v) Amidoschwarz 10 B

Amidoschwarz-Entfärbelösung: 90 % (v/v) Methanol; 10 % (v/v) Essigsäure

2.5.4 Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung erfolgte modifiziert nach Neuhoff et al., (1979). Dazu wurden je 2-5 µl der zu bestimmenden Probe (in SDS-Probenpuffer ohne Bromphenolblau) auf Celluloseacetat Membran (1 x 2 cm, Sartorius SM 11200) aufgetragen und nach dem vollständigen Eindringen der Probe, wurde die Membran für 5 min in Amidoschwarz-Färbelösung (vgl. 2.5.3.2) inkubiert. Die Entfärbung erfolgte in für 3 mal 5 min in Amidoschwarz-Entfärbelösung. Die Membran wurde unter Schütteln in DMSO vollständig gelöst und die Adsorption der Lösung bei 630 nm gemessen. Als Referenz diente eine gleichbehandelte Membran nur mit SDS-Probenpuffer. Die Proteinmenge wurde anhand einer Eichgeraden mit 0,5-10 µg BSA bestimmt.

Zur schnellen Abschätzung der Proteinkonzentration wurden je 2 µl Probe auf die Membran getropft und wie oben beschrieben gefärbt und entfärbt. Die Membran wurde mit BSA-Standards verglichen.

2.6 Immunologische Methoden

2.6.1 Western-Blot

Zur immunologischen Analyse von Proteinen wurden diese in einem Polyacrylamidgel gelelektrophoretisch aufgetrennt (SDS-PAGE, vgl. 2.5.1) und auf PVDF-Membran transferiert (vgl. 2.5.2). Die Membranen wurden über Nacht bei 4°C in Blockpuffer abgesättigt. Alle weiteren Schritte wurden bei RT auf einem Schüttler durchgeführt. Zunächst erfolgte für 1,5 h die Inkubation mit dem primären Antikörper (verdünnt in Blockpuffer). Nach dreimaligem Waschen von je 10 min in TBS (Tris-buffered-saline)-T-Puffer, erfolgte für 1,5 h die Inkubation mit dem sekundären Antikörper (anti-Maus- oder anti-Kaninchen-IgG Alkalische Phosphatase Konjugat, 1:4000 in Blockpuffer).

Anschließend wurden die Membranen wieder dreimal für je 10 min in TBS-T-Puffer gewaschen.

Für die Färberaktion der alkalischen Phosphatase wurden 50 µl der Stammlösungen NBT und 45-50 µl X-Phosphat pro 10 ml AP-Puffer eingesetzt. Die Membranen wurden solange in der Lösung inkubiert, bis die Färbung sichtbar wurde. Die Farbreaktion wurde in essigsaurem A. dest. (Tropfen Essigsäure in A. dest) abgestoppt und die Membranen zwischen zwei Filterpapieren getrocknet.

TBS-Puffer: 50 mM Tris/HCl, pH 7,5; 150 mM NaCl,

TBS-T-Puffer: TBS-Puffer; 0,05 % (v/v) Tween 20

Blockpuffer: TBS-T-Puffer; 2 % (w/v) Fischgelatine; 0,02 % (v/v) NaN₃

Alkalischer Phosphatase-Puffer (AP-Puffer): 100 mM Tris/HCl, pH 8,5; 100 mM NaCl; 5 mM MgCl₂

NBT: 75 mg/ml NBT (4-Nitro-Blau-Tetrazolium-Chlorid) in 70 % DMF

X-Phosphat: 50 mg/ml X-Phosphat (5-Brom-4-Chlor-3-Indoylphosphat) in 100 % DMF

Die Dokumentation der Western-Blots erfolgte mit einer Digitalkamera und mit dem Programm Adobe Photoshop 7.0 und Adobe Illustrator 8.0.

2.6.2 Indirekte Immunfluoreszenz

10 ml Zellkultur (2-3 x 10⁶ Zellen/ml) wurden für 5 min bei 500 x g (Heraeus, Labofuge 1) zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen in MT-Puffer aufgenommen. Es folgten verschiedene Präparationsmethoden. Entweder wurden die Zellen mit Methanol permeabilisiert und fixiert (vgl. 2.6.2.1) oder es wurden Cytoskelette isoliert (2.6.2.2).

Für alle Immunfluoreszenzpräparate wurden Diagnostische Objektträger („Multiwellslides“; Roth) mit A. dest. gespült, mit Poly-L-Lysin beschichtet, wieder mit A. dest. gespült und getrocknet.

Die Blockierung der Präparate wurde für 30 min bis über Nacht durchgeführt. Die Inkubationen mit dem primären und sekundären Antikörper erfolgten jeweils für 1,5 h. Jeweils nach den beiden Antikörperinkubationen wurden die Präparate mit Na-PBS gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurden die Präparate getrocknet und jede Vertiefung des „Multiwellslide“ mit 5 µl Stabilisierungspuffer (Glycerol/PBS Lösung AF1, Citifluor Ltd.) versehen. Auf die Objektträger wurde ein Deckgläschen aufgelegt und mit Nagellack fixiert. Die Präparate wurden bei 4 °C im Dunkeln gelagert.

Für indirekte Doppelimmunfluoreszenzen wurde je eine monoklonaler mit einem polyklonalen Antikörper kombiniert. Als sekundärer Antikörper wurden entweder anti-

Maus-IgG Cy3 Konjugat und anti-Kaninchen-IgG FITC Konjugat oder umgekehrt kombiniert. Zur Färbung der DNA wurde zusammen mit den sekundären Antikörpern der Fluoreszenzfarbstoff 4',6'-Diamidin-2'-phenylindol-dihydrochlorid (DAPI; Endkonzentration 5 µg/µl) eingesetzt. Die jeweiligen Antikörperverdünnungen sind im Abschnitt 2.1.1 angegeben.

Folgende Lösungen wurden für die Immunfluoreszenz verwendet:

MT-Puffer: 30 mM HEPES; 15 mM KCl; 5 mM EGTA; 5 mM MgSO₄; pH 7 (mit KOH)

Lysispuffer: MT-Puffer mit 0,5 % Nonidet-P40 oder 3% Triton X-100

Fixierpuffer: MT-Puffer mit 6 % Paraformaldehyd

Poly-L-Lysin: 0,1 % Poly-L-Lysin in A. dest.

Na-PBS: 1,5 mM NaH₂PO₄; 8,1 mM Na₂HPO₄; 150 mM NaCl; pH 7,4

Blockpuffer: PBS mit 0,05 % (v/v) Tween 20; 0,4 % (w/v) BSA; 1 % (v/v) Fischgelatine; pH 7,5

Die Ansicht der Immunfluoreszenzen erfolgte mit einem Fluoreszenzmikroskop (Nicon, Eclipse E800, 100er Ölimmersionsobjektiv) und die Dokumentation mit einer Digitalkamera (Spot RT CCD Digital Kamera, Diagnostics Instruments). Die Kamera war durch Metamorph Imaging Software (Universal Imaging, Corp.) kontrolliert. Die weitere Bildverarbeitung erfolgte mit den Programmen Adobe-Photoshop 7.0 und Adobe-Illustrator 8.0.

2.6.2.1 Indirekte Immunfluoreszenz an Methanol-permeabilisierten Zellen

Die konzentrierten Zellen in MT-Puffer wurden für 5-10 min auf die „Multiwellslides“ geklebt. Anschließend wurden die Objektträger für 5-7 min in -20 °C kaltem Methanol inkubiert. Dadurch werden die Zellen gleichzeitig permeabilisiert und fixiert. Nach dem Trocknen der Objektträger erfolgte die weitere Bearbeitung wie unter 2.6.2 beschrieben.

2.6.2.2 Indirekte Immunfluoreszenz an isolierten Cytoskeletten

Bevor die Zellen auf das „Multiwellslide“ geklebt wurden, erfolgte die Lyse der Zellen unter Zugabe des gleichen Volumens an Lysispuffer. Nach 45 sek wurden die Cytoskelette im Verhältnis 1:1 mit Fixierpuffer vorsichtig gemischt und für 5 min auf Eis fixiert. Danach wurde die Suspension für 20 min auf die „Multiwellslides“ getropft. Nach dem Waschen mit PBS wurden die Präparate wie unter 2.6.2 beschrieben weiter bearbeitet.

In einer anderen Methode wurden die Zellen 1:1 mit Fixierpuffer, der 0,2 % Triton X-100 enthielt, gemischt und für 20 min auf das „Muliwellslide“ getropft. Nachdem Waschen mit PBS wurden die Präparat wie unter 2.6.2 beschrieben bearbeitet.

2.7 Elektronenmikroskopie

Zur ultrastrukturellen Untersuchung von *C. reinhardtii* Zellen wurden diese konzentriert (5 min bei 500 x g, Heraeus, Labofuge 1) und in TAP-Medium aufgenommen. Die Zellen wurden im Verhältnis 1:1 mit 1% Osmiumtetroxid und 4% Glutaraldehyd in TAP-Medium gemischt und für 15 min auf Eis und anschließend für 30 min bei RT fixiert. Es folgten zwei Waschungen in TAP-Medium, bevor die Zellen in Agar (2 % (w/v) Agar noble in A. dest) eingebettet wurden. Die in Agar eingebetteten Proben wurden jeweils für 20 min in 30-, 50-, 70-, 90 %igem Ethanol und dreimal in 100 %igem Ethanol entwässert. Danach wurde die Proben für 20 min in Ethanol/Propylenoxid (1:1) und 20 min in Propylenoxid inkubiert. Anschließend wurden die Proben in ein Eppendorfgesäß mit Propylenoxid/Epon (1:1) überführt und im geschlossenen Gefäß ü. N. inkubiert. Zum Abdampfen des Propylenoxid wurden die Eppendorfgesäße für 12-24 h geöffnet. Danach wurden die Agarblöckchen in frisches Epon überführt und darin für weitere 24-48 h inkubiert. Nach dem Zerschneiden des Agarblöckchens und Eindringen in die Brennform erfolgte die Aushärtung des Epons bei 60 °C für 24-48 h.

Die Ultradünnschnitte wurden freundlicherweise von Dr. A Grunow oder Dr. S. Geimer angefertigt und die Kontrastierung der Ultradünnschnitte wurde von Dr. K.-F. Lechtreck vorgenommen. Die Kontrastierung wurde wie folgt durchgeführt: 15 min mit Uranylacetat (2% in A. dest), waschen in A. dest und 5 min in Bleicitrat.

Für die Betrachtung der elektronenmikroskopischen Präparate stand ein Transmissions-Elektronenmikroskop Philips CM 10 zur Verfügung. Die Dokumentation erfolgte mit einer Plattenkamera vom Format 65 x 90 mm.

3 Ergebnisse

Ziel dieser Arbeit war die Expression von GFP-markierten Cytoskelettproteinen in der Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii*. Bisher wurde die Technik der GFP-Markierung in *C. reinhardtii* nur wenig angewandt (vgl. Einleitung). Die GFP-Markierung von Proteinen bietet den großen Vorteil der in vivo Beobachtung dieser Proteine und somit der Untersuchung von dynamischen Prozessen. Da *C. reinhardtii* ein Modellorganismus für die Untersuchung des Basalapparates und der Geißel ist, sollten verschiedene Bestandteile dieser Strukturen mit GFP markiert und analysiert werden.

3.1 Expression von GFP-SFA in *C. reinhardtii*

„Striated fiber assemblin“ (SFA) ist in Grünalgen der Hauptbestandteil der quergestreiften Fasern („striated microtubule-associated fibers“, SMAFs), die entlang der vier mikrotubulären Geißelwurzeln verlaufen und an den Basalkörpern assoziiert sind (Lechtreck und Melkonian, 1991a; vgl. Einleitung). Untersuchungen zur Expression von SFA, welches am C-Terminus eine GFP-Markierung besitzt (SFA-GFP, Lechtreck et al., 2002) ergaben, dass sich das Fusionsprotein zu quergestreiften Fasern zusammenbaute und in der Fluoreszenz die typische kreuzförmige Struktur sichtbar war. Bei weiteren Analysen zeigte sich aber, dass SFA-GFP mehrere Nachteile hatte. Das Fusionsprotein war zum Teil löslich, und die SFA-GFP Fasern waren bei höheren Temperaturen instabil. Versuche, die Kopfdomäne in einem SFA-GFP Konstrukt zu verkürzen, waren nicht erfolgreich. Mögliche Gründe, warum diese Verkürzung der Kopfdomäne in einem C-terminal markierten SFA-GFP Konstrukt nicht exprimiert werden konnten, könnten sein, dass die 5'UTR des *SFA* Gens und/oder das 1. Intron im *SFA* Gen, welches direkt hinter dem Startcodon lokalisiert ist, essentiell für die Expression des Gens unter der Kontrolle des *HSP70A/RBCS2* Promotors (Schroda et al., 2000) ist (Lechtreck et al., 2002).

Aufgrund der o. g. Nachteile von SFA-GFP und der nicht erfolgreichen Expression von Konstrukten mit verkürzter Kopfdomäne von SFA-GFP, sollte eine Analyse von N-terminal GFP-markiertem SFA durchgeführt werden. Dazu wurde der Vektor pNCrGFP hergestellt (vgl. Abb. 2C). Der Vektor enthält 88 Bp der 5'UTR, das Startcodon und das 1. Intron des *SFA* Gens vor dem *CrGFP*. In die BglII Schnittstelle von pNCrGFP wurde das *SFA* Gen ab der 5. Aminosäure (AS) eingefügt. GFP-SFA beginnt mit den ersten

drei AS von SFA (MSL). Es folgen drei AS (SRS), die durch die Klonierungsschritte entstanden sind, und dann das CrGFP. Dieses ist durch einen Linker von zwei Alaninen von den restlichen Aminosäuren (5-276) des SFA getrennt. Der resultierende Vektor hat das *GFP::SFA* Konstrukt hinter den *HSP70A/RBCS2* Promotor (Schroda et al., 2000) und vor die *RBCS2* 3'UTR geschaltet (Abb. 3A, vgl. 2.3.1.1). Das Produkt wird in der weiteren Arbeit als GFP-SFA bezeichnet.

3.1.1 Analyse von GFP-SFA exprimierenden *C. reinhardtii* Stämmen

Nach der Co-Transformation des *GFP::SFA* Konstruktes (pNCrGFP-SFA) mit dem *ARG7* Gen als selektivem Marker in den *C. reinhardtii* Stamm CC-3395, wurden die Transformanten mittels Fluoreszenzmikroskopie analysiert. Es wurden 40 Klone getestet, von denen 16 ein kreuzförmiges GFP-Signal, welches am Basalapparat lokalisiert war, zeigten. Die verschiedenen Stämme wiesen allerdings Unterschiede in der Stärke der GFP-Signale auf, und auch die Längen der GFP-SFA Fasern in den verschiedenen Stämmen waren unterschiedlich. Außerdem waren zwei der vier kreuzförmig angeordneten GFP-SFA Fasern länger als die beiden anderen (Abb. 3B, d, f, Pfeile auf längere Fasern). Bei Färbungen von Kontrollzellen mit dem Antikörper anti-SFA sind die vier Fasern jeweils ungefähr gleich lang und kürzer, als die der GFP-SFA exprimierenden Zellen (Abb. 3B a, b). In Abb. 3B sind zwei Beispiele für GFP-SFA exprimierende *C. reinhardtii* Stämme im Vergleich zu Kontrollzellen, die mit anti-SFA gefärbt wurden, dargestellt. Der Stamm GFP-SFA A10 besaß mittellange GFP-SFA Fasern (ca. 2 μm , Abb. 3B, c, d) und der Stamm GFP-SFA D5 hatte bis zu 3-4 μm lange GFP-SFA Fasern (Abb. 3B, e, f). Diese beiden Stämme wurden weitergehend analysiert.

Für Western-Blot Analysen wurden Zellen mit 1,5 % Triton X-100 extrahiert und durch anschließende Zentrifugation in Pellet (isolierte Cytoskelette, unlösliche Fraktion) und Überstände (lösliche Fraktion) getrennt. Anschließend wurde mit dem Antikörper anti-SFA gefärbt. Der Western-Blot (Abb. 3C) vergleicht Wildtyp, SFA-GFP und zwei Stämme, die GFP-SFA exprimieren. In den GFP-SFA Stämmen A10 und D5 konnte neben der Wildtyp-SFA Bande bei 34 kDa (Abb. 3C, Pfeil SFA), eine zusätzliche Bande bei ca. 60 kDa (Abb. 3C, Pfeil GFP-SFA) detektiert werden. Das Wildtypprotein sowie das GFP-SFA Fusionsprotein waren jeweils im unlöslichen Bestandteil der fraktionierten Zellen vertreten (Abb. 3C). Das heißt also, dass Wildtyp-SFA und GFP-SFA nicht löslich sind. Des Weiteren zeigte die Western-Blot Analyse, dass der GFP-SFA

Stamm D5, der die längeren GFP-SFA Fasern besitzt, eine größere Menge an Fusionsprotein exprimiert als der Stamm A10 mit den kürzeren GFP-SFA Fasern. Außerdem exprimierten die beiden untersuchten GFP-SFA Stämme im Vergleich zum Kontrollstamm weniger Wildtyp-SFA (Abb. 3C, Pfeil SFA). Bei SFA-GFP 8 Zellen (Lechtreck et al., 2002), die das GFP an den C- Terminus von SFA fusioniert haben, ist das Fusionsprotein, im Gegensatz zu GFP-SFA exprimierenden Zellen, zum Teil löslich (Abb. 3C, zusätzliche Bande im Überstand). Für weitere Analysen wurde der GFP-SFA Stamm D5 ausgesucht, da er eine starke Expression des Fusionsproteins zeigte.

3.1.2 GFP-SFA Fasern sind hitzestabil

Das *GFP::SFA* und das *SFA::GFP* Konstrukt stehen beide unter der Kontrolle des starken konstitutiven *HSP70A/RBCS2* „Kombi“-Promotors (Schroda et al., 2000). Dieser Promotor lässt sich u. a. auch mit Hitze induzieren. Analysen mit SFA-GFP (Lechtreck et al., 2002) exprimierenden *C. reinhardtii* Zellen zeigten jedoch, dass nach einer Stunde Inkubation bei 40 °C, die SFA-GFP Fasern kürzer wurden und nur noch punkt- oder kleine kreuzförmige Strukturen im Fluoreszenzmikroskop sichtbar waren (Abb. 4, c-d). GFP-SFA Fasern hingegen waren, wie auch die Wildtyp-SFA Fasern (nicht gezeigt), stabil gegen einen einstündigen Hitzeschock von 40 °C (Abb. 4 a-b). In einigen Versuchen waren die GFP-SFA Fasern nach dem einstündigen Hitzeschock länger (ca. 10 – 30 %; n = 167; gemessen wurden nur die beiden längeren GFP-SFA Fasern). GFP-SFA Fasern verhalten sich im Bezug auf ihre Löslichkeitseigenschaften somit eher wie Wildtyp-SFA Fasern als SFA-GFP Fasern.

3.1.3 Die Kopfdomäne von SFA ist notwendig für die Faserbildung

Mit dem Ziel, die Funktion der Kopfdomäne von SFA *in vivo* zu untersuchen, wurden zwei unterschiedliche GFP-SFA Deletionskonstrukte stabil in *C. reinhardtii* CC-3395 exprimiert. Zum einen wurde die Kopfdomäne um die 4. bis 14. Aminosäure (GFP-SFA Δ H4-14) und zum anderen um die 4. bis 32. Aminosäure (GFP-SFA Δ H4-32), also um die komplette Kopfdomäne von SFA, verkürzt (vgl. Abb. 5A). Aufgrund der Konstruktion von pNCrGFP wurden die 1. bis 3. Aminosäure nicht deletiert (vgl. 3.1).

Die Analyse mittels Fluoreszenzmikroskopie ergab, dass nach der Transformation mit GFP-SFA Δ H4-14, 8 von 32 getesteten Klonen ein GFP Signal am Basalapparat aufwiesen (Abb. 5A). Auch bei diesen Stämmen gab es wieder Unterschiede in der Expressi-

onsstärke. Bei stärker exprimierenden Stämmen, wie GFP-SFA Δ H4-14 B2, waren die vier kreuzförmig angeordneten GFP-SFA Fasern sehr kurz und von gleicher Länge (vgl. Abb. 5B, b). Bei Stämmen, die mit GFP-SFA Δ H4-32 transformiert wurden, konnten 20 von 32 in der Fluoreszenz getesteten Klonen mit einem GFP-Signal beobachtet werden (Abb. 5A). Die zum Teil sehr schwachen Signale waren als punktförmige Strukturen am Basalapparat lokalisiert. Von 11 Stämmen, die in der Fluoreszenz ein Signal zeigten, konnte nur bei einem Stamm (GFP-SFA Δ H4-32 C2) bei Western-Blot Analysen mit Präparaten „ganzer Zellen“ eine positive Bande mit dem anti-SFA Antikörper detektiert werden (Abb. 5A). Dieser Stamm zeigte, im Verhältnis zu anderen positiven Stämmen, in der Fluoreszenz ein stärkeres punkt- bis kreuzförmiges Signal am Basalapparat von *C. reinhardtii* (Abb. 5B, c). Im Vergleich zum GFP-Signal von GFP-SFA Δ H4-14 B2 (Abb. 5B, b) war das Signal aber schwächer und die Fasern kürzer.

Die Western-Blot Analyse mit fraktionierten Zellen (Pellet/Überstand) von Kontrolle, GFP-SFA D5 (volle Länge GFP-SFA), GFP-SFA Δ H4-14 B2 und GFP-SFA Δ H4-32 C2 zeigte im Vergleich, dass die Deletion der Kopfdomäne von GFP-SFA zur Löslichkeit des Fusionsproteins führte (Abb. 5C, Pfeil). Die Intensität der Fusionsproteinbanden, die mit anti-SFA reagierten, wurde densitometrisch ausgewertet. Bei der Deletion von 10 Aminosäuren der SFA Kopfdomäne waren ca. 60 % des gesamten Fusionsproteins löslich. Die Deletion von 29 Aminosäuren führte zu 90 %iger Löslichkeit des Fusionsproteins (Abb. 5C).

Die Deletion der Kopfdomäne von GFP-SFA vermindert also die Fähigkeit der GFP-SFA-Moleküle, Fasern zu bilden. Fasern, welche die Wildtypfasern in der Länge übertrafen, waren nach der Deletion der Kopfdomäne nicht zu beobachten. Außerdem erhöhte sich nach der Deletion der Kopfdomäne die Löslichkeit des Fusionsproteins. Dabei nahm die Löslichkeit mit der Länge der Deletion zu. Einen Einfluss auf den Phänotyp der Zellen hatten die Deletionen allerdings nicht. Die Kopfdomäne von SFA scheint somit für die Faserbildung notwendig zu sein. Allerdings muss in diesem Zusammenhang darauf hingewiesen werden, dass noch Wildtyp-SFA in den Zellen vorhanden ist. Die deletierten GFP-SFA Moleküle könnten mit dem Wildtyp-SFA co-polymerisieren.

Abb. 3: Analyse von GFP-SFA exprimierenden *C. reinhardtii* Zellen**A: Schematische Darstellung von pNCrGFP-SFA**

GFP::SFA steht unter der Kontrolle des *HSP70A/RBCS2* Promotors und wird von der *RBCS2* 3'UTR terminiert. Vor das *CrGFP* wurden 88 Bp der 5'UTR sowie das 1. Intron vom *SFA* Gen kloniert. Das GFP-SFA Fusionsprotein beginnt mit den ersten drei Aminosäuren von SFA (MSL). Es folgen drei Aminosäuren (**SRS**), die durch die Klonierungsschritte entstanden sind. Daran ist das CrGFP fusioniert, welches durch zwei Alanine (**AA**) vom restlichen Teil von SFA (AS 5-276) getrennt ist. Bei der Herstellung des Vektors war Dr. K.-F. Lechtreck beteiligt.

B: Fluoreszenzen von GFP-SFA exprimierenden *C. reinhardtii* Zellen im Vergleich zur indirekten Immunfluoreszenz an Kontrollzellen

a, b: Kontrollzellen wurden mit Methanol permeabilisiert/fixiert und mit anti-SFA (1:200) und anti-Kaninchen IgG FITC (1:100) gefärbt.

c-f: GFP-SFA exprimierende Zellen wurden mit Methanol fixiert.

Im Vergleich zu den SMAFs in den Kontrollzellen (**a, b**) sind die vier kreuzförmig angeordneten GFP-SFA Fasern länger (**c-f**). Die GFP-SFA Fasern von GFP-SFA A10 (**c, d**) sind kürzer als die von GFP-SFA D5 (**e, f**). In beiden Stämmen sind zwei der vier kreuzförmig angeordneten Fasern länger (Pfeile in **d, f**). Maßstäbe: 5 μm (in e für a, c, e; in f für b, d, f).

C: Western-Blot Analyse von GFP-SFA exprimierenden Stämmen

Cytoskelette (Pellet, P) und Überstände (Ü) von Kontrollzellen (Kontrolle), SFA-GFP 8, GFP-SFA A10 und D5 Zellen wurden durch SDS-PAGE (12,5 %) aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Es wurde ca. 20 μg Protein pro Spur aufgetragen. Der untere Bereich des „Blots“ wurde abgetrennt und zur Ladungskontrolle mit Amidoschwarz gefärbt. An der linken Seite ist der Molekulargewichtstandard markiert. Die Membran wurde mit anti-SFA (1:3000) gefärbt.

Pfeil SFA: Bande von Wildtyp-SFA bei ca. 34 kDa.

Pfeil GFP-SFA/SFA-GFP: Bande des Fusionsproteins bei ca. 60 kDa.

Abb. 4: Der Effekt von Hitze auf GFP-SFA und SFA-GFP exprimierende Zellen

GFP-SFA D5 (**a, b**) und SFA-GFP 8 Zellen (**c, d**) wurden eine Stunde bei 40°C inkubiert. Direkt vor (t0) und direkt nach dem Hitzeschock (t60) wurden die Zellen mit Methanol permeabilisiert und für die Fluoreszenz präpariert.

Vor der Inkubation bei 40°C (t0; **a, c**) ist in beiden Stämmen die kreuzförmige Anordnung der GFP-SFA Fasern zu sehen. Der Hitzeschock hat auf die Fasern von GFP-SFA D5 Zellen keinen Effekt (t60). Zum Teil waren zusätzliche GFP-Aggregate in der Zellen zusehen und die Fasern waren in einigen Versuchen länger (**b**).

In SFA-GFP 8 Zellen führte der einstündige Hitzeschock von 40 °C zum Abbau der Fasern (**d**).

Maßstab: 5µm

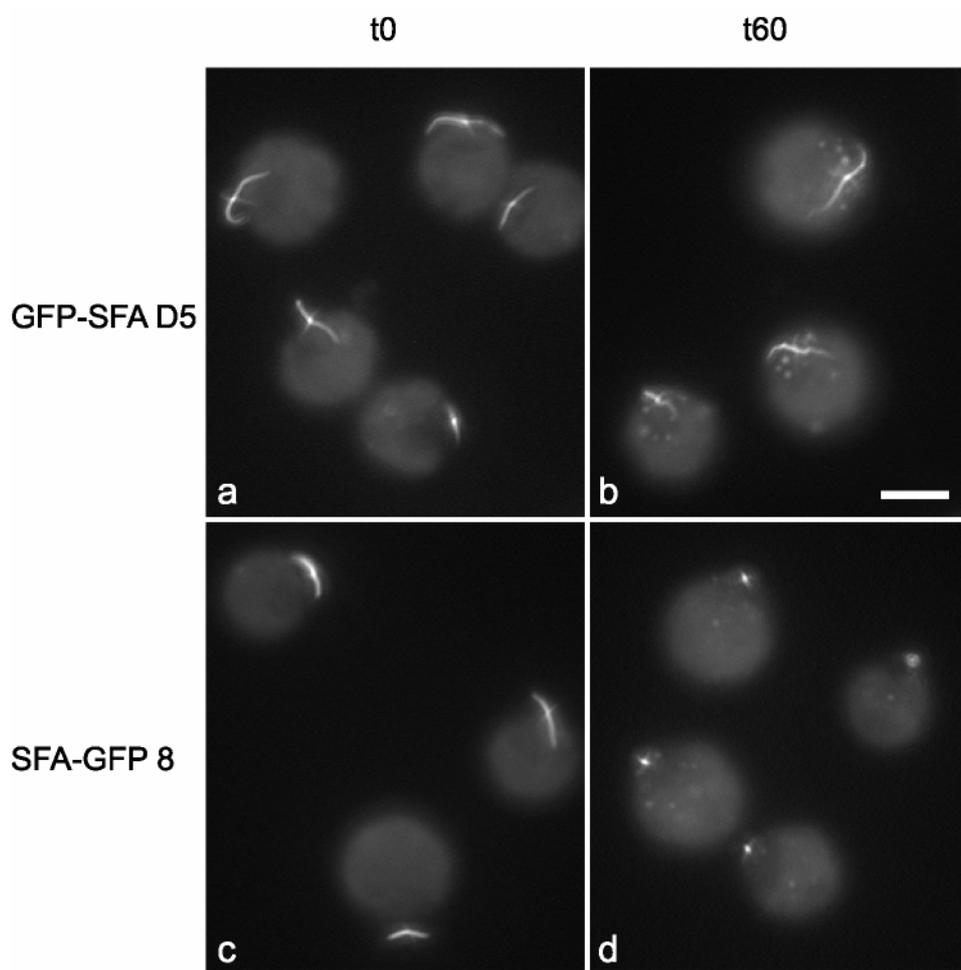


Abb. 5: Untersuchung der N-terminalen Domäne von SFA**A: Schematische Darstellung der verschiedenen GFP-SFA Konstrukte**

Es wurden zwei verschiedenen lange Deletionen der Kopfdomäne von GFP-SFA vorgenommen: GFP-SFA Δ H4-14 hat die 4. bis 14. AS und GFP-SFA Δ H4-32 die 4. bis 32. AS deletiert. Diese Deletionskonstrukte sind im Vergleich zum nicht verkürzten Konstrukt (GFP-SFA) dargestellt. Angegeben sind jeweils die Anzahl der getesteten und positiven Klone in der Fluoreszenz (F) und im Western-Blot (WB). Es wurden z. B. 40 GFP-SFA exprimierende Klone in der Fluoreszenz getestet, von denen 16 positiv waren.

WC = ganze Zellen; P = Pellet; Ü = Überstand; + = positiv; - = negativ.

B: Fluoreszenzen von GFP-SFA Δ H4-14 und GFP-SFA Δ H4-32 Stämmen

GFP-SFA D5 (a), GFP-SFA Δ H4-14 B2 (b) und GFP-SFA Δ H4-32 C2 (c) wurden mit Methanol fixiert. Mit zunehmender Verkürzung der Kopfdomäne von GFP-SFA werden die GFP-SFA Fasern kürzer und es sind nur noch kleine kreuz- bis punktförmige GFP Signale zu sehen.

Maßstab: 5 μ m

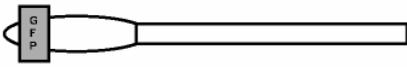
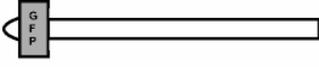
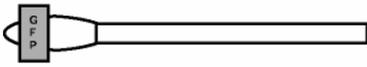
C: Western-Blot Analyse von Stämmen, die N-terminal verkürztes GFP-SFA exprimieren

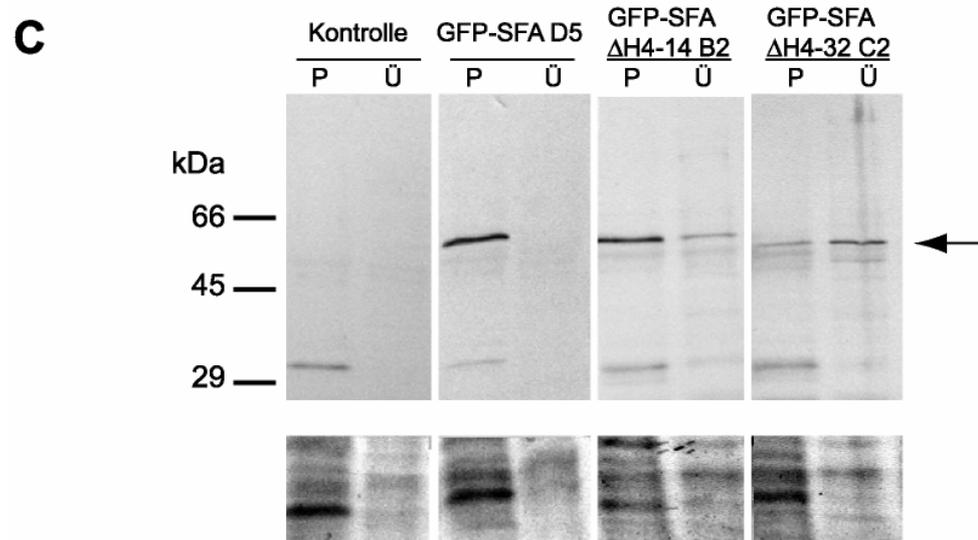
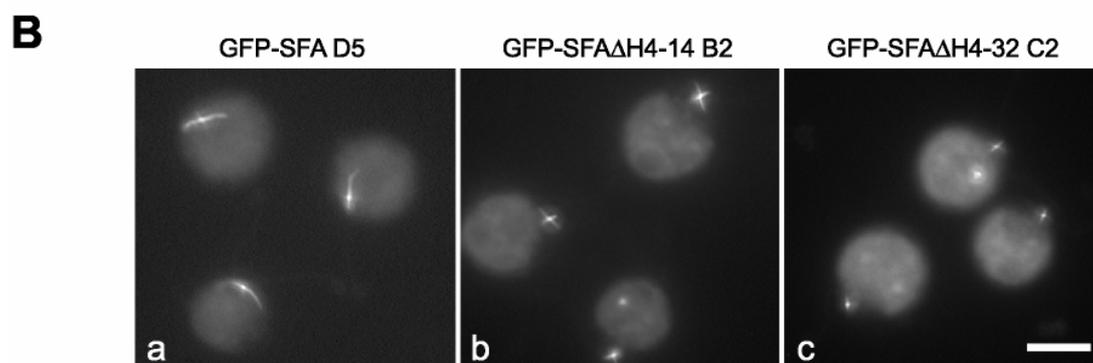
Cytoskelette (Pellet, P) und Überstände (Ü,) von Kontrollzellen (Kontrolle), GFP-SFA D5, GFP-SFA Δ H4-14 B2 und GFP-SFA Δ H4-32 C2 Zellen wurden durch SDS-PAGE (12,5 %) aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Es wurde ca. 20 μ g Protein pro Spur aufgetragen. Der untere Bereich des „Blots“ wurde abgetrennt und zur Ladungskontrolle mit Amidoschwarz gefärbt. An der linken Seite ist der Molekulargewichtsstandard markiert. Die Membran wurde mit anti-SFA (1:3000) gefärbt.

Der Antikörper reagiert in den Pellets (P) von allen untersuchten Stämmen mit der Wildtyp-SFA Bande bei 34 kDa.

Der Pfeil markiert die Bande des Fusionsproteins bei ca. 60 kDa. Im Überstand wurden ca. 15 % der Zellen des Pellets geladen. Die Intensität der Banden wurde densitometrisch ausgewertet: Die Deletion von 10 AS führte zu 60 %iger Löslichkeit des gesamten Fusionsproteins. Die Deletion von 29 Aminosäuren führte zu 90 %iger Löslichkeit des gesamten Fusionsproteins.

A

	Diagram	F	WB		
			WC	P	Ü
GFP-SFA		+ (16/40)	+ (5/5)	+	-
GFP-SFA ΔH4-32 Δ N-term 4-32		+ (20/32)	+ (1/11)	(+)	+
GFP-SFA ΔH4-14 Δ N-term 4-14		+ (8/32)	+ (5/6)	+	+



3.1.4 Centrin-RNAi in GFP-SFA Zellen

Centrin, ein weiteres Basalapparatprotein von *Chlamydomonas reinhardtii*, ist Bestandteil von kontraktilen Fasern, die mit dem Basalapparat assoziiert sind. Dazu zählen die distale Verbindungsfibrille und die NBBCs („nucleus-basal body connectors“). Zudem ist Centrin in den Basalkörpern lokalisiert (Salisbury, 1995; vgl. Einleitung). Centrin-RNAi führt in *C. reinhardtii* zu einem reduzierten Gehalt an Centrin und dem Fehlen von Centrin-haltigen Fasern. Phänotypisch haben die Zellen eine variable Anzahl an Geißeln (Koblenz et al., 2003). Die Transformation des Centrin-RNAi induzierenden Konstruktes in GFP-SFA D5 Zellen zeigte, dass Defekte im Centrinsystem auch einen störenden Effekt auf das Geißelwurzelsystem und somit auf das SFA-Fasersystem haben (Koblenz et al., 2003). Im Rahmen dieser Arbeit sollte der Einfluss von Centrin-RNAi auf das GFP-SFA Fasersystem statistisch erfasst werden.

Der *C. reinhardtii* Stamm GFP-SFA D5 (vgl. Abb. 3B e, f) wurde mit einem Vektor, der Centrin-RNAi induziert („Sense-Antisense“-Hybridkonstrukt eines Teils der Centrin DNA unter Kontrolle des *HSP70A/RBCS2* Promotors; Koblenz et al., 2003) und mit dem *ble* Gen als selektivem Marker co-transformiert. Der RNAi induzierende Vektor wurde freundlicherweise von B. Koblenz zur Verfügung gestellt. Die Analyse von 60 Klonen ergab, dass zwei Stämme einen ausgeprägten Centrinmangel aufwiesen. Davon wurde einer, GFP-SFA/CentrinRNAi C11, für die weiteren Analysen ausgewählt.

Die Zellen von GFP-SFA/CentrinRNAi C11 besaßen zu 14,7 % keine Geißeln, zu 28,3 % eine und zu 51,8 % zwei Geißeln (n = 191). Im Vergleich dazu hatten Kontrollzellen zu 96 % (n = 174) und GFP-SFA D5 Zellen zu 93,1 % (n = 216) zwei Geißeln (vgl. Tab. 2).

Geißelanzahl [%]	0	1	2	3	≥4	n
Kontrolle	1,1	1,8	96,0	0	1,1	174
GFP-SFA D5	2,3	1,8	93,1	0	2,8	216
GFP-SFA/CentrinRNAi C11	14,7	28,3	51,8	4,2	1,0	191

Tab. 2: Geißelanzahl der GFP-SFA/CentrinRNAi Zellen

Die Zellen wurden mit Lugol'scher Lösung fixiert und die Anzahl der Geißeln im Phasenkontrast Mikroskop bestimmt. n = ausgewertete Zellen.

Das Centrinsystem des GFP-SFA/CentrinRNAi Stammes war stark defekt. Die Zellen wiesen nur noch zu 7,6 % ein Fasersystem, d. h. sichtbare NBBCs auf. Zum größten Teil (58,9 %) hatten sie zwei Basalkörper. Die anderen Zellen hatte eine variable Anzahl von einem, drei, vier und mehr Basalkörpern (vgl. Tab. 3).

Centrinsystem [%]	NBBCs	0 BK	1 BK	2 BK	3 BK	≥4BK	n
GFP-SFA/CentrinRNAi C11	7,6	17,3	6,6	58,9	5,6	4,0	1160

Tab. 3: Centrinsystem im GFP-SFA/CentrinRNAi C11 Stamm

Zellen wurden für die Immunfluoreszenz mit Methanol permeabilisiert/fixiert und mit anti-Centrin gefärbt. Es wurden vier unabhängige Zählungen durchgeführt, deren Werte gemittelt wurden. NBBCs = „nucleus-basal body connectors“; BK = Basalkörper; n = ausgewertete Zellen.

Abbildung 6A zeigt verschiedene GFP-SFA/CentrinRNAi C11 Zellen (b-e) und als Kontrolle eine GFP-SFA D5 Zelle mit Wildtyp-Centrinsystem (a1) und vier kreuzförmig angeordnete GFP-SFA Fasern (a2). Bei Centrin-RNAi Zellen ohne Basalkörper besaßen von 145 Zellen 17,2 % keine GFP-SFA Fasern. Der größte Teil der Zellen ohne Basalkörper hatte eine bis drei GFP-SFA Fasern (82,8 %), die jedoch nie kreuzförmig angeordnet waren. In Abbildung 6A (b) ist ein Beispiel für eine Zelle ohne Basalkörper (b1) und mit drei GFP-SFA Fasern (b2) gezeigt. In Zellen mit Basalkörpern, waren alle Basalkörper mit GFP-SFA Fasern assoziiert. Zellen mit einem Basalkörper konnten eine lange GFP-SFA Faser (Abb. 6A c) oder auch mehrere Fasern haben. Zellen mit mehr als zwei Basalkörpern hatten oft mehr als vier GFP-SFA Fasern (Abb. 6A d, e). Insgesamt hatten 52,7 % (n = 220) der GFP-SFA/CentrinRNAi C11 Zellen ein defektes GFP-SFA Fasersystem, d. h. abweichend von den vier stereotypisch kreuzförmig angeordneten Fasern. Im Vergleich dazu hatten GFP-SFA D5 Zellen zu 96,9 % (n = 320) ein intaktes, also kreuzförmiges GFP-SFA Fasersystem (vgl. Abb. 6B).

Da der Anteil der Zellen mit zwei Basalkörpern im GFP-SFA/CentrinRNAi C11 Stamm über 50 % lag (vgl. Tab. 3), war es interessant zu analysieren, wie sich das GFP-SFA System in Zellen mit zwei Basalkörpern verhält. Von 136 ausgezählten Zellen, hatten 58,8 % vier GFP-SFA Fasern in kreuzförmiger Anordnung (Abb. 6C, a; 6D). Bei diesen

Zellen war oft eine der vier Fasern sehr lang gestreckt (Abb. 6C, b). 41,2 % der Zellen zeigten ein defektes GFP-SFA System (Abb. 6C, c-e; 6D). Die Zellen hatten entweder zwei bis drei Fasern (14 %; Abb. 6D), fünf (16,9 %; Abb. 6D; Abb. 6C, c) oder sechs bis mehr Fasern (5,9 %; Abb. 6D; Abb. 6C, d). Zu den Zellen mit zwei Basalkörpern wurden auch solche gezählt, die die beiden Basalkörper offensichtlich nicht in einem Basalapparat lokalisiert hatten, sondern deutlich voneinander entfernt waren. Solche Zellen besaßen oft zwei GFP-SFA Systeme (vgl. Abb. 6C, e).

Diese Daten zeigen, dass die Basalkörper wichtig für die korrekte Ausbildung des GFP-SFA Systems sind. Dies trifft vermutlich auch für die Ausbildung des Geißelwurzelsystems zu, da SFA entlang der mikrotubulären Geißelwurzeln lokalisiert ist (vgl. Einleitung). Das Vorhandensein von zwei Basalkörpern scheint allerdings nicht ausreichend für die korrekte Verteilung des GFP-SFA Systems zu sein, sondern auch die Centrinmenge scheint eine Rolle zu spielen.

3.1.5 Expression von GFP-SFA in der *vfl2* Centrin Mutante

Um den Einfluss von Centrin auf GFP-SFA weiter zu untersuchen, wurde das *GFP::SFA* Konstrukt in die Centrin Mutante *vfl2* (*vfl*= variable flagellar number) transformiert. Der *vfl2* Phänotyp wird durch eine Punktmutation im Centrin Gen verursacht (Taillon et al., 1992). *Vfl2* Zellen besitzen eine variable Anzahl an Geißeln (Kuchka und Jarvik, 1982) und zudem sind die Centrin-haltigen Fasern defekt (Taillon et al., 1992).

Der *vfl2* #18 *cw15+* Stamm wurde mit dem *GFP::SFA* Konstrukt und dem *ble* Gen als selektivem Marker co-transformiert. Von 40 mittels Fluoreszenzmikroskopie getesteten Klonen zeigten sechs GFP-SFA Fasern. Für weitere Analysen wurde der Stamm *vfl2/GFP-SFA* D12 ausgesucht. Die Transformation des *GFP::SFA* Konstruktes hat den Phänotyp der *vfl2* Zellen nicht beeinflusst. Die Geißelanzahlen waren denen des untransformierten *vfl2 C. reinhardtii* Stammes ähnlich (vgl. Tab. 4). Beide Stämme hatten zu ca. 40 % zweigeißlige Zellen, zu jeweils ca. 25 % keine und zu ca. 20 % eine Geißel. Dies entspricht auch in etwa den Literaturwerten des *vfl2* Stammes (0 Geißeln= 29 %, 1 Geißel = 21 %, 2 Geißeln = 38 %, 3 Geißeln = 9 %, 4 Geißeln = 3%; Kuchka und Jarvik, 1982).

Die Betrachtung der Zellen im Fluoreszenzmikroskop ergab ein ähnliches Bild wie bei GFP-SFA/CentrinRNAi Zellen (vgl. 3.1.4). Von insgesamt 164 ausgezählten Zellen hatten 57,3 % der Zellen ein defektes GFP-SFA System, d. h. eine abweichende Anzahl zu den vier Fasern (Abb. 7). Zellen ohne Basalkörper hatten zu 68,2 % GFP-SFA Fasern und zu 31,8 % (n = 110) keine Fasern (Abb. 7, a). Auch die Verteilung der GFP-SFA Fasern in Zellen mit einem, drei oder mehr Basalkörpern ergab ein ähnliches Bild wie bei den GFP-SFA/Centrin RNAi Zellen (Abb. 7, b-d). Zudem wiesen auch die *vfl2* Zellen einen hohen Anteil an Zellen mit zwei Basalkörper auf (62,1 %, n = 280). Von diesen Zellen hatten 54,8 % (n = 188) ein defektes GFP-SFA Fasersystem Beispiele solcher Zellen sind in Abbildung 7 (f-g) dargestellt. Abbildung 7 (e) zeigt ein Beispiel für eine Zelle mit zwei Basalkörpern und vier GFP-SFA Fasern.

Insgesamt betrachtet ist also das GFP-SFA System defekt, wenn auch das Centrinsystem defekt ist. Dies ist unabhängig davon, ob der Defekt auf dem Centrins-RNAi Effekt oder auf der Punktmutation im Centrins Gen in *vfl2* Zellen beruht.

Geißelanzahl [%]	0	1	2	3	≥4	n
<i>vfl2</i>	24,7	19,5	44,2	7,2	4,4	251
<i>vfl2</i> /GFP-SFA D12	28,2	20,9	42,4	6,2	2,3	177

Tab. 4: Geißelanzahl der *vfl2* Stämme

Die Zellen wurden mit Lugol'scher Lösung fixiert und die Anzahl der Geißeln im Phasenkontrast Mikroskop bestimmt. n = ausgewertete Zellen

Abb. 6: Der Effekt von Centrin-RNAi auf GFP-SFA Fasern

A: Indirekte Immunfluoreszenz an GFP-SFA/CentrinRNAi C11 Zellen

GFP-SFA D5 (**a**) und GFP-SFA/CentrinRNAi C11 (**b-e**) Zellen wurden mit Methanol permeabilisiert/fixiert und anschließend mit anti-Centrin und anti-GFP gefärbt.

a1-e1: anti-Centrin (BAS 6.8, 1:20) und anti-Maus IgG Cy3 (1:300)

a2-e2: zu a1-e1 korrespondierende anti-GFP (1:500) und anti-Kaninchen IgG FITC (1:300)
Färbung

a: Centrin ist in GFP-SFA D5 Zellen in den NBBCs, der distalen Verbindungsfibrille und den Basalkörpern lokalisiert (**a1**). Die GFP-SFA Fasern zeigen die typische kreuzförmige Anordnung (**a2**).

b-e: Centrin-RNAi führt zu Zellen ohne Basalkörper (**b1**) oder zu Zellen mit einer variablen Anzahl an Basalkörpern. Das Centrinfasersystem ist degeneriert. Der Antikörper anti-Centrin markiert nur noch die Basalkörper (**c1-e1**). Das GFP-SFA Fasersystem ist in den Centrin-RNAi Zellen defekt (**b2-e2**). Maßstab: 5 μ m.

B: Statistische Auswertung des GFP-SFA Fasersystems in Centrin-RNAi Zellen

GFP-SFA D5 Zellen (n = 320) und GFP-SFA D5/CentrinRNAi C11 (n = 220) Zellen wurden wie unter A beschrieben präpariert und in Bezug auf ihr GFP-SFA System analysiert. Es wurde zwischen Zellen unterschieden, deren GFP-SFA Fasersystem die typische kreuzförmige Anordnung zeigte (intaktes SFA Fasersystem, schwarz) und Zellen, die Abweichungen zur kreuzförmigen Anordnung aufwiesen (defektes SFA Fasersystem, grau).

C: Indirekte Immunfluoreszenz an GFP-SFA/CentrinRNAiC11 Zellen mit zwei Basalkörpern

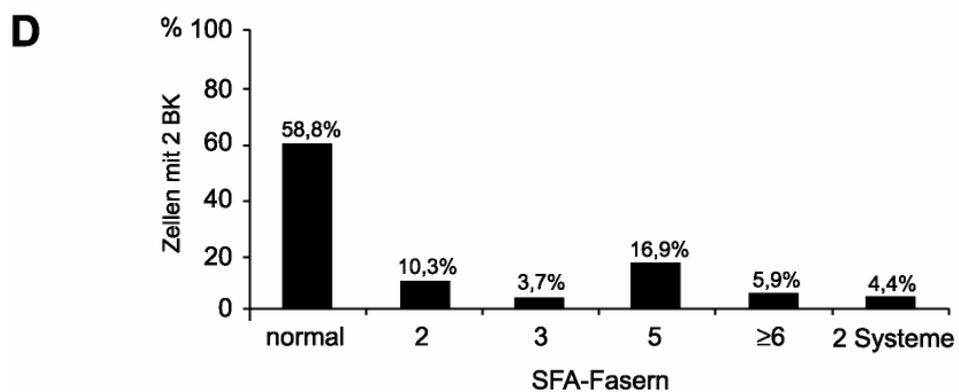
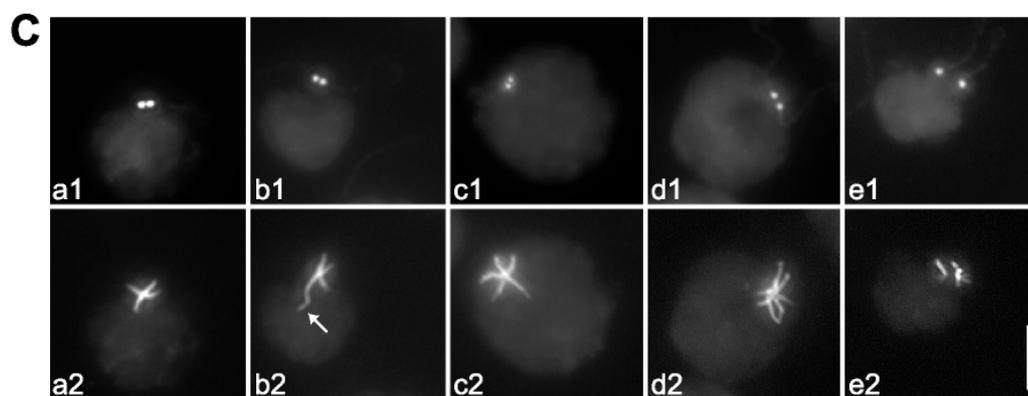
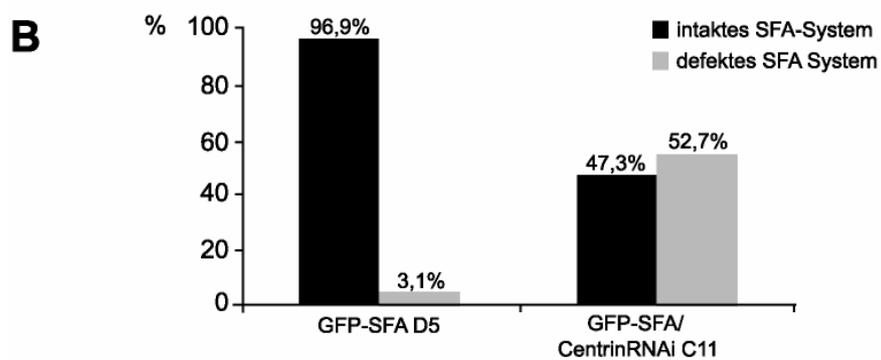
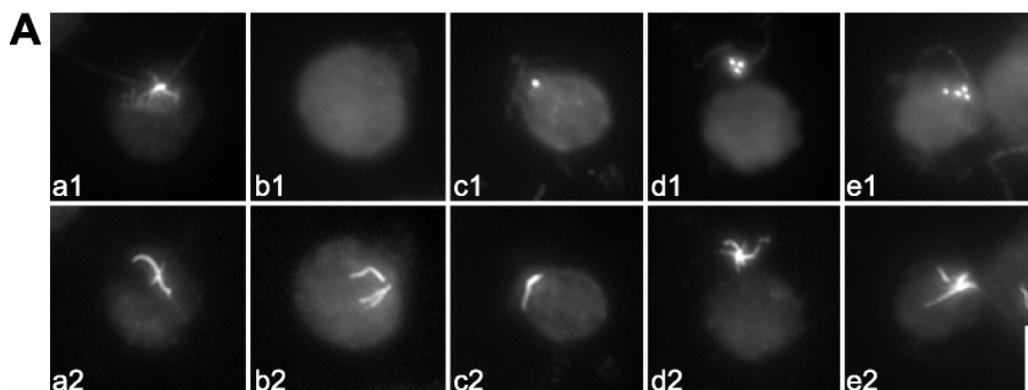
GFP-SFA/CentrinRNAi C11 Zellen wurden wie unter A beschrieben präpariert und gefärbt.

a1-e1: anti-Centrin; **a2-e2:** korrespondierende anti-GFP Immunfluoreszenz

Zellen mit zwei Basalkörpern hatten zu über 50 % vier GFP-SFA Fasern mit der typischen kreuzförmigen Anordnung (**a1, a2**), wobei eine Faser oft länger war als die anderen drei Fasern (**b2**, Pfeil). Der restliche Anteil der Zellen mit zwei Basalkörpern hatte ein defektes GFP-SFA Fasersystem (**c-e**). Maßstab 5 μ m.

D: Statistische Auswertung des GFP-SFA Fasersystems in Zellen mit zwei Basalkörpern

Die Anzahl der GFP-SFA Fasern von 136 Zellen mit zwei Basalkörpern wurde ausgewertet. normal = vier kreuzförmig angeordnete GFP-SFA Fasern; 2 Systeme (s. o. C, e).



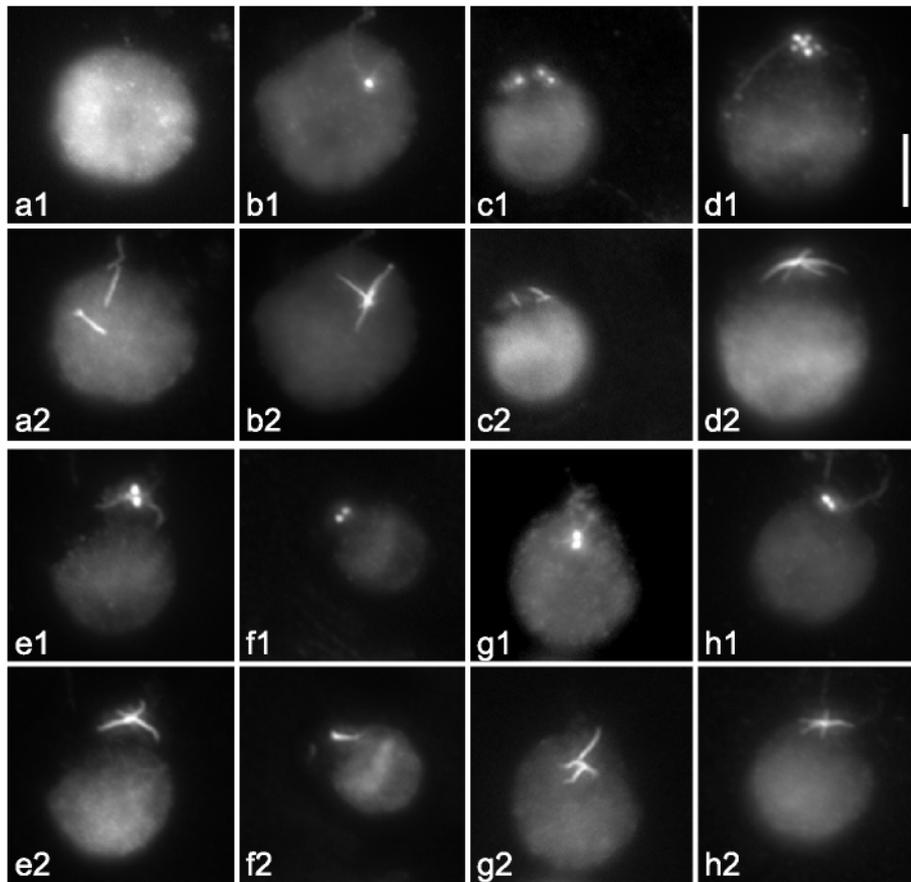


Abb. 7: Expression von GFP-SFA in der *vfl2* Mutante von *C. reinhardtii*

Vfl2/GFP-SFA D12 Zellen wurden mit Methanol permeabilisiert/fixiert und anschließend mit anti-Centrin und anti-GFP gefärbt.

a1-h1: anti-Centrin (BAS6.8; 1.20) und anti-Maus IgG Cy3 (1:300)

a2-h2: zu a1-h1 korrespondierende anti-GFP (1:500) und anti-Kaninchen IgG FITC (1:100) Färbung.

Centrin ist in *vfl2* Zellen nur noch in den Basalkörpern lokalisiert. Die Centrifasensysteme sind degeneriert (**a1-h1**). Zellen mit variabler Basalkörperanzahl (**a-d**) zeigen ein defektes GFP-SFA Fasensystem (**a2-d2**). Zellen mit zwei Basalkörpern (**e1-h1**) hatten zu über 50 % ein defektes GFP-SFA System (**e-h**).

Maßstab: 5µm

3.1.6 GFP-SFA als Marker in *uni* Mutanten von *C. reinhardtii*

Da die SMAFs mit den mikrotubulären Geißelwurzeln assoziiert sind (Lechtreck und Melkonian, 1991a), kann GFP-SFA als Marker für die Geißelwurzeln eingesetzt werden (Abb. 8, a-c). GFP-SFA verhält sich im Gegensatz zu SFA-GFP (Lechtreck et al., 2002) wie Wildtyp-SFA, wobei die GFP-SFA Fasern stets eine kreuzförmige Anordnung zeigen. Deshalb ist GFP-SFA ein geeigneter Marker für die Analyse von *C. reinhardtii* Mutanten, die Defekte im Aufbau des Geißelwurzelsystems aufweisen.

Es wurden neben *vfl2* (vgl. 3.1.5) zwei Mutanten mit Defekten im Basalapparat ausgewählt. *Uni3-1* (*uni* = *uni* flagellar) Zellen weisen eine Mutation im δ -*Tubulin* Gen auf. Den Basalkörpern fehlen die Triplettmikrotubuli und die Zellen haben eine variable Anzahl an Geißeln (50 % ohne Geißeln, 25 % eine Geißel und 25 % zwei Geißeln; Dutcher und Trabuco, 1998). Bei der zweiten Mutante, *uni1-2*, ist das betroffene Gen nicht bekannt. Die Zellen haben zu 95 % eine Geißel am älteren der beiden Basalkörper (Huang et al., 1982).

Beide Stämme wurden mit *GFP::SFA* und dem *ble* Gen als selektivem Marker co-transformiert und im Fluoreszenzmikroskop analysiert. In *uni3-1* Zellen hatten die Fasern in verschiedenen Zellen eines Stammes unterschiedliche Längen. Zudem zeigten einige Zellen eines Stammes eine Abweichung zur typischen kreuzförmigen Anordnung. Abbildung 8 (d-f) zeigt eine *uni3-1* Zelle mit solch einem defekten GFP-SFA System. In *uni1-2* Zellen waren die GFP-SFA Fasern stets kreuzförmig angeordnet, allerdings waren die Fasern sehr kurz und manchmal nur als punktförmige Struktur zu sehen (Abb. 8 g-i). Dies war wahrscheinlich auf die schwache Expression des Konstrukts zurückzuführen. Die Mutationen im *UNI1* Gen scheint also keinen Einfluss auf das GFP-SFA Fasersystem zu haben.

3.1.7 Analyse der GFP-SFA Fasern durch „Photobleaching“

GFP-SFA D5 Zellen wurden aufgrund ihrer langen und regelmäßigen Fasern genutzt, um erste Einblicke in die Dynamik der GFP-SFA Fasern zu gewinnen. Die Zellen wurden in Agarose immobilisiert, und mit einem konfokalen Laserscanning Mikroskop wurde eine Region von ca. 1 x 1 μ m aus den GFP-SFA Fasern einer Zelle gebleicht („bleaching“) (vgl. Abb. 9 b, Pfeil). Die GFP-Fluoreszenz war nach dem Bleichen in dem ausgewählten Bereich nicht mehr zu sehen (Abb. 9 c, Pfeil). Über einen Zeitraum

von 45 Minuten blieb die gebleichte Region in der GFP-SFA Faser an der gleichen Stelle und veränderte sich nicht (Abb. 9 d-f, Pfeil). Während der Beobachtungszeit bewegte sich die Zelle, was ein Zeichen dafür war, dass die Zelle durch die Bestrahlung nicht geschädigt wurde (Abb. 9 e, f). Diese Bewegung der Zelle führte auch dazu, dass der distale Teil der partiell gebleichten Faser nicht mehr genau in der Fokusebene lag. In zwei weiteren Versuchen konnten ebenfalls keine Veränderungen der gebleichten Regionen innerhalb von 30 Minuten beobachtet werden. Eine längere Beobachtungszeit war in diesen Fällen nicht möglich, da die Bestrahlung die Zellen schädigte. Insgesamt zeigten diese Versuche, dass GFP-SFA Fasern nicht oder nur wenig dynamisch sind.

Abb. 8: Indirekte Immunfluoreszenz an Cytoskeletten von GFP-SFA *uni* Mutanten

GFP-SFA D5 Zellen (**a-c**) wurden mit 0,25 % Nonidet P-40 lysiert und für die indirekte Immunfluoreszenz präpariert. GFP-SFA exprimierende *uni3-1* Zellen (**d-f**) und *uni1-2* Zellen (**g-i**) wurden mit Gameten Autolysin behandelt, um die Zellwände aufzulösen. Anschließend wurden sie simultan mit 0,2 % Triton X-100 lysiert und mit 3 % Formaldehyd fixiert. Die Färbung erfolgte mit anti-acetyliertem-Tubulin.

a, d, g: GFP-Fluoreszenz

b, e, h: zu a, d, g korrespondierende anti-acetylierte-Tubulin (1:300) und anti-Maus IgG Cy3 (1:300) Färbung

c, f, i: Kombination von GFP (grün) und anti-acTubulin (rot) Aufnahmen

Die GFP-SFA Fasern sind mit den vier kreuzförmig angeordneten mikrotubulären Geißelwurzeln (**b**, Pfeilspitzen) assoziiert. Manche *uni3-1* Zellen zeigten Abweichungen zum typischen GFP-SFA Fasensystem (**d**, Pfeil). In *uni1-2* Zellen waren die GFP-SFA Fasern sehr kurz, aber stets kreuzförmig angeordnet (**g**, Pfeil).

Maßstab: 5µm

Abb. 9: „Photobleaching“ von GFP-SFA Fasern

GFP-SFA D5 Zellen wurden in Agarose immobilisiert und im konfokalen Mikroskop mit einem 63er Objektiv betrachtet. Eine Zelle mit langen GFP-SFA Fasern wurde ausgesucht (**a**). Der Pfeil zeigt auf den fluoreszierenden Augenfleck von *C. reinhardtii*. Eine Region von ca. 1 x 1 µm (**b**, Pfeil, weiße Box) wurde aus der GFP-SFA Faser ausgebleicht (**c**, Pfeil). Die gebleichte Region wurde über einen Zeitraum von 45 min (**d, e, f**, Pfeile) beobachtet. Nach 30 und nach 45 min musste die Zelle neu fokussiert werden, da sie sich bewegt (**e**) und gedreht (**f**) hatte.

Maßstab: 5µm

Abb. 8

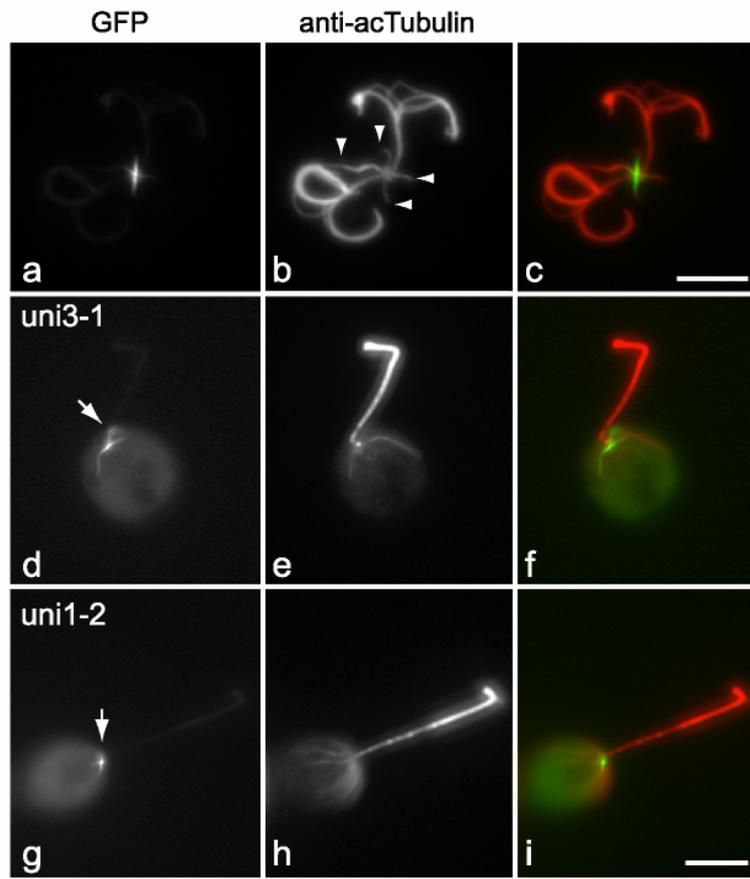
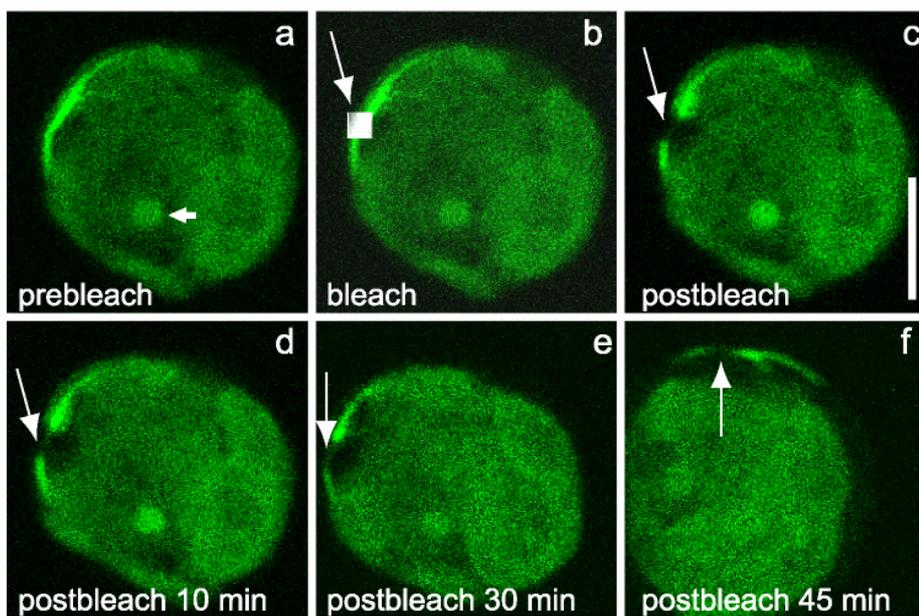


Abb. 9



3.2 Expression von Centrin-GFP in *C. reinhardtii*

Das Calcium-bindende Protein Centrin, mit einem Molekulargewicht von 20 kDa, ist ein weiterer Bestandteil des Basalapparates von *C. reinhardtii*. In *Chlamydomonas reinhardtii* ist Centrin in der Übergangsregion, die zwischen den Basalkörpern und den Axonemen liegt, in der distalen Verbindungsfibrille, die die Basalkörper miteinander verbindet und in den NBBCs („nucleus-basal body connectors“), die den Kern mit den Basalkörpern verbinden, lokalisiert. Die NBBCs setzen sich als netzförmige Struktur um den Kern herum fort (Salisbury, 1995).

Centrin wurde bereits erfolgreich von Ruiz-Binder et al. (2002) mit GFP markiert. Dabei prägten nur 25 - 50 % der Zellen eines Stammes Centrin-GFP aus. Nach den Erfahrungen mit der Expression von SFA-GFP (Lehtreck et al., 2002), welches zu 100 % in den Zellen exprimiert wurde, wurde Centrin-GFP in Anlehnung an SFA-GFP kloniert (vgl. 2.3.1.2). Das Centrin Gen (+20 bis zum letzten Basentriplett vor dem Stopp-Codon) wurde mit einem Linker von fünf Alaninen vor das *CrGFP* kloniert. Das *Centrin::GFP* Konstrukt steht unter der Kontrolle des starken konstitutiven *HSP70A/RBCS2* Promotors (Schroda et al., 2000) und wird von der *RBCS2* 3'UTR terminiert (Abb. 10A). Außerdem enthält der Vektor das *ARG7* Gen als selektiven Marker. Der Vektor wurde pCBCentrin-GFP genannt.

3.2.1 Analyse von Centrin-GFP exprimierenden *C. reinhardtii* Stämmen

Nach der Transformation des Vektors pCBCentrin-GFP in den *C. reinhardtii* Stamm CC-3395 wurden 32 der resultierenden Klone mittels Fluoreszenzmikroskopie getestet. 16 der getesteten Klone wiesen GFP-Signale unterschiedlicher Intensität und Verteilung auf. Acht dieser Stämme (Centrin-GFP 1 bis 8) wurden in einer Western-Blot Analyse mit Präparaten von „ganzen Zellen“ untersucht (Abb. 10B, oberer Teil). Im Vergleich zu nicht transformierten Zellen (Kontrolle) zeigten die transformierten Stämme nach Färbung mit dem Antikörper BAS6.8 (anti-Centrin) eine zusätzliche Bande bei ca. 46 kDa. Die verschiedenen Centrin-GFP Stämme enthielten unterschiedliche Mengen des Fusionsproteins, was durch die unterschiedliche Stärke der Banden im Western-Blot gezeigt wurde (Abb. 10B, oberer Teil). Von der Kontrolle und den untersuchten acht Stämmen wurde genomische DNA isoliert und eine Southern-Blot Analyse mit einer DIG-markierten *CrGFP*-Sonde durchgeführt. Dieser Southern-Blot zeigte, dass bis auf

Centrin-GFP 1, der zwei Insertionen des pCBCentrin-GFP Plasmides besaß, die untersuchten Stämme nur eine Kopie des transformierten Plasmides trugen (Abb. 10B, unterer Teil). Dies ist ein Hinweis darauf, dass die Stärke der Fusionsproteinexpression nicht von der Gendosis, d. h. von z. B. mehrfacher Insertion des Plasmides ins Genom, sondern von der Insertionsstelle abhängig ist.

Für weitere Analysen sind zwei Stämme mit unterschiedlicher Expressionsstärke ausgesucht worden: der schwächer exprimierende Stamm Centrin-GFP 3 (Abb. 10C, a-b) und der stark exprimierende Stamm Centrin-GFP 8 (Abb. 10C, c-d). Betrachtete man diese Stämme in der Fluoreszenz, wiesen die GFP-Signale deutliche Unterschiede auf. Centrin-GFP 3 zeigte in Methanol permeabilisierten Zellen ein punktförmiges Signal am Basalapparat und zwei Fasern, die in die Zelle ragten (Abb. 10C, a). Centrin GFP 8 zeigte ebenfalls eine punktförmige Struktur am Basalapparat und zusätzlich ein bis drei GFP Punkte in der Nähe des Zellkerns (Abb. 10C, c).

Zur näheren Analyse wurden von Kontroll- und Centrin-GFP Zellen Cytoskelette für die Immunfluoreszenz präpariert. Dazu wurden die Zellen mit 0,25 % Nonidet P-40 lysiert und anschließend mit 3 % Formaldehyd fixiert. Diese Präparate wurden mit dem Antikörper BAS6.8 (anti-Centrin) analysiert (vgl. Abb. 11A). Kontrollzellen zeigten die typische Verteilung von Centrin in den Basalkörpern, der distalen Verbindungsfibrille und den NBBCs (Abb. 11A, b). In Centrin-GFP 3 Zellen war das markierte Fusionsprotein als punktförmige Struktur in der distalen Verbindungsfibrille (Abb. 11A, c, Pfeilspitze), in den NBBCs und in den Fasern um den Kern herum (Fimbriae) lokalisiert. Vergleicht man die Centrin Antikörperfärbung (Abb. 11A, d) mit der Centrin-GFP Lokalisation (Abb. 11A, c), so ist erkennbar, dass Centrin-GFP in den Basalkörpern unterrepräsentiert war. Im Vergleich zu Kontrollzellen (Abb. 11A, b) waren die Fimbriae um den Kern leicht defekt. Sie bildeten kein geschlossenes Netzwerk mehr, sondern waren zum Teil fragmentiert (Abb. 11A, d, Pfeile).

Höhere Expressionslevel von Centrin-GFP (Centrin-GFP 8, Abb. 10A, e, f) führten zum Verlust der NBBCs. Centrin-GFP akkumulierte hierbei an der distalen Verbindungsfibrille (Abb. 11A, e, Pfeilspitze) und in Aggregaten auf der Kernoberfläche (Abb. 11A, e). Die Färbung der Cytoskelette mit anti-Centrin bestätigte die Abwesenheit der Centrin-haltigen NBBCs (Abb. 11A, f). Wildtyp-Centrin war nur noch an den Ansatz-

punkten der NBBCs am Kern (Abb. 11A, f Pfeile) sowie in der distalen Verbindungsfibrille und den Basalkörpern lokalisiert. Allerdings reagierte der anti-Centrin Antikörper sowohl mit Centrin-GFP als auch mit Wildtyp-Centrin, so dass hier nicht genau zwischen Wildtyp- und Fusionsprotein unterschieden werden konnte. Das Centrinfasersystem um den Zellkern war in Centrin-GFP 8 Zellen erheblich zerstört. Eine Bildung der Fimbriae war nicht mehr zu beobachten, sondern es traten nur noch schwache punktförmige Centrin-Aggregate auf (Abb. 11A, f).

Für die Western-Blot Analyse wurden Kontrollzellen und Zellen der Centrin-GFP Stämme 3 und 8 mit 1,5 % Triton X-100 behandelt und durch anschließende Zentrifugation in Pellet und Überstand fraktioniert. Mit dem Antikörper BAS6.8 (anti-Centrin) konnte neben der Wildtyp-Centrin Bande bei ca. 20 kDa (Abb. 11 B, Pfeil Centrin) in den Stämmen Centrin-GFP 3 und 8 eine zusätzliche Bande bei ca. 46 kDa (Abb. 11B, Pfeil Centrin-GFP) nachgewiesen werden. Wildtyp-Centrin war jeweils nur in der unlöslichen Fraktion (Pellet, P) der drei untersuchten Stämme zu beobachten. Zudem war die Wildtyp-Centrin Bande in Centrin-GFP 8 Zellen schwächer als in Kontroll- und Centrin-GFP 3 Zellen (Abb. 11B, Pfeil Centrin). Das Fusionsprotein war jeweils in der löslichen (Ü) und unlöslichen Fraktion (P) der Centrin-GFP Zellen vertreten. Bei den stark exprimierenden Centrin-GFP 8 Zellen war der Anteil an löslichem Centrin-GFP höher als bei den Centrin-GFP 3 Zellen (Abb. 11B, Pfeil Centrin-GFP). Bei Centrin-GFP 3 Zellen waren in einigen Fällen in unlöslicher und löslicher Fraktion zusätzliche Banden oberhalb von 46 kDa zu beobachten. Zudem traten in den transformierten Stämmen hin und wieder zusätzliche Banden unterhalb von ca. 28 kDa auf. Dies könnten Degradationsprodukte sein.

Zusammenfassend lässt sich also feststellen, dass sich das Centrin-GFP Fusionsprotein abweichend zum Wildtyp-Centrin verhält. Centrin-GFP ist in den Basalkörpern unterrepräsentiert. Abhängig von der Expressionsstärke zeigte sich ein negativer Effekt auf das Wildtyp-Centrinsystem. Eine starke Expression führte zum Verlust der NBBCs, und die Fimbriae um den Kern herum waren zerstört. Eine schwächere Expression führte zu einer schwachen Fragmentierung der Fimbriae. Im Vergleich zu Wildtyp-Centrin war ein Teil des Fusionsproteins löslich.

Abb. 10: Analyse von Centrin-GFP exprimierenden *C. reinhardtii* Zellen**A: Schematische Darstellung von pCBCentrin-GFP**

Das *Centrin::GFP* Konstrukt steht unter der Kontrolle des *HSP70A/RBCS2* Promotors und wird von der *RBCS2* 3'UTR terminiert. Es wurden 1769 Bp der kodierenden Region von Centrin einschließlich 40 Bp der Centrin 5'UTR vor das GFP kloniert. Fünf Alanine wurden zwischen Centrin und CrGFP als Linker eingeführt.

B: Western- und Southern-Blot Analyse von Centrin-GFP exprimierenden Stämmen

Von Kontrollzellen und acht Centrin-GFP exprimierenden Stämmen wurde ein Western-Blot mit Präparaten „ganzer Zellen“ durchgeführt (oberer Teil). Mit anti-Centrin (BAS 6.8, 1:50) wurde neben der Wildtyp-Centrin Bande (nicht gezeigt) eine zusätzliche Bande von ca. 46 kDa detektiert (Centrin-GFP). Diese Bande erschien unterschiedlich stark in den verschiedenen Stämmen. In Kontrollzellen wurde sie nicht detektiert.

Genomische DNA der verschiedenen Stämme wurde isoliert und mit *NheI* geschnitten. Der Southern-Blot wurde mit einer DIG-markierten DNA (CrGFP)-Sonde analysiert (unterer Teil). Centrin-GFP 1 trägt zwei Kopien des Centrin-GFP Konstruktes. Die anderen untersuchten Stämme jeweils nur eins. Im pCBCentrin-GFP Vektor existiert nur eine *NheI* Schnittstelle. Dadurch sind die nachgewiesenen Fragmente unterschiedliche groß.

C: Fluoreszenzen von Centrin-GFP exprimierenden Zellen

Zellen von Centrin-GFP 3 (**a-b**) und Centrin-GFP 8 (**c-d**) wurden mit Methanol fixiert und für die Fluoreszenz präpariert.

a, c: Centrin-GFP Fluoreszenz

b, d: zu a, c korrespondierende Phasenkontrastaufnahmen

Centrin-GFP 3 Zellen (**a**) zeigen ein punktförmiges GFP-Signal am Basalapparat und zwei Fasern, die vom Basalapparat aus in die Zelle ragen. Centrin-GFP 8 Zellen (**c**) zeigen eine punktförmige Struktur am Basalapparat und ein bis mehrere GFP-Aggregate in der Zelle.

Maßstab: 10µm

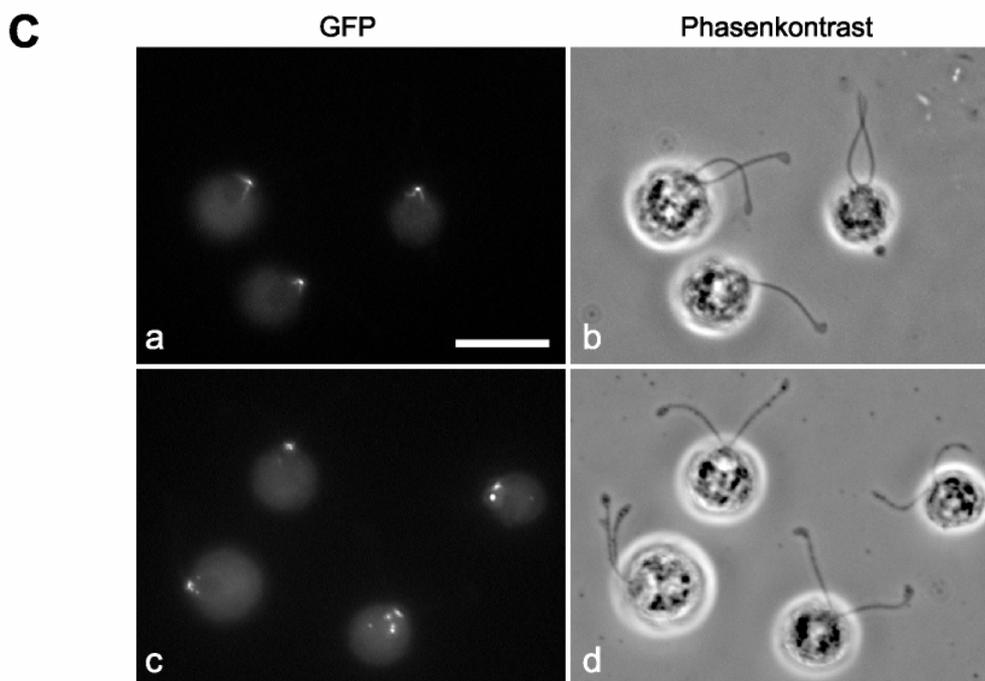
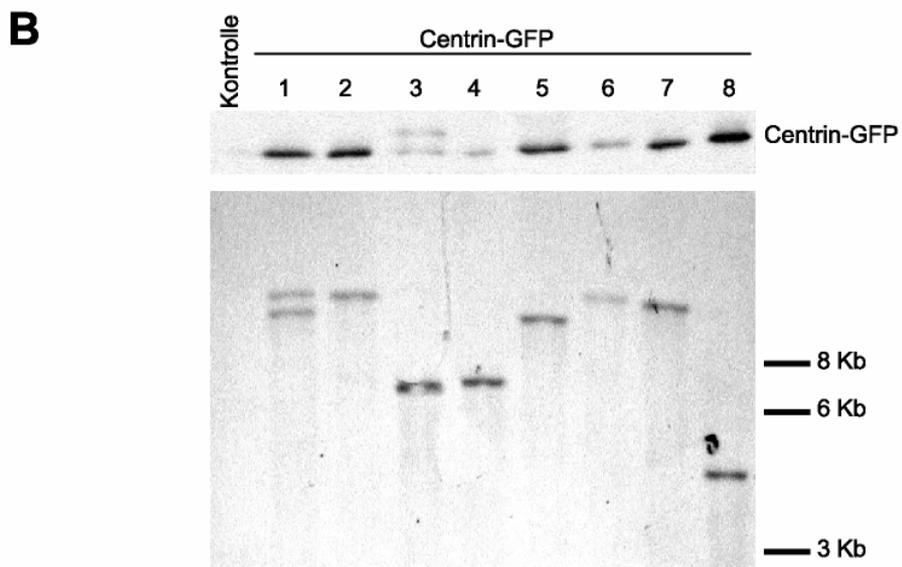
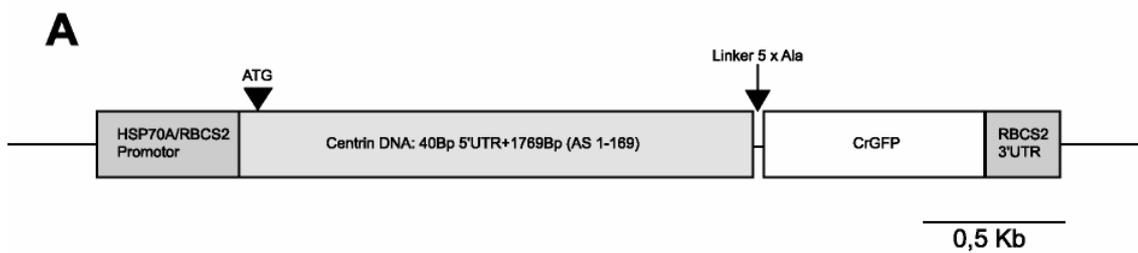


Abb. 11: Analyse von isolierten Cytoskeletten der Centrin-GFP Stämme

A: Indirekte Immunfluoreszenz an isolierten Cytoskeletten von Kontrollzellen und Centrin-GFP exprimierenden Zellen

Kontrollzellen (**a-b**), Centrin-GFP 3 (**c-d**) und Centrin-GFP 8 (**e-f**) Zellen wurden mit 0,25 % Nonidet P-40 lysiert und mit 3 % Formaldehyd fixiert. Diese Präparate wurden anschließend mit anti-Centrin gefärbt.

a: Phasenkontrastaufnahme vom Cytoskelett einer Kontrollzelle

b: zu a korrespondierende Immunfluoreszenz mit anti-Centrin (BAS 6.8; 1:20) und anti-Maus IgG Cy3 (1:300)

c, e: Centrin-GFP Fluoreszenz

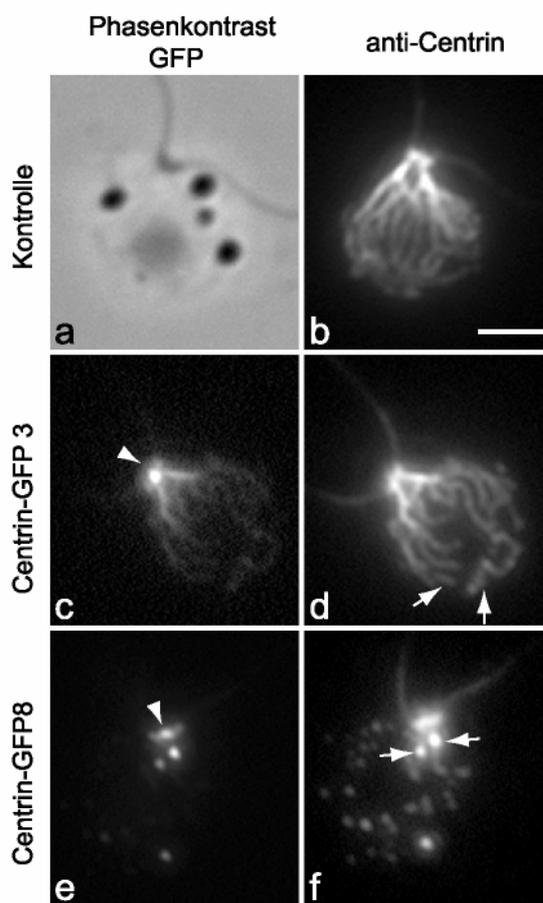
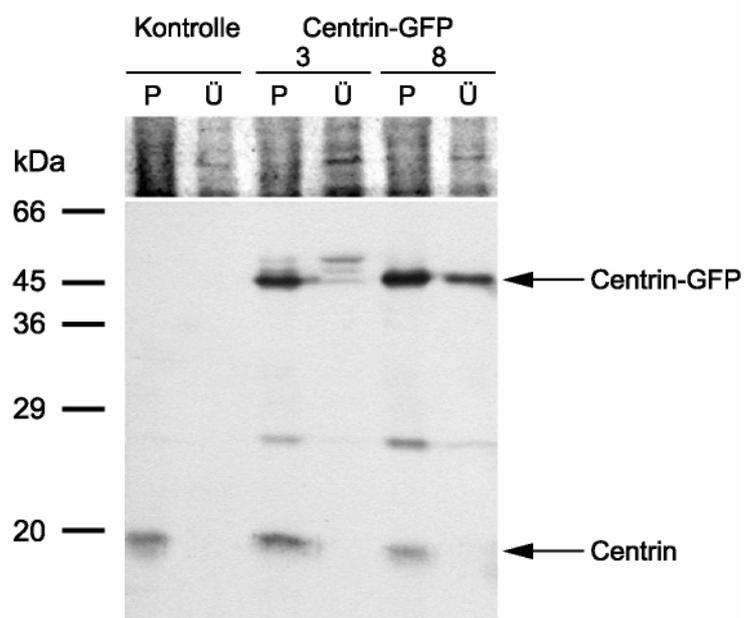
d, f: zu c, e korrespondierende anti-Centrin (BAS 6.8; 1:20) und anti-Maus IgG Cy3 (1:300) Färbung.

Kontrollzellen (**a, b**) zeigen die typische Lokalisation von Centrin in den Basalkörpern, der distalen Verbindungsfibrille (dVF) und den NBBCs (**b**). Centrin-GFP 3 Zellen zeigen ein GFP-Signal in der distalen Verbindungsfibrille (**c**, Pfeilspitze) und in den NBBCs. In den Basalkörpern und den Fimbriae ist Centrin-GFP (**c**) im Vergleich zur Centrin Antikörperfärbung (**d**) unterrepräsentiert. Die Fimbriae um den Zellkern sind zum Teil fragmentiert (**d**, Pfeile). Centrin-GFP 8 Zellen zeigen eine Centrin-GFP Fluoreszenz in der distalen Verbindungsfibrille (**e**, Pfeilspitze) und GFP-Aggregate am Zellkern (**e**). Die korrespondierende Centrin-Antikörperfärbung (**f**) zeigt, dass in Centrin-GFP 8 Zellen die Centrin-haltigen NBBCs defekt sind. Die Fimbriae sind stark fragmentiert (**f**). Centrin ist nur noch in den Basalkörpern, der dVF sowie an den Ansatzpunkten der NBBCs am Zellkern lokalisiert (**g**, Pfeile). Maßstab: 1 μ m

B: Western-Blot von Centrin-GFP exprimierenden Zellen

Cytoskelette (P) und Überstände (Ü) von Kontrollzellen (Kontrolle), Centrin-GFP 3 und 8 Zellen wurden durch SDS-PAGE (12,5 %) aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Es wurde ca. 20 μ g Protein pro Spur aufgetragen. Der obere Bereich des „Blots“ wurde abgetrennt und zur Ladungskontrolle mit Amidoschwarz gefärbt. An der linken Seite ist der Molekulargewichtsstandard markiert. Die Membran wurde mit anti-Centrin (BAS 6.8, 1:50) gefärbt.

Der Antikörper reagiert in den Pellets (P) aller drei getesteten Stämme mit der Wildtyp-Centrin Bande bei ca. 20 kDa (Pfeil Centrin). In den Centrin-GFP exprimierenden Stämmen Zellen reagiert anti-Centrin mit einer Bande bei ca. 46 kDa (Pfeil Centrin-GFP). Das Centrin-GFP Protein ist zum Teil löslich (Banden in den Überständen).

A**B**

3.2.2 Eine starke Expression von Centrin-GFP destabilisiert die Cytoskelette

Centrin ist in den NBBCs, die eine Verbindung zwischen dem Basalapparat und dem Zellkern herstellen, lokalisiert (s. o.; vgl. Einleitung). In Centrin-GFP 8 Zellen sind jedoch die Centrin-haltigen NBBCs nicht vorhanden (vgl. 3.2.1). Ist in solch stark exprimierenden Centrin-GFP Zellen die Stabilität zwischen Basalapparat und Kern beeinträchtigt? Um diese Frage zu beantworten, wurden Zellen von Kontrolle, Centrin-GFP 3 und Centrin-GFP 8 mit 1,5 % Triton X-100 lysiert. Anschließend wurden die Cytoskelette für die Immunfluoreszenz präpariert. Die Präparate wurden mit anti-Tubulin und DAPI gefärbt. Bei dieser Präparationsmethode bleiben in der Regel die Kerne mit dem Basalapparat verbunden. In drei unabhängigen Zählungen wurde die Destabilisierung der Cytoskelette ausgewertet und die Daten gemittelt. Es wurde zwischen intakten Cytoskeletten (Basalapparat am Kern) und defekten Cytoskeletten (einzelne Kerne) unterschieden. Die Cytoskelette des stark exprimierenden Centrin-GFP 8 Stammes waren zu 30,7 % ($\pm 4,5$ %, $n = 791$) destabilisiert (Abb. 12B). Abbildung 12A zeigt in einer Phasenkontrastaufnahme (a) einzelne Kerne (Pfeile) und einzelne Basalapparate (Pfeilspitze) in isolierten Cytoskelettpräparaten von Centrin-GFP 8 Zellen. Im Vergleich dazu sind die Antikörperfärbungen und GFP-Signale dargestellt (Abb. 12A, b). Das Fusionsprotein (grün) war oft als punktförmige Struktur am Kern (DAPI; blau) oder aber am Basalapparat (Tubulin, rot) lokalisiert (Abb. 12A, b, Pfeilspitze). Kontrollzellen wiesen zu 98,6 % ($\pm 1,8$ %, $n = 710$) intakte Cytoskelette auf. Der moderat exprimierende Centrin-GFP 3 Stamm hatte zu 98,1 % ($\pm 0,6$ %, $n = 518$) intakte Cytoskelette.

3.2.3 Die Centrin-GFP Überexpression hat keine Auswirkung auf den Phänotyp

In der *vfl2* Mutante von *C. reinhardtii* (vgl. 3.1.5) sind die NBBCs defekt. Diese fehlende Verbindung zwischen dem Zellkern und den Basalkörpern könnte ein Grund für die Fehlverteilung der Basalkörper während der Zellteilung sein (Wright et al., 1989). Es wurden Immunfluoreszenzanalysen von mitotischen Centrin-GFP 8 Zellen gemacht. Die Präparate wurden mit anti-Centrin, anti-Tubulin und der Zellkern mit DAPI gefärbt (Abb. 13). Im Vergleich zu Kontrollzellen (Abb. 13, a) waren die Basalkörper in den meisten mitotischen Zellen (23 von 25) nicht an den Spindelpolen lokalisiert (Abb. 13, b-c, kleine Pfeilspitzen). Allerdings konnte Centrin bzw. eine Centrin-GFP Markierung an den Spindelpolen nachgewiesen werden (Abb. 13, b-c, große Pfeilspitzen). Trotz der abweichenden Lokalisation der Basalkörper während der Mitose, war der Phänotyp von

Centrin-GFP 8 gegenüber Wildtypzellen nicht verändert. Der überwiegende Teil der Centrin-GFP 8 Zellen besaß zwei Geißeln und zwei Basalkörper. Dies ist ein Hinweis darauf, dass die NBBCs nicht essentiell für die korrekte Verteilung der Basalkörper auf die Tochterzellen sind.

Centrin soll am Geißelabwurf in *C. reinhardtii* beteiligt sein (Sanders und Salisbury, 1994). Ruiz-Binder et al. (2002) zeigten, dass Zellen, die eine Centrin-GFP Expression ähnlich der von Centrin-GFP 3 Zellen hatten (moderater Expressionslevel), sich bei Entgeißelungsversuchen wie Wildtypzellen verhielten. Es stellte sich nun die Frage, ob eine starke Expression von Centrin-GFP (Centrin-GFP 8) einen Einfluss auf die Centrinfunktion beim Geißelabwurf hat. Dazu wurden Entgeißelungsversuche mittels pH-Schock (King, 1995) am Kontrollstamm und den beiden untersuchten Centrin-GFP Stämmen vorgenommen. Dabei zeigte sich, dass sich die Zellen aller drei Stämme zu nahezu 100 % entgeißeln ließen (vgl. Tab. 5).

Die Centrin-GFP 8 Zellen besaßen also trotz der abnormalen Verteilung von Wildtyp-Centrin und Centrin-GFP keine Einschränkungen in den untersuchten Centrinfunktionen.

	vor Entgeißelung [%]			nach Entgeißelung [%]		
	2 Geißeln	0 Geißeln	n	2 Geißeln	0 Geißeln	n
Kontrolle	98,2	1,8	112	0,0	100,0	137
Centrin-GFP 3	98,2	1,8	110	1,6	98,4	129
Centrin-GFP 8	98,1	1,9	108	0,0	100,0	112

Tab. 5: pH-Schock Entgeißelung der Centrin-GFP Stämme

Vor und nach dem Entgeißeln wurden die Zellen mit Lugol'scher Lösung fixiert und die Anzahl der Geißeln im Phasenkontrastmikroskop bestimmt. n = ausgewertete Zellen

Abb. 12: Die Überexpression von Centrin-GFP destabilisiert die Cytoskelette

A: Indirekte Immunfluoreszenz an isolierten Cytoskeletten von Centrin-GFP 8 Zellen

Centrin-GFP 8 Zellen wurden mit 1,5 % Triton X-100 lysiert und Cytoskelette für die Immunfluoreszenz präpariert. Die Präparate wurden mit anti- α -Tubulin (1:800) und anti-Maus IgG Cy3 (1:300) gefärbt. Die DNA wurde mit DAPI gefärbt.

a: Phasenkontrastaufnahme von Centrin-GFP 8 Cytoskeletten. Pfeile zeigen auf einzelne Kerne. Die Pfeilspitze markiert einen einzelnen Basalapparat mit den beiden Geißeln.

b: zu a korrespondierende Immunfluoreszenz. GFP-Fluoreszenz (grün); anti-Tubulin (rot) Kerne (DAPI, blau).

Die GFP-Markierung ist an den einzelnen Kernen und an einzelnen Basalapparaten zu erkennen (Pfeilspitzen). Maßstab: 5 μ m

B: Statistische Auswertung der Stabilität der Verbindung zwischen Basalapparat und Kern

Die in A beschriebenen Immunfluoreszenzen wurde statistisch ausgewertet und mit denen von Kontrollzellen und Centrin-GFP 8 Zellen verglichen. Es wurde zwischen einzelnen Kernen (defekte Cytoskelette) und Basalapparat am Kern (intakten Cytoskeletten) unterschieden.

Abb. 13: Mitosen von Centrin-GFP 8 Zellen

Im Vergleich sind eine Mitose einer Kontrollzelle (**a**) und zwei Mitosen von Centrin-GFP 8 Zellen (**b-c**) dargestellt. Die extrahierten Zellen wurden mit anti- α -Tubulin (1:800) und anti-Centrin (BAS 6.8, 1:20) gefärbt. Die DNA wurde mit DAPI gefärbt.

Rot: Centrin/ Centrin-GFP; Grün: Tubulin/Centrin-GFP; Blau: DNA/Kern

a: Während der Mitose von Kontrollzellen sind die Basalkörper und Centrin (Pfeilspitzen) an den Spindelpolen lokalisiert.

b-c: In Centrin-GFP 8 Zellen waren die Basalkörper (kleine Pfeilspitzen) während der Mitose meistens nicht an den Spindelpolen lokalisiert. Centrin bzw. Centrin-GFP konnte an den Spindelpolen nachgewiesen werden (**b-c**, große Pfeilspitzen). Die Pfeile markieren die Centrin-GFP Aggregate.

Das Bild von der Mitose der Kontrollzelle wurde freundlicherweise von Frau B. Koblenz zur Verfügung gestellt.

Abb. 12

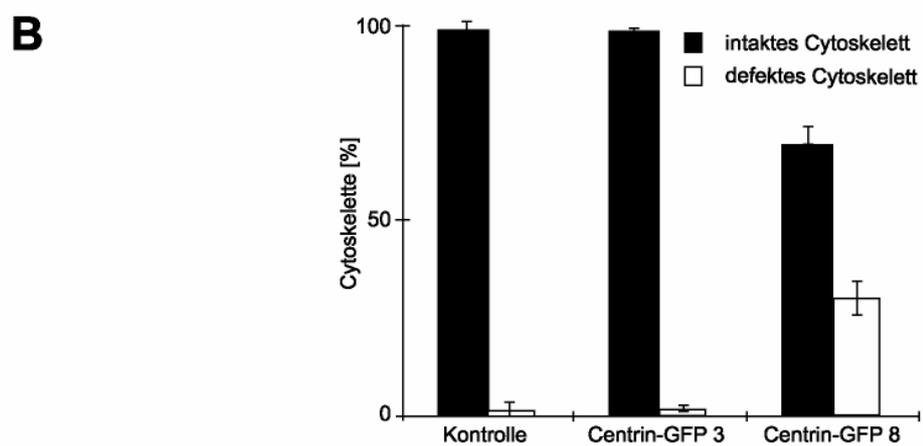
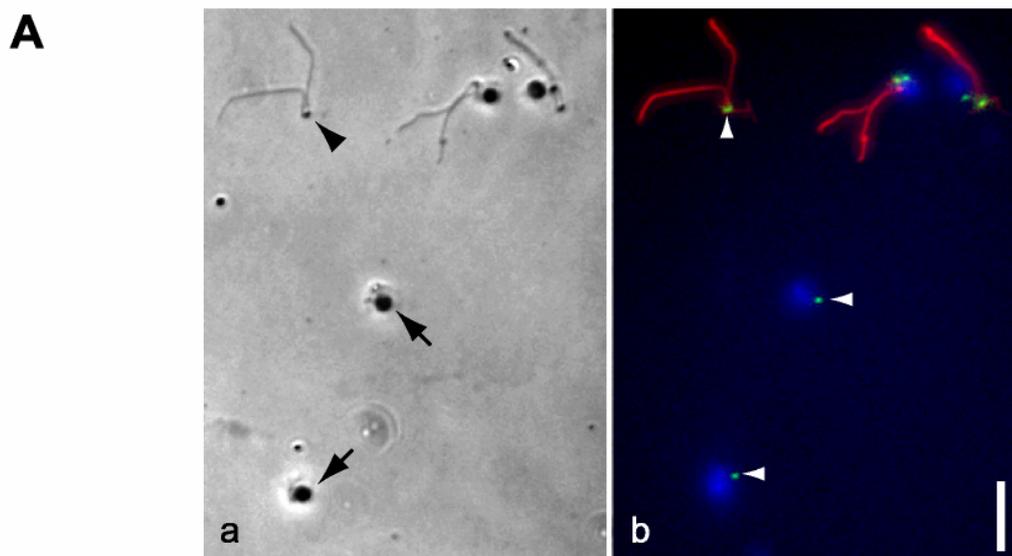
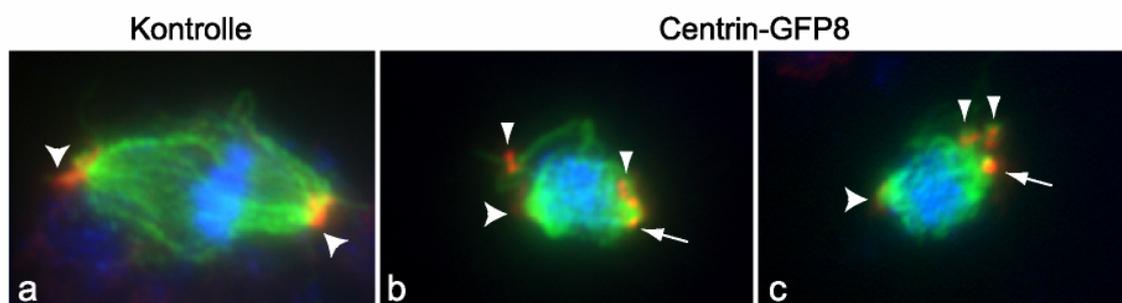


Abb. 13



3.2.4 Untersuchung der C-terminalen Domäne von Centrin

Centrin ist ein Phosphoprotein und besitzt am C-Terminus eine potentielle Phosphorylierungsstelle, das Serin 167 (Huang et al., 1988). In HeLa Zellen soll die Phosphorylierung von Centrin in der Prophase das Signal der Separation der Centrosomen sein. Phosphoryliertes Centrin ist an den Spindelpolen während der Pro- und Metaphase der Mitose lokalisiert (Lutz et al., 2001).

Um mehr über die Funktion der C-terminalen Domäne von Centrin zu erfahren, wurde die potentielle Phosphorylierungsstelle mittels der GFP-Technik näher untersucht. Dazu wurde zum einen das Serin 167 in ein Alanin (Centrin-GFP/S167A) umgewandelt und zum anderen in ein Glutamat (Centrin-GFP/S167E) (Abb. 14). Die Mutation des Serins zu Alanin verhindert, dass das Serin phosphoryliert werden kann, und die Mutation zu Glutamat imitiert eine konstitutive Phosphorylierung. Des Weiteren wurden die letzten fünf Aminosäuren (Centrin-GFP/ Δ 165-169) vom C- Terminus deletiert (Abb. 14). Die Klonierung dieser Konstrukte erfolgte wie zuvor für Centrin-GFP beschrieben (vgl. 3.2); die Mutationen bzw. die Deletion wurden mittels PCR eingeführt (vgl. 2.3.1.2). Mit allen drei Konstrukten konnten positiv exprimierende Stämme in der Fluoreszenz detektiert werden, die wiederum in Western-Blot Analysen neben der Wildtyp-Centrin Bande eine zusätzliche Bande zeigten. Die Fusionsproteine waren in der unlöslichen und löslichen Fraktion der mit Detergens behandelten und fraktionierten Zellen zu beobachten (nicht gezeigt).

Bei der Analyse der drei verschiedenen C-terminal veränderten Transformanten mittels Fluoreszenzmikroskopie waren wieder schwächere und stark exprimierende Stämme zu beobachten. Exemplarisch wurden je ein starker und ein schwächer exprimierender Stamm für Fluoreszenz- und Immunfluoreszenzanalysen ausgesucht. Bei den schwächer exprimierenden Zellen der Stämme Centrin-GFP/S167A A1, Centrin-GFP/S167E E3 und Centrin-GFP/ Δ 165-169 B12 (Abb. 15, b, c, d in angegebener Reihenfolge) war, wie bei Centrin-GFP 3 Zellen (Abb. 15, a), das Fusionsprotein in den NBBCs und in der distalen Verbindungsfibrille lokalisiert. Zudem waren die Fimbriae leicht fragmentiert (nicht gezeigt). Die stärker exprimierenden Zellen der Stämme Centrin-GFP/S167A B11, Centrin-GFP/S167E F2 und Centrin-GFP/ Δ 165-169 A2 (Abb. 15, f, g, h; j-l) zeigten, wie Centrin-GFP 8 (Abb. 15, e, i), eine GFP Lokalisation in der Region der Basalkörper und ein Fehlen von Centrin-haltigen NBBCs. Beim Stamm Centrin-GFP/ Δ 165-

169 A2 könnten die NBBCs aber auch nur stark verkürzt gewesen sein (vgl. Abb. 15, h). Die anti-Centrin Färbung isolierter Cytoskelette zeigte, dass die Fimbriae um den Kern bei Centrin-GFP 8, Centrin-GFP/S167A B11 und Centrin-GFP/S167E F2 Zellen zu punktförmigen Centrin-Aggregaten fragmentiert waren (Abb. 15, i-k). Im Gegensatz dazu zeigten die Fimbriae von Centrin-GFP/ Δ 165-169 A2 Zellen nur eine leichte Fragmentierung (Abb. 15, l).

	F	WB		
		WC	P	Ü
Centrin-GFP	+ (16/32)	+ (8/8)	+	+
Centrin-GFP/S167A	+ (4/24)	+	+	+
Centrin-GFP/S167E	+ (12/24)	+	+	+
Centrin-GFP/ Δ 165-169	+ (9/24)	+	+	+
Centrin-GFP/ Δ 39-169	- (0/32)	+(4/17)	-	+

Abb. 14: Schematische Darstellung der verschiedenen Centrin-GFP Konstrukte

Dargestellt ist das Konstrukt von unverändertem Centrin-GFP im Vergleich zu den verschiedenen veränderten Centrin-GFP Konstrukten. Das Serin 167 im C-Terminus wurde zum einen durch Alanin (Centrin-GFP/S167A) und zum andern durch Glutamat (Centrin-GFP/S167E) ausgetauscht. Zudem wurden die letzten fünf Aminosäuren von Centrin-GFP deletiert (Centrin-GFP/ Δ 165-169). Zur Analyse der Centrin-Kopfdomäne wurden die Aminosäuren 39-169 deletiert (Centrin-GFP/ Δ 39-169). Angegeben sind jeweils die Anzahl der getesteten und positiven Klone in der Fluoreszenz (F) und im Western-Blot (WB). Es wurden z. B. 32 Centrin-GFP exprimierende Klone in der Fluoreszenz getestet, von denen 16 positiv waren. WC = ganze Zellen; P = Pellet; Ü = Überstand; + = positiv; - = negativ.

Abb. 15: Analyse der C-terminalen Domäne von Centrin-GFP

a-h: Fluoreszenzen von Methanol-fixierten Centrin-GFP exprimierenden Zellen. Im Vergleich sind schwach exprimierende Centrin-GFP Stämme (**a-d**) und stark exprimierende Centrin-GFP Stämme (**e-h**) dargestellt.

i-l: Indirekte Immunfluoreszenz an isolierten Cytoskeletten von stark exprimierenden Centrin-GFP Zellen. (**i1-l1**) GFP-Fluoreszenz; (**i2-l2**) zu i1-l1 korrespondierende anti-Centrin (BAS 6.8, 1:20) und anti-Maus IgG Cy3 (1:300) Färbung; (**i3-l3**) Kombination von i1-l1 (GFP, grün) und i2-l2 (anti-Centrin, rot) und DAPI-Färbung (blau).

- unverändertes Centrin-GFP: (**a**) Centrin-GFP 3 und (**e, i**) Centrin-GFP 8

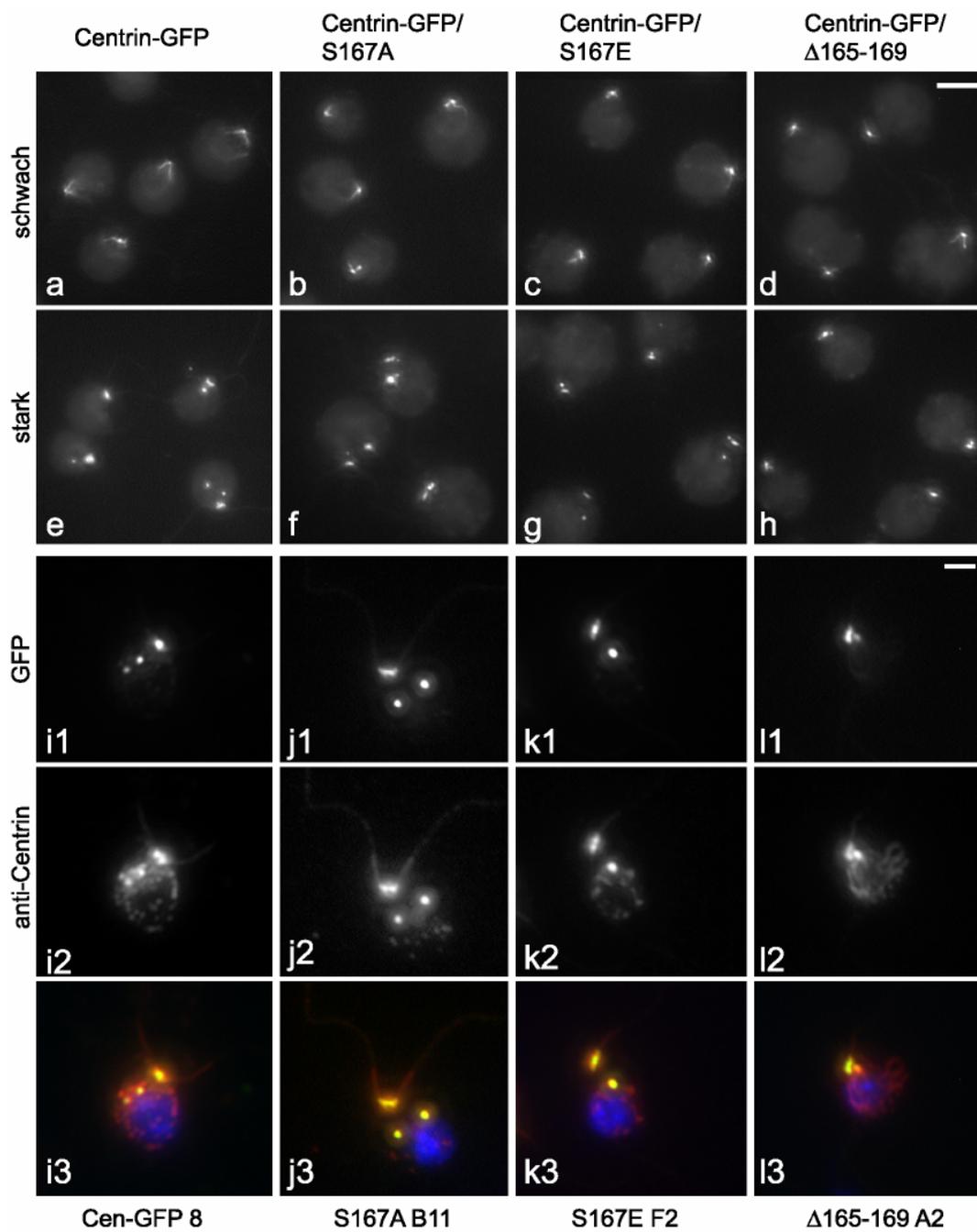
- Substitution von Serin 167 zu Alanin: (**b**) Centrin-GFP/S167A A1; (**f, j**) Centrin-GFP/S167A B11

- Substitution von Serin 167 zu Glutamat: (**c**) Centrin-GFP/S167E E3; (**g, k**) Centrin-GFP/S167E F2;

- Deletion der letzten fünf Aminosäuren vom C-Terminus: (**d**) Centrin-GFP/ Δ 165-169 B12; (**h, l**) Centrin-GFP/ Δ 165-169 A2.

Bei moderater Centrin-GFP Expression (**a-d**) war das Fusionsprotein in den NBBCs und der distalen Verbindungsfibrille lokalisiert. Es wurden keine wesentlichen Unterschiede in der Centrin-GFP Lokalisation beobachtet. Bei stark exprimierenden Zellen waren in der Fluoreszenz (**e-h**) und in der indirekten Immunfluoreszenz keine NBBCs zu sehen (**e-l**). Bei Centrin-GFP Zellen mit verkürzter C-terminaler Domäne (**h, l**) könnten die NBBCs aber auch nur stark verkürzt sein (**h**). In Centrin-GFP 8 (**e, i**), Centrin-GFP/S167A B11 (**f, j**) und Centrin-GFP/S167E F2 (**g, k**) waren vermehrt GFP-Aggregate am Kern lokalisiert und die Fimbriae stark defekt. In Centrin-GFP/ Δ 165-169 A2 Zellen, waren kaum Aggregate zu beobachten. Die Fimbriae waren nur leicht fragmentiert (**h, l**).

Maßstäbe: 5 μ m (in d, für a-h); 2 μ m (in l1, für i-k).



Bereits bei der Untersuchung der Centrin-GFP 8 Zellen wurden GFP-Aggregate an den Zellkernen beobachtet (vgl. 3.2.1). Zur statistischen Auswertung dieser GFP-Aggregate wurden Cytoskelette durch die Lyse der Zellen mit 1,5 % Triton X-100 isoliert und mit anti-Centrin und DAPI für die Immunfluoreszenz gefärbt. Diese Analyse zeigte, dass Centrin-GFP 8 und Centrin-GFP/S167E F2 durchschnittlich 1,1 GFP-Aggregate am Kern aufwiesen. Centrin-GFP/S167A B11 Zellen hatten dagegen durchschnittlich 1,9 GFP-Aggregate am Kern und Centrin-GFP/ Δ 165-169 A2 Zellen nur 0,3 GFP-Aggregate an abgetrennten Zellkernen (vgl. Tab. 6).

	GFP-Aggregate am Zellkern [%]						n	Ø
	0	1	2	3	4			
Centrin-GFP 8	23,3	53,0	18,8	4,9	0	287	1,1	
Centrin-GFP/S167A B11	1,6	31,3	46,9	15,3	4,9	367	1,9	
Centrin-GFP/S167E F2	5,6	78,4	15,9	0	0	320	1,1	
Centrin-GFP/ Δ 165-169 A2	77,7	18,1	3,8	0,4	0	265	0,3	

Tab. 6: GFP-Aggregate am Kern von stark exprimierenden Centrin-GFP Stämmen

Isolierte Cytoskelette der Centrin-GFP exprimierenden Stämme wurden für die Immunfluoreszenz präpariert und mit anti-Tubulin und DAPI gefärbt. Der Auswertung liegen drei unabhängige Zählungen zugrunde, die gemittelt wurden. Ausgewertet wurden nur Zellkerne, die vom Basalapparat getrennt vorlagen. n = ausgewertete Zellen; Ø = durchschnittliche Anzahl der GFP-Aggregate am Zellkern

Da bei den stark exprimierenden C-terminal veränderten Centrin-GFP Stämmen auch die NBBCs fehlten, wurde ebenfalls die Stabilität zwischen Basalkörper und Kern untersucht (vgl. 3.2.2). In drei unabhängigen Zählungen, die gemittelt wurden, hatten Centrin-GFP 8 Zellen zu 29,9 %, Centrin-GFP/S167A B11 zu 58,9 %, Centrin-GFP/S167E F2 Zellen zu 54,6 % und Centrin-GFP/ Δ 165-169-A2 zu 15,6 % vom Basalapparat abgelöste Kerne. In den schwächer exprimierenden Stämmen hatten die Zellen überwiegend eine intakte Verbindung zwischen Kern und Basalapparat (vgl. Tab. 7).

Die C-terminalen Veränderungen von Centrin-GFP zeigten bei moderater Expression im Vergleich zu nicht veränderten Centrin-GFP keine wesentlichen Unterschiede in der Lokalisation. Bei starker Expression führte die Deletion des C-Terminus zu weniger Centrin-GFP Aggregaten am Zellkern, besserem Erhalt der Fimbriae und erhöhter Stabilität der Cytoskelette während der Isolierung. Dies deutete darauf hin, dass die C-terminale Domäne die Lokalisation von Centrin beeinflussen könnte.

Expressi- on	Stämme	intakte Cytoskelette [%]	defekte Cytoskelette [%]	n
schwach	Centrin-GFP 3	98,8	1,2	520
	Centrin-GFP/S167A A1	97,7	2,3	530
	Centrin-GFP/S167E E3	88,8	11,2	584
	Centrin-GFP/ Δ 165-169 B12	94,2	5,8	510
stark	Centrin-GFP 8	70,1	29,9	489
	Centrin-GFP/S167A B11	41,1	58,9	624
	Centrin-GFP/S167E F2	45,4	54,6	437
	Centrin-GFP/ Δ 165-169 A2	84,4	15,6	630

Tab. 7: Stabilität der Cytoskelette in C-terminal veränderten Centrin-GFP Stämmen

Zellen wurden mit 1,5 % Triton X-100 behandelt und für die Immunfluoreszenz fixiert. Es wurden defekte Cytoskelette (einzelne Kerne) und intakte Cytoskelette (Basalapparat am Kern) ausgewertet. Es wurden drei unabhängige Zählungen durchgeführt, die gemittelt wurden. n = ausgewertete Zellen.

3.2.5 Untersuchung der Kopfdomäne von Centrin-GFP

Die N-terminale Domäne von Centrin soll eine Funktion bei Centrin-Centrin Interaktionen haben (Wiech et al., 1996). Zur näheren Untersuchung der Kopfdomäne (N-terminale Domäne) von Centrin wurde ein Konstrukt in *C. reinhardtii* transformiert, das nur die Kopfdomäne von Centrin C-terminal mit CrGFP markiert hatte. Dazu wurde eine Deletion der 39. bis 169. Aminosäure, also des kompletten C-Terminus sowie der EF-Hands, vorgenommen (Centrin-GFP/ Δ 39-169, Abb. 14). Nach der Transformation dieses Konstruktes in den *C. reinhardtii* Stamm CC-3395 wurden 32 Klone im Fluoreszenzmikroskop analysiert. Davon zeigte keiner der Klone ein GFP-Signal. Mit 17 dieser Stämme wurde ein Western-Blot mit Präparaten „ganzer Zellen“ durchgeführt. Dieser Blot wurde mit anti-GFP Antikörper gefärbt. In vier der 17 getesteten Stämme war eine Bande in Höhe von ca. 32 kDa zu sehen, die auch der erwarteten Höhe entsprach. In Western-Blot Analysen mit fraktionierten Zellen (Pellet/Überstand) war das Fusionsprotein aus der Centrin Kopfdomäne und dem GFP zu 100 % löslich. In Abbildung 16 ist ein Western-Blot dargestellt, der Kontrollzellen, Centrin-GFP/ Δ 39-169 11 und einen negativen Centrin-GFP/ Δ 39-169 Stamm vergleicht. Der Pfeil markiert die Bande von ca. 32 kDa. Die Kopfdomäne von Centrin ist somit unzureichend, um an die Basalapparatstrukturen zu binden.

3.2.6 Centrin-GFP Expression in der *vfl2* und der *uni1-2* Mutante

Centrin-GFP wurde als Marker für die Analyse von *C. reinhardtii* Motilitätsmutanten eingesetzt. Bei moderater Expression wurde Centrin-GFP in das Centrin cytoskelett integriert. Ist dieses Konstrukt aber auch geeignet die Punktmutation im Centrin Gen der *vfl2* Mutante zu komplementieren? Dazu wurde der *HSP70A/RBCS2* Promotor vor das *Centrin::GFP* Konstrukt in den Vektor pCrCentrin-GFP (vgl. 2.3.1.2) ligiert und das Plasmid mit dem *ble* Gen in *vfl2* Zellen co-transformiert. Es wurden 40 Klone analysiert, davon zeigten vier GFP-Signale. Allerdings zeigten die Stämme weiterhin den *vfl2* Phänotyp. Eine GFP-Markierung war nur an den Basalkörpern zu sehen (Abb. 17, a). Centrin-GFP ist demnach nicht geeignet, die *vfl2* Mutation zu komplementieren.

Des Weiteren wurden *uni1-2* Zellen (vgl. 3.1.6) erfolgreich mit dem *Centrin::GFP* Konstrukt transformiert. Die positiven Transformanten wiesen wieder Unterschiede in der Lokalisation und der Ausprägungsstärke des Fusionsproteins auf. Betrachtete man aber Zellen mit einer schwächeren Expression von Centrin-GFP, also solche, die auch

eine Lokalisation in den NBBCs zeigten, scheint die *uni1* Mutation keinen Einfluss auf das Centrinsystem zu haben (Abb. 17, b).

3.2.7 In vivo Beobachtung von Centrin-GFP 3 Zellen

Centrin-GFP 3 Zellen wurden für die in vivo Analyse in Agarose immobilisiert. Die beobachtete Zelle lag durch die Einbettung in Agarose ruhig, die Geißeln jedoch waren noch beweglich. Abbildung 18 zeigt eine Bildsequenz dieser Beobachtung. Der Abstand zwischen den einzelnen Aufnahmen betrug 1,5 Sekunden. Die Ausschnitte zeigen den apikalen Teil der Zelle mit der distalen Verbindungsfibrille (dVF), die die beiden Basalkörper miteinander verbindet und den NBBCs, die die Verbindung zwischen Basalkörper und Zellkern sind. Vergleicht man die Position der dVF in Bezug zu den NBBCs, veränderte die dVF ihre Lage (Abb. 18, z. B. Sequenz 7-10). Zudem wurde eine Biegung der NBBCs beobachtet (Abb. 18, z. B. Sequenzen 10 und 12). Diese Bewegungen von dVF und NBBCs wurden durch die restliche Geißelbewegung verursacht und sind ein Hinweis darauf, dass die Verbindung zwischen den Basalkörpern und den NBBCs sowie die NBBCs selbst flexibel sind (vgl. Diskussion).

3.2.8 Centrin-GFP unter der Kontrolle des *NITI* Promotors

Um Aufschlüsse über die Art des Einbaus von Centrin-GFP in die Centrin-haltigen Strukturen des Basalapparates von *C. reinhardtii* zu bekommen, wurde das *Centrin::GFP* Konstrukt unter die Kontrolle des *NITI* Promotors gebracht (Abb. 19A). Der *NITI* Promotor ist in Anwesenheit von Ammonium inaktiv und in Abwesenheit von Ammonium aktiv (Abb. 19A). Das *NITI* Gen codiert für die Nitratdeduktase (Fernandez et al., 1989; Zhang und Lefebvre, 1997).

Nach der Co-Transformation des *NITI::Centrin::GFP* Konstruktes mit dem *ARG7* Gen als selektivem Marker in *C. reinhardtii* CC-3395 Zellen, wurden die Transformanten direkt in Ammonium-freies Medium aufgenommen. Von diesen Transformanten zeigten fünf (von 60 getesteten) eine Centrin-GFP Fluoreszenz. Die Expressionsstärke der verschiedenen positiven Stämme variierte, jedoch lag die Menge an Centrin-GFP unter der mit dem *HSP70A/RBCS2* Promotor erreichten. Der Stamm Nit-Centrin-GFP 5.8 wurde für weitere Analysen ausgesucht.

Die Zellen des Stammes Nit-Centrin-GFP 5.8 wurden in Ammonium-haltigem und Ammonium-freiem Medium kultiviert. Zudem wurden die Zellen aus dem Ammonium-

haltigen Medium in Ammonium-freies Medium überführt und über einen Zeitraum von 24 Stunden Proben entnommen. In Western-Blot Analysen mit isolierten Cytoskeletten von Zellen, die in Ammonium-freiem Medium kultiviert wurden, konnte mit anti-Centrin eine starke Bande bei ca. 46 kDa nachgewiesen werden (Abb. 19B, Pfeil Centrin-GFP). In isolierten Cytoskeletten von Zellen, in denen der *NITI* Promotor inaktiv war, sah man nur eine sehr schwache Bande des Fusionsproteins. Das heißt, dass die Expression des *Centrin::GFP* Konstruktes unter dem *NITI* Promotor bei nicht-induzierenden Bedingungen nicht vollständig unterdrückt wird. Die Induktion des *Centrin::GFP* Konstruktes erfolgte durch das Überführen der Zellen in Ammonium-freies Medium. Nach der Induktion wurden nach 3½, 6 und 24 Stunden Proben genommen. Bis 24 Stunden nach der Induktion war ein Anstieg in der Konzentration des Fusionsproteins zu beobachten (Abb. 19B).

Für Immunfluoreszenzexperimente wurden Cytoskelette von Nit-Centrin-GFP 5.8 Zellen isoliert und anschließend mit den Antikörpern anti-GFP und anti-Centrin gefärbt. Vor der Induktion der Expression zeigten 6 % (n = 135) der Zellen ein Centrin-GFP Signal (Abb. 19C, a, c; Tab. 8). 24 Stunden nachdem die Zellen in das Ammonium-freie Medium überführt wurden, stieg die Zahl der Zellen, die Centrin-GFP exprimierten, auf 66 % (n = 125) an (Abb. 19C, b, d; vgl. Tab. 8). Zwei Stunden nach der Induktion des *NITI::Centrin::GFP* Konstruktes zeigten 33 % (n = 63; vgl. Tab. 8) der Zellen eine Centrin-GFP Expression, wie durch die anti-GFP Antikörperfärbung nachgewiesen wurde. Vergleicht man dazu Cytoskelette, die nicht mit anti-GFP gefärbt wurden, zeigten zwei Stunden nach der Induktion nur 2,5 % (n = 166) der Zellen eine Centrin-GFP Expression (vgl. Tab. 8). Dies war ein Hinweis darauf, dass die Faltung des GFPs eine gewisse Zeit benötigte. Erst nach 7½ Stunden zeigten 43 % der Zellen eine Centrin-GFP Fluoreszenz, wenn sie nicht mit anti-GFP nachgefärbt wurden (vgl. Tab. 8).

Die Lokalisation des Fusionsproteins im Nit-Centrin-GFP 5.8 Stamm zeigte keine Unterschiede zu Zellen, die das Konstrukt unter der Kontrolle des *HSP70A/RBCS2* Promotors moderat exprimierten: Centrin-GFP war in den NBBCs und den Fimbriae vertreten. Eine starke GFP-Markierung zeigte zudem die distale Verbindungsfibrille (Abb. 19C). Abbildung 19C (e, k) zeigt ein Beispiel für eine Zelle, die Centrin-GFP exprimiert, obwohl der *NITI* Promotor inaktiv ist. Zwei Stunden nach der Induktion der Expression war Centrin-GFP überwiegend in den proximalen Teilen der NBBCs lokalisiert; die

distale Verbindungsfibrille zeigte dagegen nur eine schwache GFP-Markierung. (Abb. 19C, l-n). Nach sieben Stunden waren auch kleinere Centrin-GFP Aggregate in den distalen Bereichen der NBBCs zu beobachten. In der distalen Verbindungsfibrille ist sieben Stunden nach der Induktion der Expression immer noch wenig Centrin-GFP nachzuweisen (Abb. 19C, o). 24 Stunden nach der Aktivierung der Centrin-GFP Expression wies der größte Teil der Zellen wieder eine starke Markierung der distale Verbindungsfibrille auf (Abb. 19C, p). Diese Analysen zeigten, dass das Fusionsprotein wahrscheinlich vom proximalen Teil aus in die NBBCs eingebaut wird. In die distale Verbindungsfibrille scheint Centrin-GFP erst später eingebaut zu werden (vgl. Diskussion).

	GFP		anti-GFP	
	%	n	%	n
vor Induktion (t0)	3	188	6	135
2 h nach Induktion (t2)	2,5	166	33	63
5 h nach Induktion (t5)	5,6	104	-	-
7,5 h nach Induktion (t7)	43	63	-	-
24 h nach Induktion (t24)	-	-	66	125

Tab. 8: Vergleich von Centrin-GFP und anti-GFP Signal in Nit-Centrin-GFP 5.8

Cytoskelette von Nit-Centrin-GFP 5.8 Zellen wurden für die Immunfluoreszenz präpariert und entweder nicht (GFP) oder mit anti-GFP gefärbt. n = ausgewertete Zellen.

Abb. 16: Western-Blot Analyse von Centrin-GFP/ Δ 39-169 exprimierenden Zellen

Isolierte Cytoskelette (Pellet) und Überstände von Kontrollzellen (K), Centrin-GFP/ Δ 39-169 11 und Centrin-GFP/ Δ 39-169 13 wurden durch SDS-PAGE (10 %) aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Es wurde ca. 20 μ g Protein pro Spur aufgetragen. An der linken Seite ist der Molekulargewichtstandard markiert. Die Membran wurde mit dem Antikörper anti-GFP (1:4000) gefärbt.

Der Pfeil markiert die Bande von ca. 32 kDa im Überstand vom positiven Centrin-GFP/ Δ 39-169 11 Stamm. In Kontrolle und Centrin-GFP/ Δ 39-169 13 (Negativkontrolle) reagierte eine solche Bande nicht mit anti-GFP Antikörper.

Abb. 17: Indirekte Immunfluoreszenz von Centrin-GFP *vfl2* und *uni1-2* Zellen

a, a': Methanol-permabilisierte/fixierte Centrin-GFP exprimierende *vfl2* Zelle

b, b': Autolysin-behandelte und Detergens-extrahierte Centrin-GFP exprimierende *uni1-2* Zelle

a, b: GFP-Fluoreszenz

a': zu a korrespondierende Immunfluoreszenz mit anti-Centrin (BAS6.8; 1:20) und anti-Maus Cy3 IgG (1:300)

b': zu b korrespondierende Immunfluoreszenz mit anti-acetyliertem Tubulin (1:300) und anti-Kaninchen IgG Cy3 (1:300)

Maßstab: 5 μ m

Abb. 18: In vivo Beobachtung von Centrin-GFP 3 Zellen

Centrin-GFP 3 Zellen wurden in Agarose immobilisiert. Dargestellt sind einzelne Bildsequenzen der in vivo Beobachtung einer einzelnen Zelle. Der zeitliche Abstand zwischen den einzelnen Aufnahmen beträgt 1,5 sek.

Die Ausschnitte zeigen den apikalen Teil der Zelle mit Centrin-GFP markierter dVF und NBBCs. Der Strich markiert stets die gleiche Stelle.

Verursacht durch die restliche Geißelbewegung, veränderte die dVF in Bezug zu den NBBCs ihre Lage (z. B. 12). Die NBBCs beugten sich (z. B. 8, 10).

Abb. 16

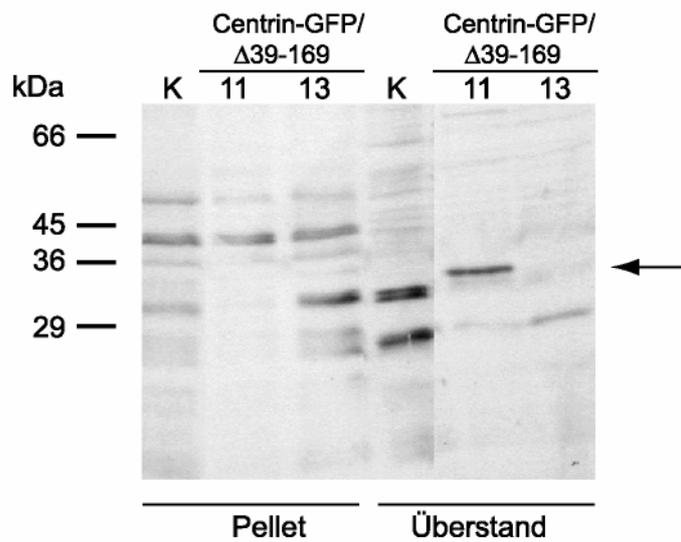


Abb. 17

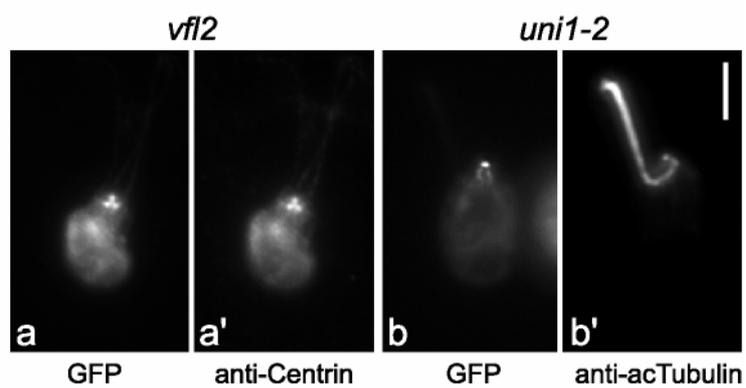


Abb. 18

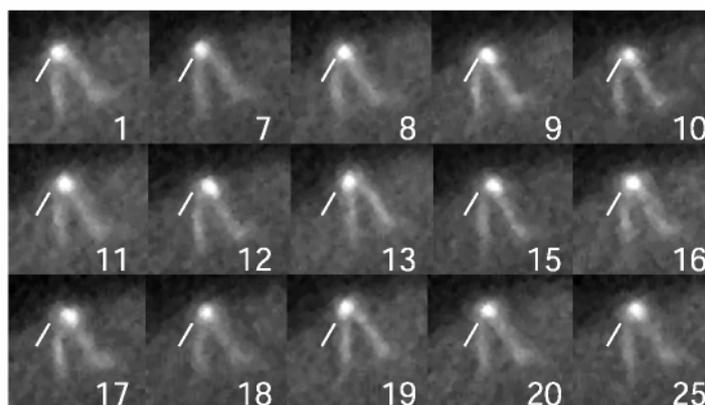


Abb. 19: Induktion von Centrin-GFP mit dem *NIT1* Promotor

A: Schematische Darstellung von NIT1/pCrCentrin-GFP und der Induktionsbedingungen des *NIT1* Promotors

Der *NIT1* Promotor ist aktiv in Ammonium-freien Medium. In Anwesenheit von Ammonium wird das Centrin-GFP nicht transkribiert.

B: Western-Blot Analyse mit isolierten Cytoskeletten von Nit-Centrin-GFP 5.8

Isolierte Cytoskelette von Nit-Centrin-GFP 5.8 Zellen kultiviert in Medium ohne Ammonium ($-\text{NH}_4^+$), Medium mit Ammonium ($+\text{NH}_4^+$) und 3 ½, 6 und 24 Stunden nach dem Überführen aus Ammonium-haltigem in Ammonium-freies Medium, wurden durch SDS-PAGE (12,5 %) aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Anschließend wurde mit anti-Centrin (BAS 6.8, 1:40) gefärbt. Es wurden jeweils ungefähr gleiche Mengen Protein pro Spur geladen. An der linken Seite ist der Molekulargewichtstandard markiert.

Pfeil Centrin: Wildtyp-Centrin Bande bei ca. 20 kDa; Pfeil Centrin-GFP: Bande des Fusionsproteins bei ca. 46 kDa.

Die Expression von Centrin-GFP ist in Zellen, in denen der *NIT1* Promotor inaktiv ist ($+\text{NH}_4^+$), nicht komplett unterdrückt. Es ist eine schwache Bande zu sehen. Nach der Induktion der Centrin-GFP Expression nimmt die Menge von Centrin-GFP innerhalb von 24 Stunden stetig zu.

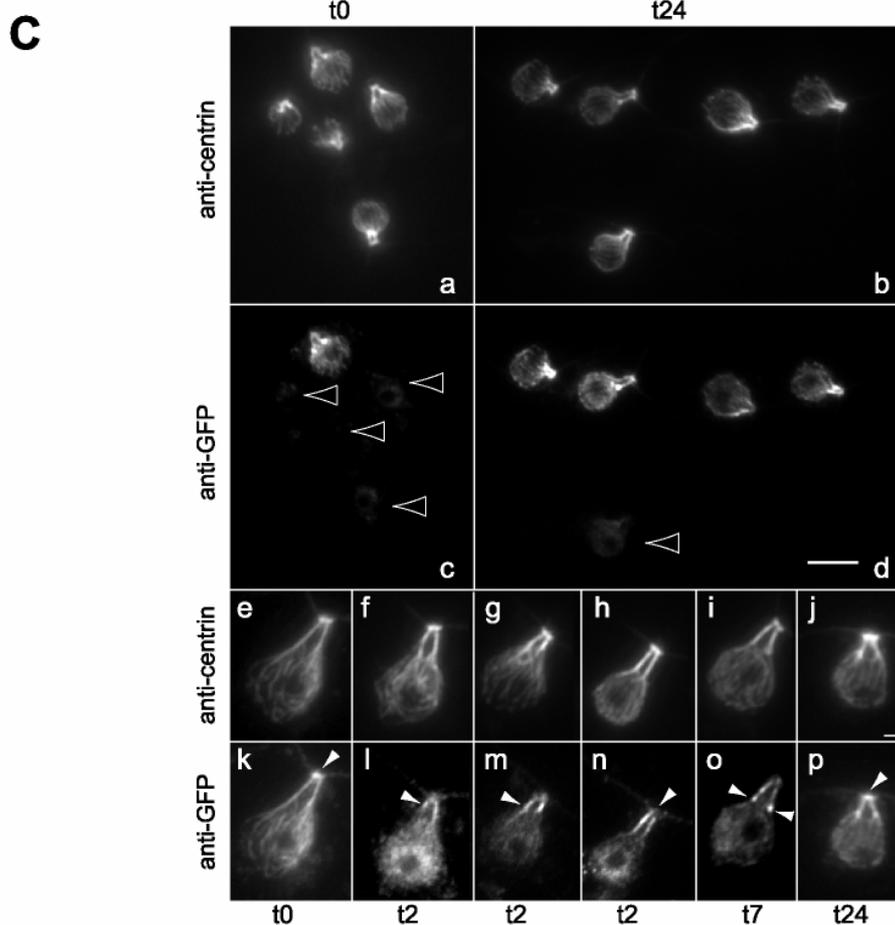
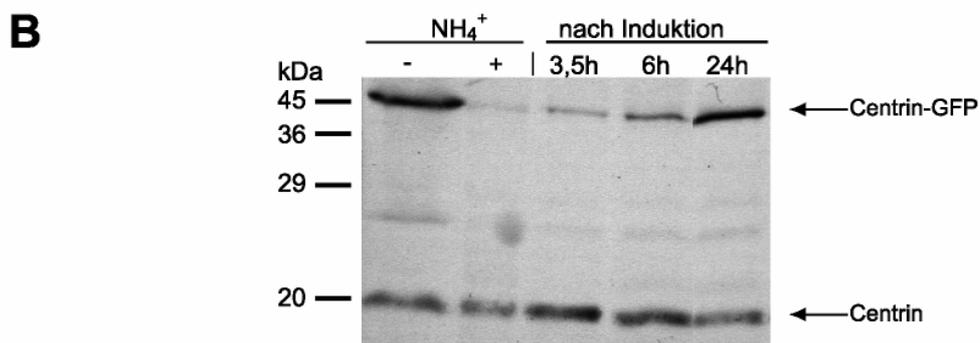
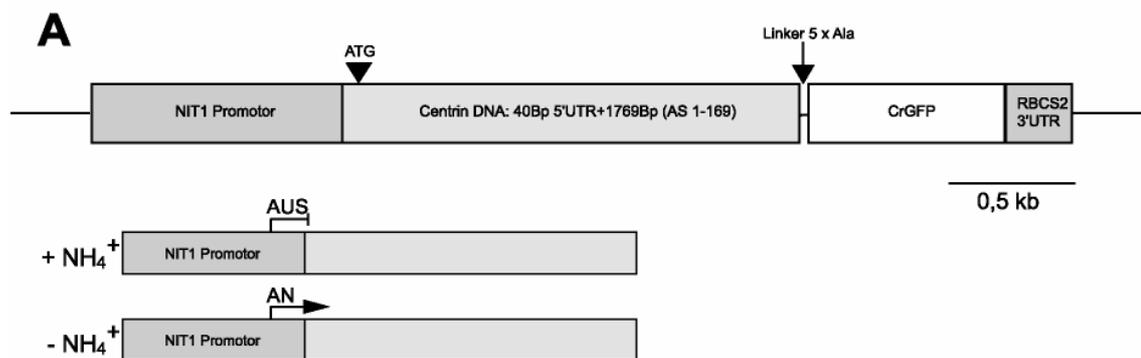
C: Indirekte Immunfluoreszenz an isolierten Cytoskeletten

Nit-Centrin-GFP 5.8 Zellen wurden simultan mit 0,2 % Triton X-100 lysiert und mit 3 % Formaldehyd präpariert.

a-b, e-j: anti-Centrin Färbung (1:20)

c-d, k-p: korrespondierende anti-GFP Färbung (1:500)

Dargestellt sind Zellen vor Induktion der Centrin-GFP Expression (t_0 ; **a, c, e, k**) und zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Induktion (t_{24} : **b, d, j, p**; t_2 : **g-h, m-n**; t_7 : **i, o**). Vor der Centrin-GFP Induktion zeigten ca. 6 % der Zellen eine Centrin-GFP Markierung (**c**). Nach 24 Stunden exprimierten 66 % der Zellen Centrin-GFP. Offene Pfeilspitzen zeigen auf Zellen, die kein Centrin-GFP exprimieren (**c, d**). (**e, k**) Beispiel für eine Centrin-GFP exprimierende Zelle vor Induktion der Centrin-GFP Expression, mit der starken Markierung der dVF (**k**, Pfeilspitze). 2 Stunden nach der Induktion zeigten überwiegend die proximalen Regionen der NBBCs eine GFP-Markierung (**l-m**, Pfeilspitzen). Die dVF war noch nicht markiert (**n**, Pfeilspitze). Nach 7 Stunden waren auch die distalen Bereiche der NBBCs markiert (**o**, Pfeilspitzen). Nach 24 Stunden zeigte auch die dVF wieder die gewohnt starke Centrin-GFP Markierung (**p**, Pfeilspitze). Maßstäbe: 5µm (in d, für a-d); 1µm (in j, für e-p).



3.3 Expression von DIP13-GFP in *C. reinhardtii*

DIP13 ist ein 13 kDa coiled-coil Protein in *C. reinhardtii*, das u. a. Homologe in Mensch und Maus besitzt (Pfannenschmid et al., 2003). Durch Antikörperfärbungen konnte DIP13 an mikrotubulären Strukturen des Basalapparates lokalisiert werden, wie z. B. an den Basalkörpern und den Axonemen (Pfannenschmid et al., 2003). Die Struktur und die geringe Größe von DIP13 waren ein Kriterium, das Protein mit GFP zu markieren.

Das *DIP13* Gen (79 Bp der 5'UTR und 799 Bp der codierenden Region bis zum Stopp-Codon) wurden in pCrGFP kloniert. Das Konstrukt *DIP13::GFP* steht unter der Kontrolle des *HSP70A/RBCS2* Promotors und wird von der *RBCS2* 3'UTR terminiert. Zwischen DIP13 und dem CrGFP wurde ein Linker von zwei Alaninen eingefügt (Abb. 20A, vgl. 2.3.1.3).

3.3.1 Analyse von DIP13-GFP exprimierenden *C. reinhardtii* Stämmen

Der o. g. Vektor wurde mittels Co-Transformation mit dem *ARG7* Gen als selektivem Marker in den *C. reinhardtii* Stamm CC-3395 transformiert. Die Analyse der Transformanten erfolgte mittels Fluoreszenzmikroskopie. Von insgesamt 70 getesteten Klonen waren zwei positiv. In einer zweiten Transformation waren von 140 getesteten Klonen 14 positiv. Die Rate der positiven Klone war somit gering, was auch daran liegen konnte, dass in manchen Fällen positive Stämme aufgrund ihrer sehr schwachen GFP-Fluoreszenz nicht erkannt werden konnten. Die Expression von DIP13-GFP war unterschiedlich stark, und es wurden zwei Stämme mit unterschiedlich starker Expression des Konstruktes ausgesucht: DIP13-GFP C7 (schwache Expression) und DIP13-GFP G10 (starke Expression).

Es wurden zwei Immunfluoreszenz Analysen durchgeführt. Kontrollzellen, DIP13-GFP C7 und G10 Zellen wurden mit Methanol permeabilisiert und fixiert und mit anti-Centrin gefärbt (Abb. 20B). Im zweiten Ansatz wurden die o. g. Zellen mit den Antikörpern anti-DIP13 und anti-acetyliertes-Tubulin analysiert (Abb. 21). Bei Kontrollzellen, die mit anti-DIP13 gefärbt wurden, war DIP13 als punktförmige Struktur am Basalapparat lokalisiert (Abb. 20B, a; Abb. 21, a-c, Pfeilspitzen). Bei manchen Präparationen für die Immunfluoreszenz konnten zusätzliche schwache DIP13-Signale in der Zel-

le - wahrscheinlich am Zellkern - beobachtet werden (Abb. 21, a). In den schwach exprimierenden DIP13-GFP C7 Zellen war ein punktförmiges DIP13-GFP Signal am Basalapparat lokalisiert (Abb. 20B, b, Pfeilspitzen). Diese GFP-Punkte wurden auch durch den anti-DIP13 Antikörper erkannt (Abb. 21, d-f, Pfeilspitzen). In den stark exprimierenden DIP13-GFP G10 Zellen waren ein bis zwei DIP13-GFP Punkte in den Zellen zu beobachten. Die Lokalisation der GFP-Aggregate variierte innerhalb der Zellen eines Stammes. Jedoch waren die Signale in der Regel nicht am Basalapparat lokalisiert (Abb. 20B, d, Pfeilspitzen). Interessanterweise markierte anti-DIP13, neben den DIP13-GFP Aggregaten in der Zelle, den Basalapparat nur schwach (Abb. 21, g-i). Die Lokalisation von Wildtyp-DIP13 scheint also in den stark exprimierenden DIP13-GFP G10 Zellen fehlerhaft zu sein.

Für Western-Blot Analysen wurden Kontrollzellen, DIP13-GFP C7 und G10 Zellen mit 1,5 % Triton X-100 behandelt und durch anschließende Zentrifugation in Pellet und Überstand getrennt. Zudem wurden Präparate von „ganzen Zellen“ analysiert. Neben der Wildtyp-Bande bei 13 kDa (Abb. 20C, Pfeil DIP13) konnte mit anti-DIP13 eine zusätzliche Bande bei ca. 41 kDa in den Pellets der DIP13-GFP exprimierenden Stämmen C7 und G10 detektiert werden (Abb. 20C, Pfeil DIP13-GFP). Diese Bande war in den Präparaten „ganzer Zellen“ nur im Stamm G10 zu sehen. Im Verhältnis zu schwach exprimierenden DIP13-GFP C7 Zellen, war in den stark exprimierenden DIP13-GFP G10 Zellen mehr Fusionsprotein zu beobachten. Zudem war ein Teil des DIP13-GFPs der stark exprimierenden Zellen (G10) löslich (Abb. 20C, Pfeil DIP13-GFP). Das Wildtyp-DIP13 Protein war im DIP13-GFP Stamm G10 im Verhältnis zur Kontrolle und Stamm C7 unterrepräsentiert (Abb. 20C, Pfeil DIP13).

Um die unterschiedlichen Expressionslevel in den verschiedenen DIP13-GFP Stämmen näher zu analysieren und um das Verhältnis von Wildtyp-DIP13 zu DIP13-GFP zu untersuchen, wurde RNA von Kontrollzellen sowie von Zellen der beiden DIP13-GFP Stämme isoliert und cDNA synthetisiert. Diese cDNAs wurden für eine semi-quantitative PCR eingesetzt. Es wurden jeweils nach 16, 25 und 35 Zyklen der PCR Proben genommen und auf ein Agarosegel aufgetragen. Dabei wurden drei verschiedene Ansätze durchgeführt. Die PCR wurde jeweils mit spezifischen Primern für DIP13-GFP, für Wildtyp-DIP13 und - zur Kontrolle der cDNA Menge - mit Primern für Centrin durchgeführt (Abb. 22). Eine Amplifikation der DIP13-GFP cDNA war bereits

nach 25 Zyklen für den stark exprimierenden Stamm G10 zu sehen. Nach 35 Zyklen der PCR war in beiden Stämmen ungefähr gleich viel PCR-Produkt zu sehen. In Kontrollzellen konnte das GFP-Fusionsprotein, wie erwartet, nicht nachgewiesen werden. Vergleicht man nun dazu das Amplifikat der DIP13-Wildtyp cDNA, so war zu erkennen, dass jeweils nach 25 und 35 Zyklen ungefähr gleich viel PCR Produkt gebildet wurde (Abb. 22).

Im Vergleich zu DIP13-GFP C7 Zellen konnte mit dieser Quantifizierung also gezeigt werden, dass mehr Fusions-RNA in DIP13-GFP G10 vorlag. Es wurde allerdings nicht nachgewiesen, dass weniger Wildtyp-RNA in den stark exprimierenden DIP13-GFP G10 Zellen transkribiert wurde. Dies lässt vermuten, dass die Reduzierung des Wildtyp-DIP13 Proteins in G10 nicht auf einer geringeren Transkription des Gens, sondern auf abgeschwächte Translation oder einen proteolytischen Abbau des Produktes zurückzuführen war.

3.3.2 Die starke Expression von DIP13-GFP führt zur Verkürzung der Geißeln

Während der Untersuchung der DIP13-GFP Zellen wurde beobachtet, dass in ca. sechs bis sieben Tage alten Batch-Kulturen (vgl. 2.2.2) von stark exprimierenden DIP13-GFP Stämmen, z. B. G10, vermehrt Zellen am Boden des Kulturgefäßes lagen. Die lichtmikroskopische Analyse zeigte, dass viele Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen keine oder kurze Geißeln hatten. Dies war in „frischen“ Kulturen (ca. drei bis vier Tage alt) nicht der Fall. Aufgrund dieser Beobachtung wurden der Kontrollstamm, DIP13-GFP C7 (schwache Expression) und zwei Stämme mit starker DIP13-GFP Expression (G10 und B4) in gleicher Konzentration ($2,4 \times 10^5$ Zellen/ml) inokuliert und unter gleichen Bedingungen kultiviert (vgl. 2.2.2). Im Verlauf der nächsten sieben Tage wurden regelmäßig Proben genommen, mit Lugol'scher Lösung fixiert und die Konzentration sowie die Geißelanzahl der Zellkulturen bestimmt. Kontrollzellen besaßen im Verlauf des Kulturwachstums zu über 90 % zwei Geißeln mit einer Länge von ca. 10-12 μm . In Abb. 23A sind Kontrollzellen am zweiten (a) und am siebten Versuchstag (b) dargestellt. Die Zellen des schwach exprimierenden DIP13-GFP Stammes C7 verhielten sich wie die Kontrollzellen (nicht gezeigt). Die stark exprimierenden DIP13-GFP G10 Zellen hatten in den ersten vier Tagen des Versuches zu über 90 % zwei „normal“ lange Geißeln (Tab. 9). In Abb. 23 A (c) sind Zellen vom zweiten Versuchstag dargestellt. Mit zunehmender Kulturdichte traten aber zunehmend Zellen ohne oder mit zwei kurzen Geißeln unter 6 μm auf (Tab. 9). Am siebten Versuchstag hatten z. B. Zellen des Stammes

G10 zu 32,9 % kurze Geißeln und zu 37,9 % keine Geißeln (Tab. 9). Die Abb. 23A (d, e, f) zeigt Zellen dieses Stadiums. Auch bei DIP13-GFP B4 Zellen traten mit zunehmender Kulturdichte vermehrt Zellen mit verkürzten Geißeln auf (Abb. 23A, g, Pfeil). Allerdings konnte nicht immer genau unterschieden werden, ob die Zellen sehr kurze Geißeln (Stummel) oder keine Geißeln aufwiesen. Dies könnte zu Ungenauigkeiten in den Daten geführt haben (vgl. Tab. 9). Zur genaueren Untersuchung wurden DIP13-GFP Zellen einer „älteren Kultur“, die überwiegend kurze oder keine Geißeln aufwiesen, für die Elektronenmikroskopie in Epon eingebettet und Ultradünnschnitte angefertigt. Die Geißeln endeten überwiegend ca. 100 – 500 nm oberhalb der Übergangsregion. Die Basalkörper und die Übergangsregion schienen aber nicht defekt zu sein (vgl. Abb. 23C).

Kulturtag	lange Geißeln [%]	kurze Geißeln [%]	ohne Geißeln [%]	ausgewertete Zellen [n]
2	95,2	0	4,8	147
3	96,7	0	3,3	151
4	93,4	0	6,6	122
5	85,2	4,9	9,9	142
6	49,2	17,2	33,6	122
7	29,3	32,9	37,9	140
8	25,5	55,0	19,5	169

Tab. 9: DIP13-GFP G10: Geißelanzahl während des Kulturwachstums

Das Kulturwachstum von DIP13-GFP G10 wurde über 8 Tage verfolgt. Täglich wurden Proben genommen und mit Lugol'scher Lösung fixiert. Die Anzahl der Geißeln wurde im Phasenkontrastmikroskop bestimmt. Lange Geißeln: 2-geißelige Zellen mit Geißellängen über 6 µm; kurze Geißeln: 2-geißelige Zellen mit Geißellängen unter 6 µm.

Neben der Geißelzahl wurde auch die Kulturdichte bestimmt. Es war zu beobachten, dass die beiden stark exprimierenden DIP13-GFP Stämme, G10 und B4, im Vergleich zur Kontrolle und DIP13-GFP C7 langsamer wuchsen. Zudem nahm die Zelldichte der stark exprimierenden Stämme sieben Tage nach Inokulation der Kulturen ab. Lichtmikroskopische Untersuchungen zeigten, dass die Kulturen dann zahlreiche Zellbruchstücke und tote Zellen enthielten. Im Vergleich dazu hatten Kontrolle und DIP13-GFP C7 die stationäre Wachstumsphase erreicht (Abb. 23B). Der Versuch wurde dreimal durchgeführt und führte jeweils zu vergleichbaren Resultaten. Die starke Expression von DIP13-GFP hat also vermutlich einen letalen Effekt auf *C. reinhardtii* Zellen. Die Zellen scheinen ihre Geißeln mit zunehmender Kulturdichte zu verkürzen bzw. ganz einzuziehen und die Zellen sterben ab.

3.3.3 Die Expression von DIP13-GFP führt zur verlangsamten Geißelregeneration

Die Menge von DIP13 („deflagellation induced protein of 13 kDa“) mRNA erhöht sich nach der Entgeißelung von *C. reinhardtii* Zellen (Pfannenschmidt et al., 2003). Zur weiteren Analyse des Effektes der DIP13-GFP Expression auf das Geißelwachstum von *C. reinhardtii* (vgl. 3.3.2) wurden Geißelregenerationsexperimente durchgeführt. *C. reinhardtii* kann nach mechanischer oder chemischer Amputation die Geißeln in kurzer Zeit wieder regenerieren (Rosenbaum et al., 1969). Die Zellen wurden mittels pH-Schock entgeißelt (vgl. 2.4.3). Die Regeneration fand im Licht, bei Raumtemperatur, unter leichtem Schütteln und über einen Zeitraum von 24 Stunden statt. Vor der Entgeißelung der Zellen aus jüngeren Kulturen (vgl. 3.3.2) hatten Kontrollzellen zu 96,6 % (n = 147), DIP13-GFP C7 Zellen zu 95,6 % (n = 160) und DIP13-GFP G10 Zellen zu 97 % (n = 133) zwei Geißeln (Abb. 24A, a, f, k; 24B). Die Entgeißelung erfolgte zu nahezu 100 % (Abb. 24A, b, g, l; 24B und Anhang 1). Unter den gegebenen Regenerationsbedingungen hatten die Kontrollzellen bereits nach zwei Stunden zu 40,3 % (n = 134) zwei Geißeln. Allerdings hatten diese Geißeln noch nicht ihre volle Länge erreicht (Abb. 24A, c). Nach vier Stunden Regenerationszeit waren die Kontrollzellen wieder zu 91,1 % (n = 146) begeißelt und nach acht Stunden besaßen die Zellen zu 99,2 % wieder zwei Geißeln mit Ausgangslänge von ca. 10-12 μm (Abb. 24A, e; 24B). Die DIP13-GFP Zellen regenerierten ihre Geißeln im Vergleich zu den Kontrollzellen mit einer zeitlichen Verzögerung (Abb. 24B). Nach zwei Stunden Regenerationszeit besaßen der schwach exprimierende Stamm C7 erst zu 2,3 % (n = 132) und der stark exprimierende Stamm G10 nur zu 1,5% (n = 134) zwei Geißeln (Abb. 24B). In Abb. 24A (c, h, m) sind zum

Vergleich die Zellen der drei untersuchten Stämme nach zwei Stunden Regenerationszeit dargestellt. Im weiteren Verlauf der Regeneration zeigte sich, dass die Zellen von Stamm C7 schneller regenerierten als die von Stamm G10. Nach sechs Stunden hatten C7 Zellen zu 41,4 % (n = 152) und G10 Zellen nur zu 23 % (n = 148) zwei Geißeln. Allerdings waren die Geißeln der Dip-13-GFP Zellen zum Teil noch sehr kurz (Abb. 24 A, Pfeile in i, n). Nach acht Stunden hatten die C7 Zellen zu 79,3 % (n = 150) zwei Geißeln regeneriert, wobei die Geißellängen denen der Kontrollzellen nach acht Stunden Regeneration entsprachen (Abb. 24A, j). Die G10 Zellen hatten erst zu 57,8 % (n = 154) ihre Geißeln regeneriert. Zudem waren diese zum Teil noch sehr kurz (Abb. 24A, p, Pfeil). Nach 24 Stunden hatten aber alle drei Stämme wieder zu über 90 % zwei Geißeln normaler Länge (Abb. 24B, Anhang 1). Dieser Versuch wurde zweimal durchgeführt und führte jeweils zu einem ähnlichen Ergebnis.

Die Expression von DIP13-GFP führt also, unabhängig von der Stärke, generell zu einer verlangsamten Geißelregeneration in *C. reinhardtii*. Eine stärkere Expression von DIP13-GFP verlangsamte die Regeneration mehr als eine schwächere Expression des Fusionsproteins.

Abb. 20: Analyse von DIP13-GFP exprimierenden *C. reinhardtii***A: Schematische Darstellung von pCrHSP70A/RBCS2-DIP13-GFP**

DIP13::GFP steht unter der Kontrolle des *HSP70A/RBCS2* Promotors und wird von der *RBCS2* 3'UTR terminiert. 799 Bp der codierenden Region einschließlich 79 Bp der 5'UTR des *DIP13* Gens wurden in das Konstrukt eingefügt.

B: Lokalisation von DIP13-GFP in *C. reinhardtii*

Kontrollzellen (a), DIP13-GFP C7 Zellen (b) und DIP13-GFP G10 Zellen (c) wurden mit Methanol permeabilisiert/fixiert und mit anti-Centrin (BAS 6.8, 1:20) und die Kontrolle zusätzlich mit pAK anti-DIP13 (1:200) gefärbt. Sekundäre Antikörper waren anti-Maus IgG Cy3 (1:300) und anti-Kaninchen IgG FITC (1:100).

a: anti-Centrin (rot); anti-DIP13 (grün)

b, c: anti-Centrin (rot); GFP-Fluoreszenz (grün)

Pfeilspitzen markieren die anti-DIP13 Signale (a) oder die DIP13-GFP Signale (b, c). Der Pfeil markiert ein DIP13-GFP Signal am Basalapparat von stark exprimierenden DIP13-GFP G10 Zellen.

Maßstab: 5µm

C: Western-Blot Analyse mit DIP13-GFP exprimierenden Zellen

Präparate „ganzer Zellen“, isolierte Cytoskelette (Pellet) und Überstände von Kontrolle (K), DIP13-GFP C7 und DIP13-GFP G10 wurden durch SDS-PAGE (12,5 %) aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran transferiert. Es wurden ca. 20 µg Protein pro Spur aufgetragen. An der linken Seite ist der Molekulargewichtstandard markiert. Die Membran wurde mit anti-DIP13 (1:500) gefärbt.

Pfeil DIP13: Wildtyp-DIP13 Bande bei ca. 13 kDa

Pfeil DIP13-GFP: Bande des Fusionsproteins bei ca. 41 kDa

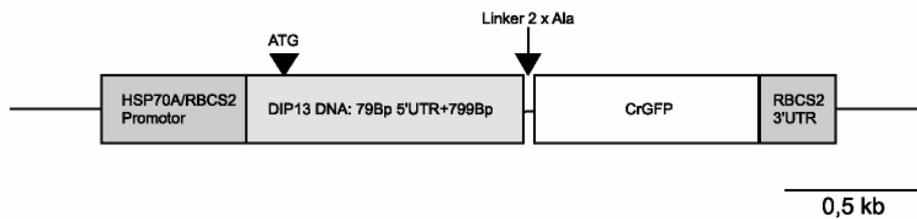
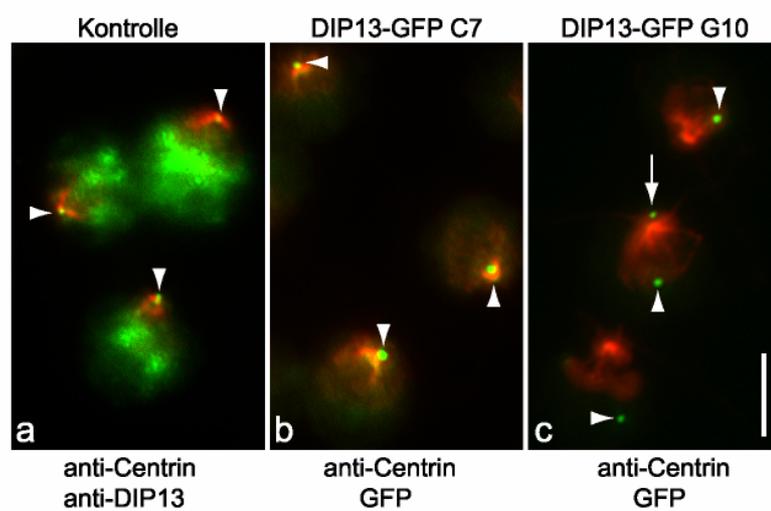
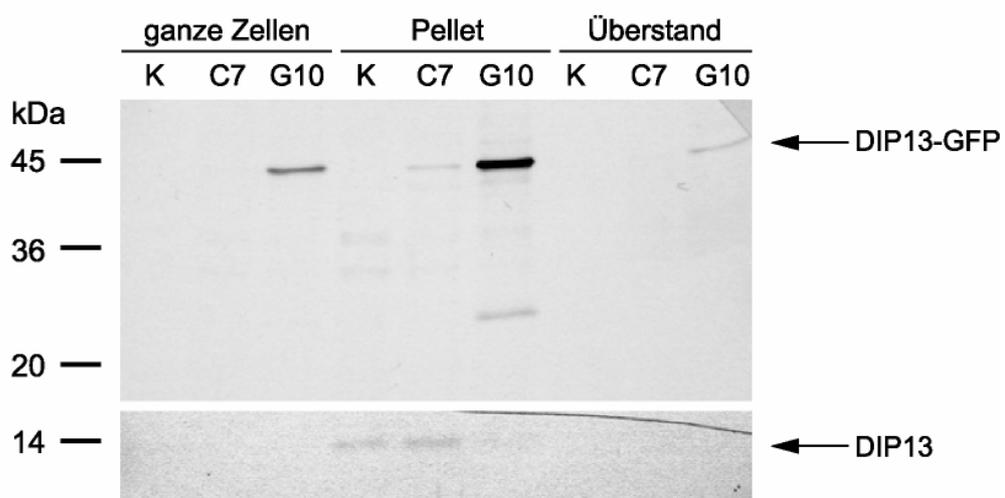
A**B****C**

Abb. 21: Indirekte Immunfluoreszenz an DIP13-GFP exprimierenden Zellen

Kontrollzellen (**a-c**), DIP13-GFP C7 Zellen (**d-f**) und DIP13-GFP G10 Zellen (**g-h**) wurden mit Methanol permeabilisiert/fixiert und für die indirekte Immunfluoreszenz mit den Antikörpern anti-DIP13 und anti-acetyliertem Tubulin gefärbt.

a, d, g: anti-DIP13 (1:200) und anti-Kaninchen IgG Cy3 (1:300)

b, e, h: zu a, d, g korrespondierende Immunfluoreszenz mit anti-acetyliertem Tubulin (1:300) und anti-Maus IgG FITC (1:100)

c, f, i: Kombinierte Aufnahmen der anti-DIP13 (rot) und anti-Tubulin (grün) Signale.

Die Pfeilspitzen markieren die DIP13 Signale.

Maßstab: 5 μm

Abb. 22: Semiquantitative PCR zum Nachweis von DIP13-GFP mRNA

Von Kontrolle (K), DIP13-GFP C7 (C7) und DIP13-GFP G10 (G10) Zellen wurde mRNA isoliert und anschließend cDNA synthetisiert. Diese cDNAs wurden für eine semiquantitative PCR eingesetzt. Die PCR-Produkte von DIP13-GFP und Wildtyp-DIP13 cDNA sind dargestellt. Zur Kontrolle ist die cDNA von Centrin amplifiziert worden. Nach jeweils 16, 25 und 35 Zyklen wurden Proben entnommen und auf einem Agarosegel aufgetrennt. Die verwendeten Primer sind unter 2.3.4 angegeben.

Im stark exprimierenden DIP13-GFP G10 Stamm war bereits nach 25 Zyklen ein Amplifikat nachzuweisen. Die Wildtyp-RNA Menge war im stark exprimierenden DIP13-GFP G10 Stamm nicht reduziert.

Abb. 21

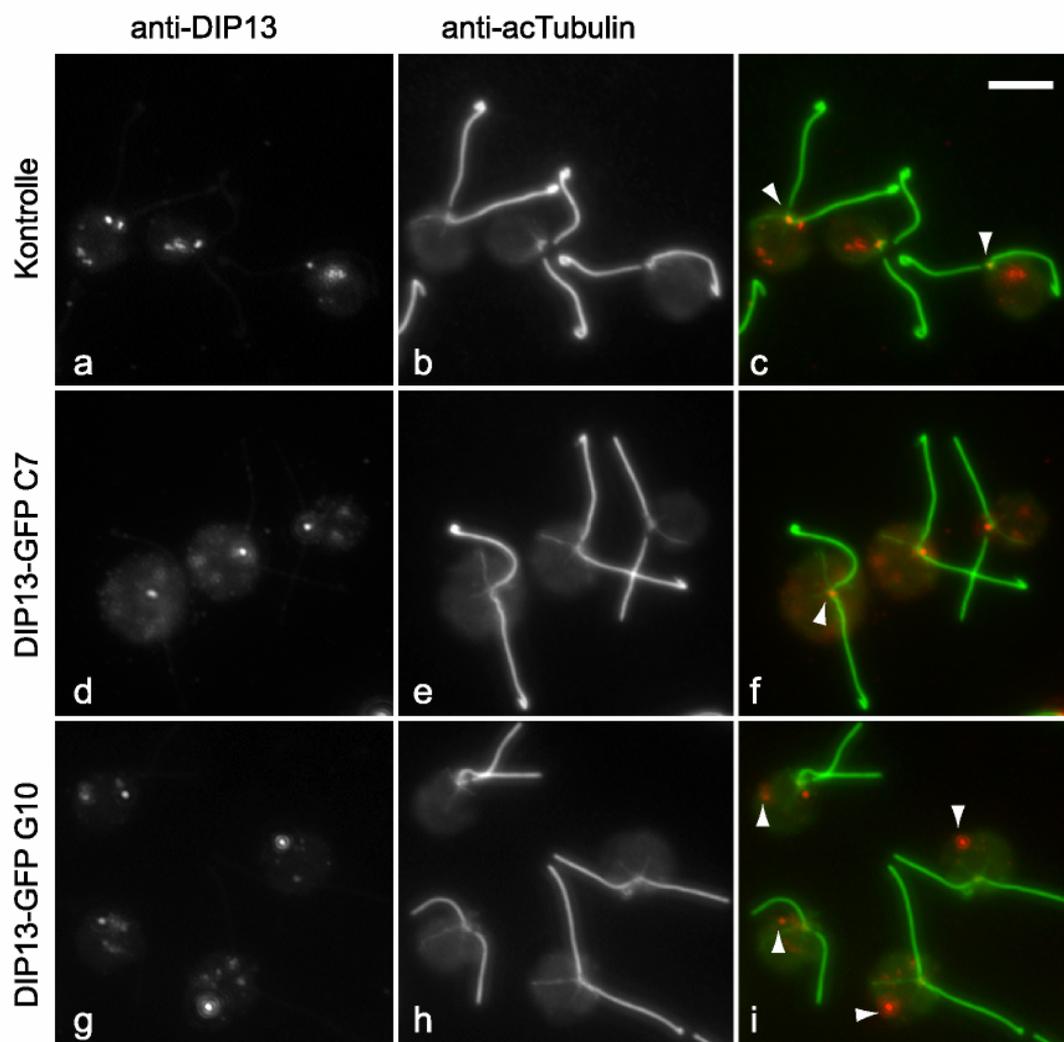


Abb. 22

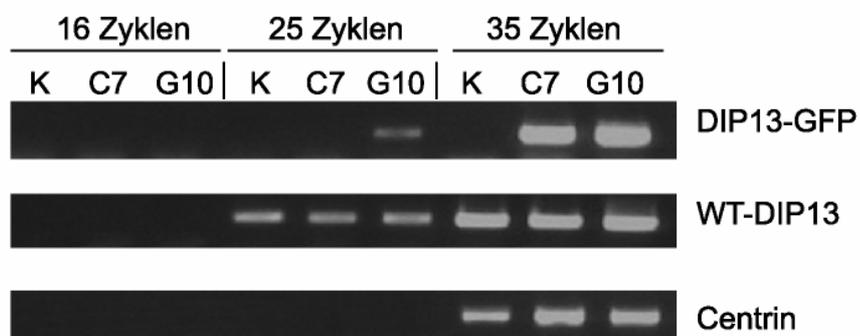


Abb. 23: Analyse von DIP13-GFP Stämmen während des Kulturwachstums

A: Differentielle Phasenkontrastaufnahmen von stark exprimierenden DIP13-GFP Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen während des Kulturwachstums

Zellen am zweiten und am siebten Tag des Kulturwachstums wurden mit Lugol'scher Lösung fixiert und mit einem 60er Ölimmersionsobjektiv und differentieller Phasenkontrast Optik (DIC) betrachtet.

a, b: Kontrollzellen

c-f: DIP13-GFP G10 Zellen

g: DIP13-GFP B4 Zellen

Am zweiten Tag des Kulturwachstums hatten Kontrollzellen (**a**) und DIP13-GFP G10 (**c**) Zellen normal lange Geißeln von ca. 10-12 μm . In Kontrollzellen änderte sich die Länge der Geißel mit zunehmender Dichte der Kultur nicht (**b**). DIP13-GFP G10 Zellen hatten mit zunehmender Kulturdichte kürzere Geißeln (Pfeile) oder keine Geißeln (**d-f**). Dies wurde auch beim stark exprimierenden Stamm DIP13-GFP B4 beobachtet (**g**).

Maßstab: 5 μm

B: Wachstumskurve von DIP13-GFP exprimierenden Stämmen im Vergleich zu Kontrollzellen

Mit Kontrollzellen (gefüllter Kreis), und Zellen der Stämme DIP13-GFP C7 (gefülltes Quadrat), DIP13-GFP G10 (gefülltes Dreieck) und DIP13-GFP B4 (offenes Quadrat) wurden mit $2,4 \times 10^5$ Zellen/ml Kulturen inokuliert. In den darauf folgenden sieben Tagen wurde täglich die Konzentration der Kulturen bestimmt. Dargestellt sind die Anzahl der Zellen/ml am jeweiligen Tag.

C: Elektronenmikroskopische Analyse von DIP13-GFP G10 Zellen aus einer „älteren“ Kultur

Die Zellen wurden in Epon eingebettet und Ultradünnschnitte angefertigt.

a, b: Längsschnitte durch die Geißel.

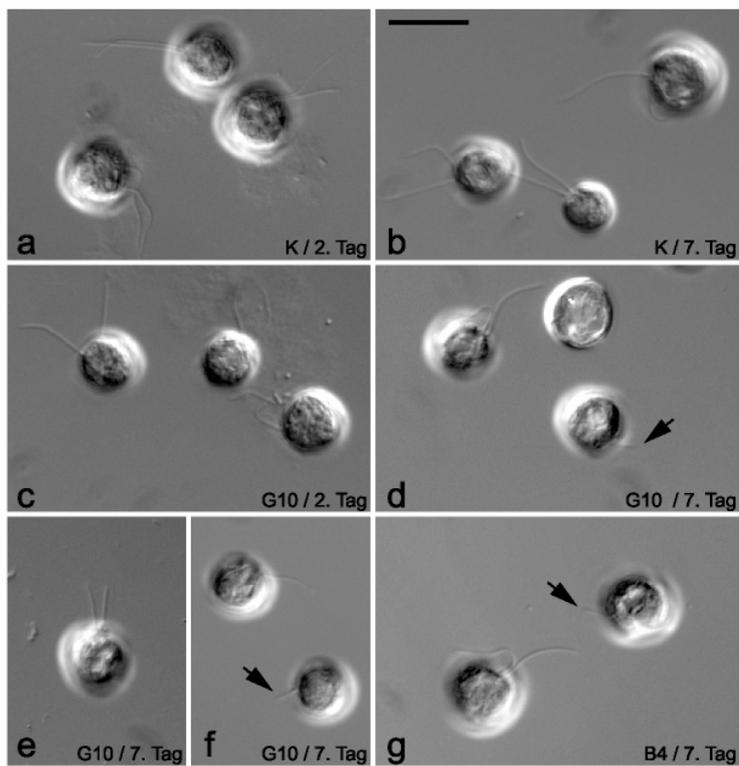
c: Querschnitt durch die Übergangsregion („sternförmige Struktur“).

d: Querschnitt durch die Geißel (typische 9+2 Struktur)

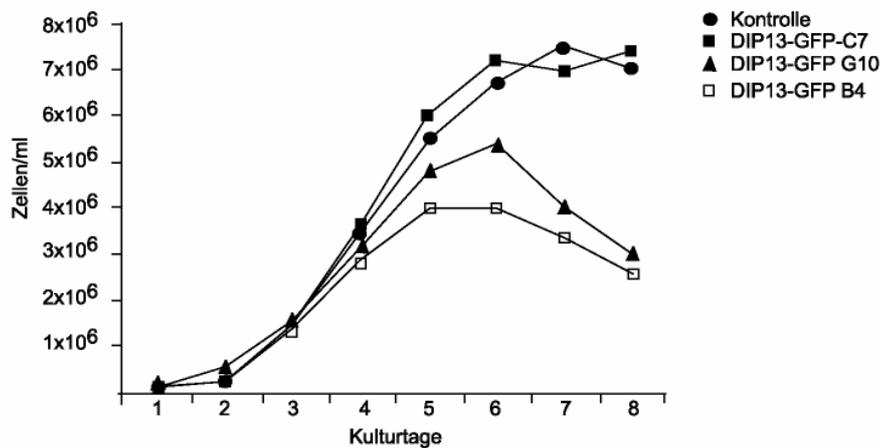
Zellen von DIP13-GFP G10 hatten oft kurze Geißeln (**a, b**, Pfeilspitzen). Die Übergangsregion scheint nicht defekt zu sein (**a, c**). Sie zeigt die typische H-förmige Struktur (**a**, Pfeil). Die Basalkörper waren ebenfalls nicht defekt (**b**, Pfeil markiert einen Querschnitt durch einen Basalkörper, Triplettstruktur).

Maßstäbe: 200 nm (in **b**, für **a-b**; in **d**, für **c-d**)

A



B



C

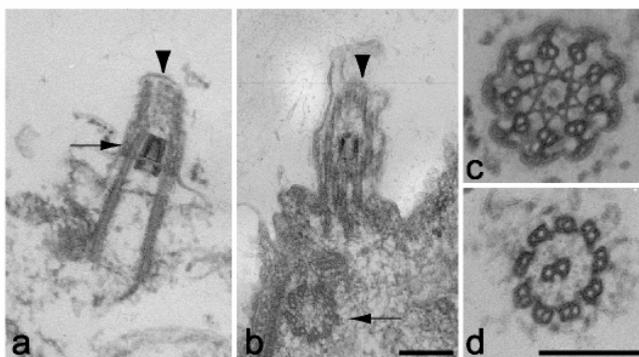


Abb. 24: Geißelregeneration von DIP13-GFP exprimierenden Zellen

Kontrollzellen, DIP13-GFP C7 und DIP13-GFP G10 Zellen wurden durch pH-Schock entgeißelt. Vor und nach der Entgeißelung sowie über einen Zeitraum von 24 Stunden wurden Proben entnommen und mit Lugol'scher Lösung fixiert.

A: Differentielle Phasenkontrastaufnahmen (DIC) von DIP13-GFP Zellen während der Geißelregeneration

Die Abbildung zeigt DIC-Aufnahmen der fixierten Zellen vor (**a, f, k**), direkt nach (**b, g, l**) der Entgeißelung und zu verschiedenen Zeitpunkten während der Geißelregeneration (2 Stunden: **c, h, m**, 6 Stunden: **d, i, n-o**, 8 Stunden: **e, j, p**). Die Pfeile zeigen auf kurze Geißeln von DIP13-GFP exprimierenden Zellen.

a-e: Kontrolle

f-j: DIP13-GFP C7

k-p: DIP13-GFP G10

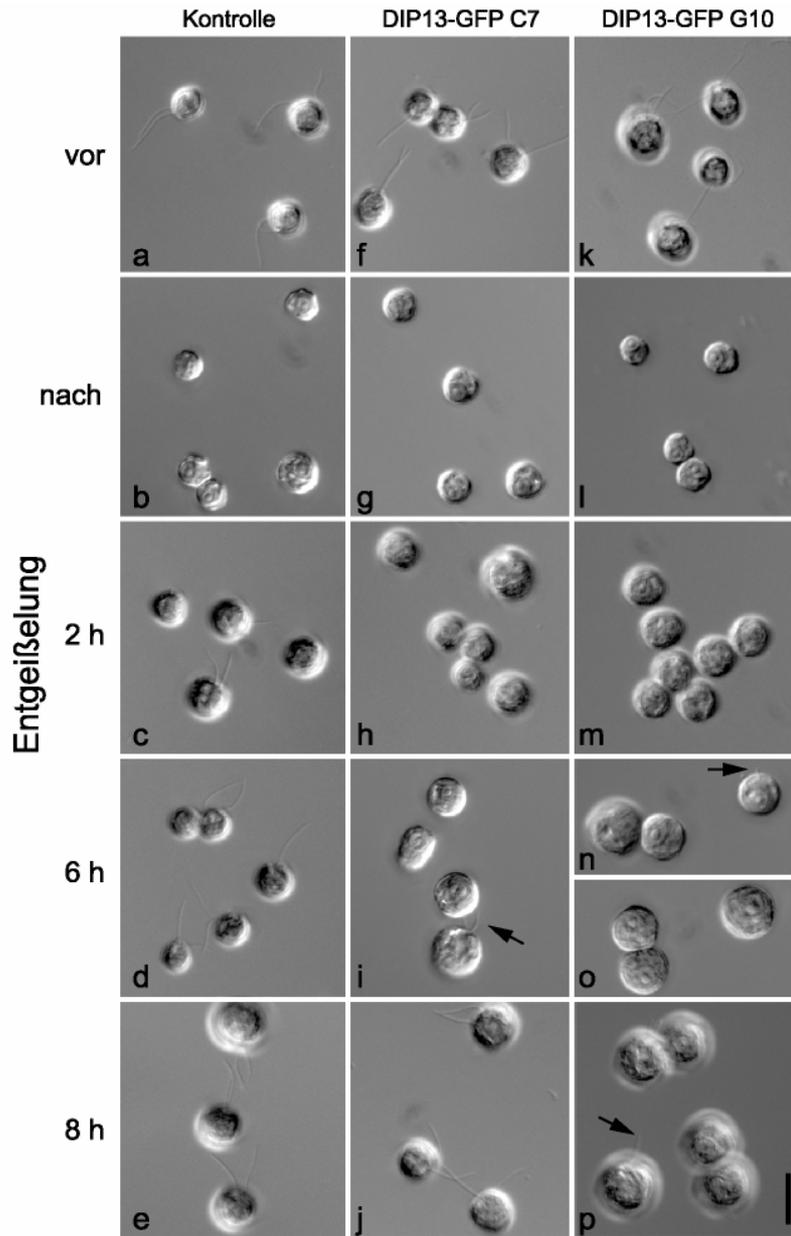
Maßstab: 5 μm

B: Geißelregenerationsrate von DIP13-GFP Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen

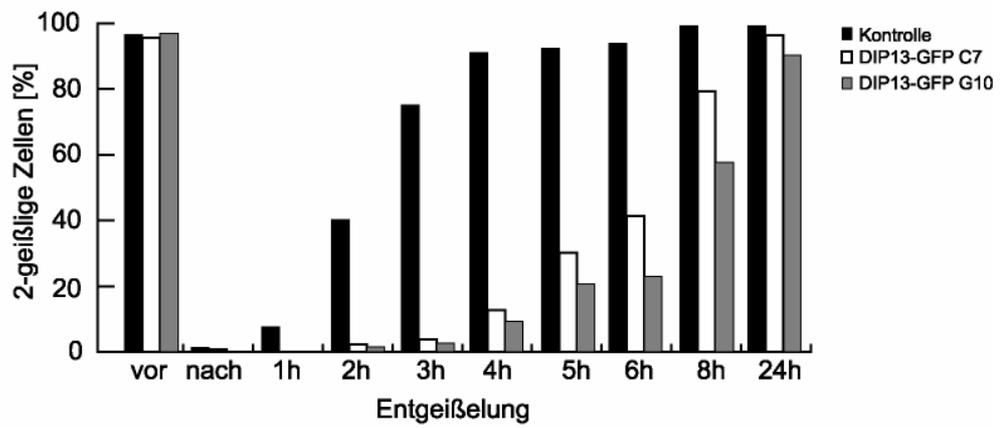
Vor und nach der Entgeißelung und über einen Zeitraum von 24 Stunden während der Geißelregeneration wurde der Begeißelungszustand der Zellen lichtmikroskopisch bestimmt. Dargestellt sind die Anzahl der zweigeißeligen Zellen in %. Die Originalwerte zu dieser Abbildung sind in Anhang 1 aufgeführt.

Schwarz: Kontrolle; weiß: DIP13-GFP C7; grau: DIP13-GFP G10

A



B



3.4 GFP-Markierung weiterer Cytoskelettproteine in *C. reinhardtii*

Die GFP Markierung bietet den großen Vorteil der Beobachtung von dynamischen Prozessen in lebenden Organismen. Die Geißel, als hoch dynamisches Organell in *C. reinhardtii*, ist hierbei von besonderem Interesse. Deswegen war unter anderem ein Ziel dieser Arbeit, Proteine der Geißel von *C. reinhardtii* mit GFP zu markieren. Allerdings konnten nach der Transformation der verschiedenen GFP Konstrukte keine positiven Klone durch Fluoreszenzmikroskopie und Western-Blot Analysen detektiert werden (vgl. Tab. 10).

Neben δ -Tubulin, das in *C. reinhardtii* in den Basalkörpern lokalisiert ist (Dutcher und Trabuco, 1998; Dutcher, 2001), wurde also überwiegend versucht Proteine, die in der Geißel von *C. reinhardtii* lokalisiert sind, mit GFP zu markieren. Dazu gehörten IFT52 (Deane et al., 2001) und IFT88 (Pazour et al., 2000), zwei Proteine, die am „Intraflagellar Transport“ (IFT, vgl. Einleitung) beteiligt sind. IFT52 konnte durch Antikörperanalysen in der Geißel und in der Region der Basalkörper lokalisiert werden (Deane, et al., 2001). Des Weiteren wurden die Geißelproteine LC11 (King und Patel-King, 1995), Rib72 (Ikeda et al., 2003) und PF16 (Smith und Lefebvre, 1996) mit GFP markiert und in *C. reinhardtii* transformiert. Den genannten Proteinen wurde das GFP an den C-Terminus fusioniert. PF16 wurden zusätzlich noch N-terminal markiert. Bei allen Transformationen konnten keine positiven Klone detektiert werden (vgl. Tab. 10). Zum Teil wurden die Western-Blot Analysen mit und ohne Hitzeschock durchgeführt, aber selbst durch die zusätzliche Induktion des konstitutiven *HSP70A/RBCS2* Promotors (Schroda et al., 2000) konnten in Western-Blot Analysen keine positiven Signale beobachtet werden. Bei der Untersuchung von LC11- und Rib72-GFP Stämmen mittels Western-Blot von „ganzen Zellen“, waren mit dem anti-GFP Antikörper potentiell positive Banden zu erkennen. Allerdings stellte sich nach weiterführenden Experimenten heraus, dass diese Stämme ebenfalls negativ waren. Die weiteren Experimente bestanden darin, dass die potentiell positiven Stämme in der Immunfluoreszenz mit einem anti-GFP Antikörper gefärbt wurden und in Western-Blot Analysen die Zellen in Pellet und Überstand fraktioniert wurden. Zudem wurden jeweils 30 der 70 getesteten Klone anstatt mit Methanol mit Formaldehyd für die Fluoreszenz fixiert. Dies wurde gemacht, um zu testen, ob vielleicht die Fixierung der Zellen durch Methanol das GFP-Signal in den Geißeln stören könnte.

Des Weiteren wurden zwei verschiedene C-terminal markierte $\alpha 1$ -Tubulin Konstrukte in *C. reinhardtii* transformiert. Diese Konstrukte unterschieden sich in der Länge der 5'UTR des $\alpha 1$ -Tubulin Gens, denn eine Überlegung war, dass in der 5'UTR regulatorische Sequenzen sein könnten, die für die Expression des Gens nötig sind. Außerdem wurden zwei N-terminal GFP tragende Konstrukte hergestellt. Zum einen wurde $\alpha 1$ -Tubulin in den pNCrGFP Vektor (vgl. Abb. 2C) kloniert und hatte somit die 5'UTR und das 1. Intron des *SFA* Gens vor dem *GFP:: $\alpha 1$ -Tubulin* Konstrukt lokalisiert. Im zweiten N-terminalen Konstrukt wurde die *RBCS2* 3'UTR durch die 3'UTR des $\alpha 1$ -Tubulin Gens ersetzt. Alle vier genannten Konstrukte führten nach der Transformation in CC-3395 nicht zu positiven Klonen.

Um Erklärungsmöglichkeiten für die fehlende Fusionsproteinexpression zu finden, wurden erste weiterführende Analysen durchgeführt. Dazu wurden Stämme, in die das C-terminale Konstrukt mit der längeren 5'UTR transformiert wurde (vgl. Tab. 10), ausgesucht. Um zu testen, ob die Klone überhaupt das GFP Konstrukt trugen, wurde von 19 Stämmen DNA isoliert und eine PCR mit GFP-spezifischen Primern durchgeführt. Als Kontrolle dienten Stämme, die das GFP-Konstrukt exprimierten (GFP-SFA D5, vgl. 3.1.1) und ein Stamm, der kein GFP-Konstrukt enthielt (Kontrolle). Bei dieser PCR zeigten die Positiv-Kontrolle (GFP-SFA D5) und 16 der getesteten Tubulin-GFP Stämme ein Amplifikat. Von zwei dieser Tubulin-GFP Stämme und wiederum der beiden Kontroll Stämme wurde RNA isoliert und cDNA synthetisiert. Mit spezifischen Primern für $\alpha 1$ -Tubulin::*GFP* konnte nachgewiesen werden, dass die Zellen eine mRNA für das Fusionsprotein bildeten (Abb. 25). Diese Stämme wurden in der Immunfluoreszenz und in Western-Blot Analysen erneut getestet, zeigten aber weiterhin kein Signal. Diese Versuche zeigten, dass das GFP-Konstrukt zwar transkribiert, aber nicht translatiert wurde.

Eine weitere Möglichkeit, Tubulin in Zellen zu markieren, besteht in dem indirekten Weg, Mikrotubuli-bindende Proteine mit GFP zu markieren. Marc et al. (1998) zeigten, dass das humane MAP4 („microtubule-associated protein 4“), N-terminal mit GFP markiert, Mikrotubuli in Pflanzen dekorierte. Ein Konstrukt, welches die Mikrotubulibindedomäne von MAP4 (MAP4BD) N-terminal an ein für Pflanzen optimiertes GFP (Kost et al., 1998) fusioniert hat, wurde freundlicherweise von Dr. J. Mathur zur Verfügung gestellt. Auf verschiedene Weisen wurde versucht, die MAP4BD mit GFP zu markie-

ren, in *C. reinhardtii* zu exprimieren und somit die Mikrotubuli sichtbar zu machen (vgl. Tab. 10). Leider war auch dies bisher nicht erfolgreich. Insgesamt führte die Expression weiterer GFP-markierter Proteine bisher also nicht zum erwünschten Erfolg. Mögliche Gründe werden nachfolgend diskutiert.

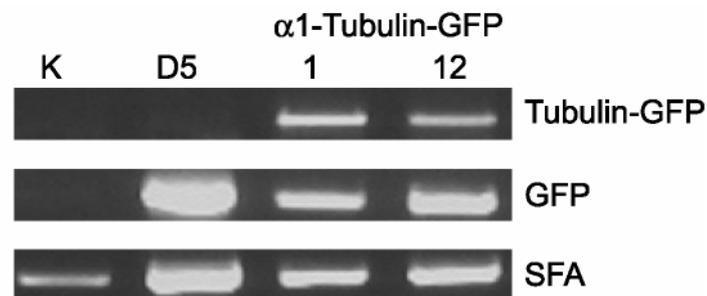


Abb. 25: Expression von $\alpha 1$ -Tubulin mRNA

Von Kontrolle (K), GFP-SFA D5 und zwei $\alpha 1$ -Tubulin-GFP Stämmen (1 und 12) wurde mRNA isoliert und anschließend cDNA synthetisiert. Die Analyse zeigt die PCR-Produkte aufgetrennt auf einem Agarosegel. Im Vergleich sind die PCR-Produkte von Tubulin-GFP und GFP cDNA. Als Kontrolle ist die SFA cDNA dargestellt. Die verwendeten Primerkombinationen sind unter 2.3.4 angegeben.

Protein	GFP C- oder N-terminal	Länge 5'UTR	F	WB	Besonderheiten
δ -Tubulin	C	54bp	32	16 +/-HS	lebend Beobachtung
IFT88	C	52bp (107bp)	32	n. d.	-
IFT52	C	88bp (91bp)	32	n. d.	-
Rib72	C	120bp (125bp)	70	17	siehe Text
LC11	C	106bp	70	17	siehe Text
PF16	C	148bp (156bp)	24	n.d.	-
PF16	N	88bp SFA 5'UTR + 1. Intron	32	n.d.	-
α1-Tubulin	C	76bp (142bp)	32	18 +/-HS	-
α 1-Tubulin	C	138bp (142bp)	1. 24 2. 32	1. 10 2. n. d.	RNA Analysen (siehe Text)
α 1-Tubulin	N	88bp SFA 5'UTR + 1. Intron	48	5	
α 1-Tubulin	N	88bp SFA 5'UTR + 1. Intron	48	n. d.	eigene 3'UTR
MAP4BD aus Mensch	N	13bp der HSP70B 5'UTR	24	n. d.	cDNA PflanzenGFP
MAP4BD	C	13bp der HSP70B 5'UTR	24	n. d.	cDNA
MAP4BD	N	88bp SFA 5'UTR + 1. Intron	32	n. d.	cDNA
MAP4BD	N	5'-u. 3'UTR PsuD	32	n. d.	cDNA/ pGenD

Tab. 10: Weitere – nicht positive – GFP-markierte Proteine in *C. reinhardtii*

In F (= Fluoreszenzmikroskopie) und WB (= Western-Blot) sind jeweils die Anzahl der getesteten Klone angegeben. n. d. = nicht durchgeführt; HS = Hitzeschock; pGenD = cDNA Expressionsvektor; 5'UTR = Länge der Region vor dem Startcodon (in Klammern ist jeweils die komplette Länge der Region angegeben)

4 Diskussion

In dieser Arbeit wurden die Basalapparatproteine „striated fiber assemblin“ (SFA), Centrin und DIP13 der Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* mit dem „green fluorescent protein (GFP) markiert, stabil in *C. reinhardtii* transformiert und anschließend analysiert. Es wurde die Lokalisation von GFP-markiertem Protein mit der des Wildtypproteins verglichen. Die Veränderungen von Domänen der Fusionsproteine sollten klären, inwieweit sie für Lokalisation und Funktion der Proteine wichtig sind. Zudem wurden in vivo Beobachtungen durchgeführt. Ein weiterer Ansatzpunkt war die Frage, ob die GFP-markierten Proteine geeignet sind, um Mutanten von *C. reinhardtii* zu analysieren. Weitere an GFP fusionierte Basalapparatproteine konnten in dieser Arbeit nicht in *C. reinhardtii* exprimiert werden. Im Anschluss werden mögliche Ursachen hierfür diskutiert.

4.1 Die GFP-Markierung von SF-Assemblin (SFA) in *C. reinhardtii*

Die C-terminale GFP-Markierung von „striated fiber assemblin“ (SFA) wurde bereits von Lehtreck et al. (2002) beschrieben. Das SFA-GFP Fusionsprotein wurde hierbei in die quergestreiften Mikrotubuli-assoziierten Fasern (SMAFs) eingebaut. Allerdings zeigte sich, dass SFA-GFP im Vergleich zum Wildtypprotein veränderte Eigenschaften aufwies. Das Fusionsprotein war zum Teil löslich, und die Fasern waren instabil bei höheren Temperaturen (Lehtreck et al. 2002). Die Fusion von GFP an ein Protein kann zu veränderten Eigenschaften des Fusionsproteins im Vergleich zum Wildtypprotein führen. Zum Beispiel wurde in *Dictyostelium* gezeigt, dass Actin Filamente, die mehr als 30 % GFP-Actin enthielten, nicht ihre volle Funktion ausüben konnten (Westphal et al., 1997). Ein Grund hierfür könnte die Lage der GFP-Markierung sein, ob also das GFP an den N-Terminus oder den C-Terminus des Proteins fusioniert wurde (Miyawaki et al., 2003). Der Vergleich zwischen N- und C-terminaler GFP-Markierung von SFA wurde in dieser Arbeit untersucht. Um SFA N-terminal mit GFP zu markieren, wurde ein Vektor konstruiert, der die 5'UTR und das erste Intron von *SFA* vor das *CrGFP* geschaltet hatte. Mit diesem Konstrukt, wobei das Startcodon und die beiden folgenden Codons von SFA vor dem GFP lokalisiert waren, konnte GFP-SFA in *C. reinhardtii* exprimiert werden (vgl. 3.1). SFA ist somit das erste cytosolische Protein, welches sowohl mit N- wie auch mit C-terminalem GFP in *C. reinhardtii* exprimiert werden konnte.

Die Expression von GFP-SFA führte, wie auch schon für SFA-GFP beschrieben (Lechtreck et al., 2002), zum Einbau des Fusionsproteins in die SMAFs. Im Gegensatz zu SFA-GFP zeigten die GFP-SFA Fasern aber ähnliche Eigenschaften wie Wildtyp SMAFs. GFP-SFA war unlöslich, und die Polymere waren bei höheren Temperaturen stabil (vgl. 3.1.1 und 3.1.2). Eine mögliche Erklärung, warum eine N-terminale GFP-Markierung weniger die Eigenschaften des Proteins verändert, als eine C-terminale GFP-Markierung, liegt in der Struktur vom GFP. Der C-Terminus des GFPs ist flexibler als der N-Terminus (Miyawaki et al., 2003). Deletionsversuche zeigten, dass der C-Terminus von SFA für die Faserbildung notwendig ist (Lechtreck et al., 2002). Die Fusion vom GFP an den C-Terminus von SFA könnte diese Funktion beeinträchtigen und den C-Terminus deformieren (Lechtreck et al., 2002).

4.1.1 Wie wird die Länge der SMAFs reguliert?

In *C. reinhardtii* sind die zwei- und viersträngigen mikrotubulären Geißelwurzeln mit SMAFs von ungefähr gleicher Länge (ca. 1 μm) assoziiert (Weiss, 1984). Die GFP-SFA Fasern waren ca. zwei bis drei Mal länger als die Wildtypfasern, und zudem waren zwei der vier kreuzförmig angeordneten GFP-SFA Fasern länger und entlang der zweisträngigen mikrotubulären Geißelwurzeln angeordnet. Nach der Mitose von *C. reinhardtii* zeigen die zweisträngigen Geißelwurzeln auch eine stärkere Präferenz für die SMAFs (Lechtreck und Silflow, 1997). Die Funktion der zweisträngigen mikrotubulären Geißelwurzeln ist aber nicht bekannt, und die längeren, mit ihnen assoziierten GFP-SFA Fasern, deuten auf eine - bisher noch ungeklärte - spezielle Funktion der zweisträngigen mikrotubulären Geißelwurzeln hin (Lechtreck et al., 2002).

Die Länge der GFP-SFA Fasern war auch abhängig von der Expressionsstärke des Fusionsproteins. Zudem gelang es, durch Hitzeaktivierung des *HSP70A/RBCS2* Promotors, die durchschnittliche Faserlänge anzuheben (vgl. 3.1.2). Dies ist ein Hinweis darauf, dass die Länge der SMAFs über die Menge an löslichem SFA reguliert werden könnte. Dies scheint aber nicht der einzige Regulationsmechanismus für die Länge der SMAFs zu sein. In vivo liegt SFA überwiegend phosphoryliert vor (Lechtreck und Melkonian, 1991b). Um die Funktion der Phosphorylierung von SFA zu analysieren, wurde das Serin im C-Terminus von SFA-GFP mutiert (Lechtreck et al., 2002). Die Substitution des Serins zu Glutamat imitiert eine Phosphorylierung und erhöhte die Löslichkeit von SFA-GFP. Hingegen führte die Substitution des Serins zu Alanin, wodurch eine Phosphorylierung verhindert wird, zur zusätzlichen Faserbildung, und die Fasern waren

stabil bei höheren Temperaturen. Die Phosphorylierung des Serins am C-Terminus scheint also die Löslichkeit von SFA zu beeinflussen. Dies könnte, neben der SFA Konzentration, ein weiterer Regulationsmechanismus für die Länge und die Anzahl der SMAFs sein (Lehtreck et al., 2002). Der N-Terminus des SFA aus *C. reinhardtii* besitzt ebenfalls mehrere potentielle Phosphorylierungsstellen (Lehtreck und Silflow, 1997), somit könnten auch hier GFP-Analysen Hinweise auf die Funktion dieser Phosphorylierungsstellen geben.

4.1.2 Funktionen der verschiedenen SFA Domänen

Ein Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der Kopfdomäne von SFA in vivo. Versuche, die N-terminale Domäne von C-terminal GFP-markiertem SFA (SFA-GFP) zu verkürzen und in *C. reinhardtii* zu exprimieren, waren nicht erfolgreich (Lehtreck et al., 2002). Da diesen Konstrukten die 5'UTR sowie das erste Intron, welches direkt hinter dem Startcodon lokalisiert ist, des *SFA* Gens fehlten, wurde angenommen, dass diese Elemente wichtig für die Expression von SFA sind. Bereits frühere Arbeiten zeigten, dass Introns Enhancerelemente enthalten können, die die Expression verstärken (Lumbreras et al., 1998). So gibt es z. B. im *ODA6* Gen, das in *C. reinhardtii* für die 70 kDa „dynein intermediate chain“ (IC70) codiert, ein Intron in der 5'UTR, das regulierende Eigenschaften besitzt (Kang und Mitchell, 1998). N-terminale verkürzte GFP-SFA Konstrukte, mit 5'UTR und erstem Intron des *SFA* Gens, konnten erfolgreich in *C. reinhardtii* exprimiert werden (vgl. 3.1.3). Dies war ein Hinweis darauf, dass diese Abschnitte des *SFA* Gens wichtig für die Expression sind.

Gereinigtes rekombinantes SFA kann in vitro quergestreifte Fasern bilden (Lehtreck, 1998). In dieser Untersuchung wurde des Weiteren gezeigt, dass SFA Moleküle, denen die Kopfdomäne deletiert wurde, sich nicht mehr zu quergestreiften Fasern zusammelagern konnten. Die N-terminale Domäne scheint somit wichtig für die Faserbildung der SMAFs in vitro zu sein. Um zu untersuchen, ob die N-terminale Domäne von SFA diese Funktion auch in vivo übernimmt, wurden zwei verschiedene N-terminal verkürzte GFP-SFA Konstrukte in *C. reinhardtii* exprimiert. Die Deletion von 10 Aminosäuren der Kopfdomäne von GFP-SFA erhöhte die Löslichkeit des Fusionsproteins und führte zu kürzeren Fasern. Die Deletion von 29 Aminosäuren erhöhte die Löslichkeit des Fusionsproteins weiter, und es wurden nur sehr kurze Fasern detektiert (vgl. 3.1.3).

Auch die früheren *in vitro* Versuche zeigten einen Unterschied in der Faserbildung, abhängig von der Anzahl der Aminosäuren, um die der N-Terminus von SFA verkürzt wurde (Lehtreck, 1998). Eine Verkürzung von 19 oder 29 Aminosäuren führte dazu, dass die SFA-Moleküle keine quergestreiften Fasern mehr bilden konnten. Moleküle mit einer Deletion von 10 Aminosäuren konnten *in vitro* noch Fasern bilden. Allerdings waren diese im Vergleich zu Fasern, die aus nicht verkürzten SFA-Molekülen gebildet wurden, ungeordneter (Lehtreck, 1998). Die GFP-SFA Fasern der Zellen, die die N-terminalen Deletionskonstrukte exprimierten, waren ähnlich lang wie die SMAFs, die durch Antikörperfärbungen in Kontrollzellen beobachtet wurden. Es ist anzunehmen, dass N-terminal verkürztes GFP-SFA mit dem Wildtypprotein co-polymerisiert oder aber an die SMAFs, die durch Wildtyp-SFA gebildet werden, bindet. *In vitro* Studien stützen diese Annahme. Mischte man SFA mit deletierter Kopfdomäne mit SFA-Fasern aus vollständigen SFA-Molekülen, assoziierten sie mit den Fasern im Verhältnis 1:1 (Lehtreck, 1998). Die Länge der Fasern wird also durch die Menge an Wildtyp-SFA bestimmt (vgl. auch 4.1.1) und die verkürzten GFP-SFA Moleküle sind alleine nicht kompetent zur Faserbildung. Eine direkte Überprüfung dieser Idee ist, da SFA Mutanten nicht bekannt sind, zurzeit nicht möglich. Zusammengefasst zeigen die Versuche, dass die Kopfdomäne von SFA *in vivo* für die Faserbildung notwendig ist.

Neben der N-terminalen Domäne von SFA, scheint auch die C-terminale Domäne wichtig für die Bildung der SMAFs zu sein, denn die Verkürzung des C-Terminus von SFA mit einer C-terminalen GFP-Markierung resultierte in einer erhöhten Löslichkeit des Proteins und eine Polymerisation unterblieb (Lehtreck et al., 2002). Die C-terminale Domäne wurde auch beim GFP-SFA Konstrukt deletiert. Diese Zellen zeigten ebenfalls eine deutlich verminderte Fähigkeit Fasern zu bilden (nicht gezeigt). Die Kopf- und die Schwanzdomäne von SFA sind also für die Polymerisierung notwendig und sind offensichtliche Angriffspunkte für regulierende Prozesse wie Phosphorylierung (vgl. 4.1.1).

Es wurde gezeigt, dass die GFP-Markierung von SFA eine geeignete Methode ist, um die Eigenschaften der verschiedenen Domänen von SFA zu untersuchen. Auch die Funktion der α -helicalen Stabdomäne von SFA könnte durch die GFP-Technik *in vivo* untersucht werden. Die α -helikale Stabdomäne von SFA besteht aus Wiederholungen von einer Sequenz aus 28 Aminosäuren, die jeweils durch eine Aminosäure voneinander getrennt werden (Weber et al., 1993). Die Länge und Struktur der Stabdomäne ist

innerhalb der Grünalgen, bei *G. lamblia* und in verschiedenen Apikomplexa sehr gut konserviert (ca. 250 Aminosäuren lang; Lechtreck, 2003). Es stellt sich nun die Frage, inwieweit diese konservierte Struktur der Stabdomäne wichtig für die Funktion der SMAFs in vivo ist. SMAFs sind aus 2-nm Protofilamenten aufgebaut und zeigen eine Querstreifung mit einer Periode von ca. 30 nm. (Lechtreck und Melkonian, 1998). Die Länge des 29 Aminosäure-Segementes (4 nm) in der Stabdomäne von SFA hat eine ähnlich lange Periode wie die Mikrotubuli. Somit könnte eine definierte Querstreifungsperiode verantwortlich für die Assoziation mit den Mikrotubuli sein (Lechtreck und Melkonian, 1998). In vitro Untersuchungen zeigten, dass sich die Querstreifungsperiode der SMAFs ändert, wenn man Deletionen oder Insertionen in die Stabdomäne einführte (Lechtreck, 1998). Die Einführung solcher Veränderungen in genomische DNA ist allerdings sehr aufwendig. Aus diesem Grund wurden in dieser Arbeit erste Versuche unternommen, die cDNA von SFA mit GFP zu markieren und zu exprimieren. Aber weder eine Klonierung der SFA cDNA in den pNCrGFP Vektor noch in einen cDNA Expressionsvektor (vgl. Einleitung; Fischer und Rochaix, 2001) führten bisher zum gewünschten Erfolg. Hierzu müssten noch weitere Untersuchungen folgen.

4.1.3 GFP-SFA ist ein Marker für die mikrotubulären Geißelwurzeln

Die vier kreuzförmig angeordneten mikrotubulären Geißelwurzeln sind mit den Basalkörpern von *C. reinhardtii* assoziiert (Ringo, 1967). Das α -Tubulin der mikrotubulären Geißelwurzeln ist acetyliert. Diese posttranslationale Modifikation stabilisiert – vermutlich indirekt - die Mikrotubuli (Andersen et al., 1991). Die mikrotubulären Geißelwurzeln sollen an der Positionierung von Organellen in der Zelle und an der Cytokinese beteiligt sein (Dutcher, 2003). Tritt die Zelle in die Mitose ein, verkürzen sich die zwei-strängigen Geißelwurzeln. Die viersträngigen Geißelwurzeln hingegen bilden einen Bogen über der sich formierenden Mitosespindel (Gaffal und el-Gammal, 1990). Dabei sollen sie die Funktion von Astral-Mikrotubuli übernehmen und Actin, welches an der Cytokinese beteiligt ist, organisieren. Somit sind die mikrotubulären Geißelwurzeln auch in die Positionierung der Teilungsfurche involviert (Ehler et al., 1995).

Die GFP-SFA Fasern sind, wie auch die SMAFs, mit den mikrotubulären Geißelwurzeln assoziiert. Da sie stets die stereotype kreuzförmige Anordnung zeigten, sollte GFP-SFA ein geeigneter Marker für die Untersuchung des mikrotubulären Geißelwurzelsystems sein. Dies wurde durch die Transformation von *GFP::SFA* in verschiedene Motilitätsmutanten von *C. reinhardtii* untersucht.

Mehrere *C. reinhardtii* Mutanten, die eine Störung im Geißelwurzelsystem aufweisen, sind in der Literatur beschrieben, dazu gehören z. B. die *uni3-1* und die *bald2-1* Mutante. Das Gen *UNI3* codiert für δ -Tubulin und einige Zellen, die eine Mutation in dem Gen tragen, zeigen, neben den bereits beschriebenen Defekten (vgl. 3.1.6), auch Fehler im Aufbau des kreuzförmigen mikrotubulären Geißelwurzelsystems (O'Toole et al., 2003; Dutcher, 2003). Dieser Defekt ist vermutlich verantwortlich für die fehlerhafte Positionierung der Teilungsfurche in einigen *uni3-1* Zellen (s. o.; Dutcher und Trabuco, 1998; O'Toole et al., 2003). Die Transformation von *GFP::SFA* in *uni3-1* Zellen zeigte, dass die Zellen überwiegend vier kreuzförmig angeordnete GFP-SFA Fasern bildeten. Allerdings war bei einigen, vornehmlich eingeißlige Zellen, eine abweichende Anordnung und Anzahl von GFP-SFA Fasern zu sehen.

Fehler in der Positionierung der mikrotubulären Geißelwurzeln wurden auch für Stämme beschrieben, denen die distale Verbindungsfibrille (dVF) fehlt oder in denen sie defekt ist. Dazu gehören *C. reinhardtii* Mutanten mit variabler Geißelanzahl (vfl). Der Centrin Mutante *vfl2* fehlt u. a. die dVF und die proximale Verbindungsfibrille (Kuchka und Jarvik, 1982; Wright et al., 1989; Jarvik und Suhan, 1991). Da die mikrotubulären Geißelwurzeln unterhalb der dVF entstehen, könnten die Defekte in der dVF der Grund für die Fehlverteilungen sein (O'Toole et al., 2003).

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass in *C. reinhardtii* Zellen, in denen der Centringehalt reduziert ist, das GFP-SFA System erhebliche Abweichungen zur typischen kreuzförmigen Anordnung der quergestreiften Mikrotubuli-assoziierten Fasern (SMAFs) aufweist, und zwar unabhängig davon, ob die Centrinmenge durch RNAi reduziert wurde (Koblenz et al., 2003) oder eine Mutation im Centrin Gen vorliegt (s. o.). In beiden Fällen war das GFP-SFA Fasensystem zu über 50 % defekt (vgl. Tab. 11). Centrin-RNAi- und *vfl2* Zellen haben oft eine vom Wildtyp abweichende Anzahl von Basalkörpern oder keine Basalkörper. Zellen ohne Basalkörper konnten zum Teil GFP-SFA Fasern bilden. Dies ist ein Hinweis darauf, dass GFP-SFA spontan Fasern bildet bzw. die GFP-SFA Fasern keine Basalkörper zur Bildung brauchen. Des Weiteren waren in Zellen mit Basalkörpern, alle Basalkörper mit GFP-SFA Fasern assoziiert. Offensichtlich sind Basalkörper der bevorzugte Bildungsort für GFP-SFA Fasern. In *vfl2*- und Centrin-RNAi Zellen mit zwei Basalkörpern war das GFP-SFA System zu 40 - 50 % defekt (vgl. Tab. 11). Das bedeutet, dass zwei Basalkörper alleine nicht ausreichend für die korrekte Ausbildung der kreuzförmig angeordneten SMAFs sind. Zusätzlich benötigt die Zelle

also noch weitere Strukturen, um die SMAFs korrekt positionieren zu können, wie z. B. die dVF (s. o.). Diese fehlten aber in den beiden untersuchten Centrinmangel Stämmen. Zusammengefasst ist also neben den Basalkörpern auch die Centrinmenge für die korrekte Orientierung und Anzahl der SMAFs wichtig.

Welche Funktion könnte Centrin aber nun bei der Organisation der SMAFs übernehmen? Einen möglichen, allerdings sehr spekulativen, Hinweis bietet der bereits beschriebene SFA-GFP Stamm, mit einer Serin zu Alanin Substitution am C-Terminus von SFA (vgl. 4.1.1). Dieser Stamm zeigte, wie die Centrinmangel Stämme, zusätzliche GFP-SFA Fasern. Das Centrin Homolog aus Hefe, Cdc31p, kontrolliert die Proteinkinase Kic1p (Ivanovska und Rose, 2001). Es wäre also vielleicht möglich, dass Centrin über einen Kinase Signalweg die Polymerisierung von SFA beeinflusst.

	GFP-SFA/CentrinRNAi C11	Vfl2/GFP-SFA D12
Defektes SFA-System	52,7%	57,3%
Defektes SFA-System in Zellen mit 2 Basalkörpern	41,2%	54,8%

Tab. 11: Vergleich der Stämme GFP-SFA/CentrinRNAi und vfl2/GFP-SFA

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass GFP-SFA ein geeigneter Marker für die Analyse der mikrotubulären Geißelwurzeln in *C. reinhardtii* ist. Der Basalapparat, als MTOC, organisiert die definierte Anzahl von Mikrotubuli in einer stereotypen Anordnung. GFP-SFA bietet eine neue Möglichkeit, Komponenten, die an der Organisation der Mikrotubuli sowie an der korrekten Funktion des Basalapparates beteiligt sind, zu identifizieren. Man könnte zum Beispiel den Stamm GFP-SFA D5 mittels Insertionsmutagenese (Tam und Lefebvre, 1993) mutieren. Die GFP-Markierung von SFA bietet dann den Vorteil, dass Mutanten schnell, ohne zeitaufwändige Färbung, erkannt werden können.

4.1.4 Die Dynamik der SMAFs

Die GFP-Technik wird oft für die Untersuchung von dynamischen Vorgängen in der Zelle angewendet. Mit Hilfe eines konfokalen Laserscanning Mikroskopes kann man mit hoher Laserintensität eine Region aus einer GFP-markierten Struktur bleichen

(„Photobleaching“). Anschließend wird über einen bestimmten Zeitraum die Regeneration der GFP-Fluoreszenz in der gebleichten Region beobachtet, die dadurch verursacht werden kann, dass sich GFP markierte Moleküle durch Diffusion, Transportprozesse oder durch Bindung in die gebleichte Region hineinbewegen (Lippincott-Schwartz et al., 2003).

Um erste Einblicke in die Dynamik von GFP-SFA Fasern zu erhalten, wurden Regionen der GFP-SFA Fasern ausgebleicht. Über einen Zeitraum von 45 Minuten blieb die gebleichte Region in der GFP-SFA Faser an der gleichen Stelle und veränderte sich in ihrer Intensität nur unwesentlich. Diese Daten zeigen, dass die GFP-SFA Fasern keinen raschen Umsatz der Untereinheiten aufweisen, und dass keine schnelle Bewegung (z. B. eine Verschiebung der Protofilamente und „treadmilling“) innerhalb der Faser stattfindet. Eine geringe Dynamik der SMAFs wäre gut vereinbar mit ihrer mechanischen und biochemischen Stabilität, welche während der Isolierung von SMAFs beobachtet wurde (Lehtreck und Melkonian, 1991b).

Für Intermediärfilamente, die aus fibrillären Proteinen aufgebaut sind, wurde bisher angenommen, dass sie aufgrund ihrer stabilisierenden Funktionen in tierischen Zellen, relativ statische Strukturen des Cytoskeletts sind (Yoon et al., 2001; Yoon et al., 2002). Durch FRAP („fluoreszenz recovery after photobleaching“) wurde aber nachgewiesen, dass Tonofibrillen, die aus Keratin-Intermediärfilamenten bestehen, in Epithelzellen dynamische Eigenschaften aufweisen (Yoon et al., 2001). Nach dem Bleichen einer Zone aus GFP-markierten Keratin-Tonofibrillen, konnte allerdings erst nach zwei bis drei Stunden die GFP-Fluoreszenz wieder beobachtet werden. (Yoon et al., 2001).

Die GFP-SFA Fasern wurden nach dem Bleichen längstens über einen Zeitraum von 45 Minuten beobachtet. Für längere Beobachtungszeiten müssten die Bedingungen für *C. reinhardtii* optimiert werden, um Bewegungen der Zelle oder auch Schädigungen durch Strahlungen zu vermeiden. Trotz der Immobilisierung, bewegten sich die Zellen noch. Dies könnte zum einen eine Folge der durch das Mikroskop erzeugten Wärme gewesen sein. Ein andere Ursache könnten noch vorhandene Geißelbewegungen der Zellen gewesen sein. Solche Bewegungen der Zelle können verhindert werden, indem man das GFP-SFA in *pf* (paralyzed flagellar) Mutanten transformiert. Diese Mutanten haben paralyisierte Geißeln und können nicht mehr schwimmen. Solche Transformanten wurden bereits hergestellt, und sie exprimierten auch das GFP-SFA Konstrukt. Allerdings wurde bisher noch keine Mutante gefunden, die genügend lange GFP-SFA hatte, um eine geeignete Region bleichen zu können. Zukünftige Analysen stehen also noch aus.

4.2 Die GFP-Markierung von Centrin in *Chlamydomonas reinhardtii*

In einer früheren Arbeit über die C-terminale GFP-Markierung von Centrin in *C. reinhardtii*, konnte Centrin-GFP in der distalen Verbindungsfibrille (dVF), der sternförmigen Struktur der Übergangsregion und den NBBCs nachgewiesen werden (Ruiz-Binder et al., 2002). In den Basalkörpern war Centrin-GFP jedoch unterrepräsentiert, und in den Centrin-haltigen Fasern um den Zellkern (Fimbriae) war Centrin-GFP nicht lokalisiert. Das Centrin-GFP Konstrukt von Ruiz-Binder et al. (2002) stand unter der Kontrolle des *RBCS2* Promotors (Goldschmidt-Clermont und Rahire, 1986), und nur 25 - 50 % der Zellen eines Centrin-GFP Stammes zeigten Centrin-GFP Signale.

In dieser Arbeit wurde Centrin-GFP unter der Kontrolle des starken, konstitutiven *HSP70A/RBCS2* Promotors (Schroda et al., 2000) exprimiert. Dies führte dazu, dass 100 % der Zellen ein Centrin-GFP Signal aufwiesen. Die Wahl des Promotors ist in *C. reinhardtii* also wichtig für eine starke Expression von eingeführten endogenen und exogenen Genen (vgl. Einleitung; Kozminski et al., 1993b; Schroda et al., 2000). Die Expression des Centrin-GFP Fusionsproteins war in den verschiedenen Stämmen, die in dieser Arbeit untersucht wurden, unterschiedlich stark. Durch Southern-Blot Analysen konnte aber gezeigt werden, dass die unterschiedlichen Expressionsstärken nicht auf die Gen dosis, also durch mehrfache Insertion des Centrin-GFP Konstruktes, zurückzuführen war, sondern eher der Ort der Integration eine Rolle für die Stärke der Expression spielen könnte. Dies könnten Orte im Chromatin sein, die unterschiedlich oft transkribiert werden (Cerutti et al., 1997a).

Die verschiedenen Expressionsstärken von Centrin-GFP führten zu einer unterschiedlichen Lokalisation von Centrin-GFP. Bei einer schwächeren oder moderaten Expression konnte Centrin-GFP in der dVF, den NBBCs und in deren Verzweigungen um den Zellkern herum (Fimbriae) nachgewiesen werden. In den Basalkörpern war Centrin-GFP hingegen unterrepräsentiert. Diese Expression war also ähnlich wie bereits von Ruiz-Binder et al. (2002) beschrieben. In Stämmen, die Centrin-GFP stark exprimierten, konnte das Fusionsprotein in der dVF und in Aggregaten an der Oberfläche des Zellkerns nachgewiesen werden. Die Überexpression von Centrin-GFP hatte auch Auswirkungen auf das Wildtyp-Centrinsystem: die NBBCs und die Fimbriae waren defekt.

Fehlerhafte Lokalisation und Aggregatbildung durch die Überexpression eines GFP-Fusionsproteins wurde bereits von Lisenbee et al. (2003) beschrieben. Sie markierten ein Peptid mit GFP, dass die Membran-Zielsequenz der peroxisomale Ascorbat Peroxi-

dase (APX) enthielt. Durch eine transiente Expression von GFP-APX konnte GFP-APX in den Membranen der Peroxisomen und im peroxisomalen Endoplasmatischen Reticulum nachgewiesen werden. Die Überexpression von GFP-APX führte zur Aggregation von Organellen, die vermutlich auf eine Dimerisierung des GFPs zurückgeführt werden kann (Lisenbee et al., 2003). Die GFP Aggregate, die in *C. reinhardtii* durch Überexpression von Centrin-GFP entstanden waren, könnten ebenfalls auf Dimerisierung von GFP-Molekülen beruhen. GFP hat bei einer Konzentration von 100 μM die Tendenz Dimere zu bilden (Phillips, 1997), und diese Konzentration könnte in den NBBCs bei starker Expression von Centrin-GFP erreicht werden.

Der Unterschied zwischen Stämmen, die Centrin-GFP moderat exprimieren und Stämmen, die Centrin-GFP überexprimieren, könnte zudem auf dem reduzierten Wildtyp-Centringehalt oder auf dem Verhältnis von Wildtyp-Centrin zu Centrin-GFP beruhen. Bei moderater Expression von Centrin-GFP kann der Aufbau von Centrin-haltigen Fasern stattfinden, da genug Wildtypprotein vorhanden ist und der GFP-Anteil nicht so hoch ist, um den Aufbau behindern zu können. Bei starker Expression ist dann der Aufbau durch den hohen Anteil an GFP nicht mehr gewährleistet und führt zu den Defekten in den NBBCs. Ein Grund dafür wäre die bereits beschriebene Dimerisierung von GFP (s.o.). Ein weiterer Grund könnte sein, das GFP durch seine Größe den Aufbau der NBBCs sterisch behindern könnte. Solche Vermutungen wurden auch aufgrund der Ergebnisse von N- oder C-terminalen GFP-Markierung des „cauliflower mosaic virus movement protein“ (CaM MP) angestellt. Die Expression von GFP-MP führte zur Bildung von fluoreszierenden Aggregaten im Cytoplasma. Diese Aggregatbildung konnte aber behoben werden, indem die Wildtypmenge an MP gesteigert wurde. Durch die gemeinsame Expression von MP und GFP-MP konnten der geordnete Aufbau der MP-Kanäle beobachtet werden (Thomas und Maule, 2000). Das Verhältnis zwischen markiertem und unmarkiertem Protein ist also wichtig und könnte auch die Beobachtungen in dieser Arbeit erklären.

Wie bereits für die GFP-Markierung von SFA beschrieben wurde, können abweichende Eigenschaften bzw. Lokalisationen eines GFP-Fusionsproteins auch durch die Veränderung der Lage des GFPs beseitigt werden (vgl. 4.1). So zeigte die N-terminale GFP Markierung von Centrin in menschlichen Zellen keine Veränderungen von Strukturen aufgrund der GFP-Centrin Expression (Piel et al., 2000). In der vorliegenden Arbeit wurden zwei unterschiedliche GFP-Fusionen am N-Terminus von Centrin vorgenom-

men und in *C. reinhardtii* transformiert. Zum einen wurde das Centrin Gen in den Vektor pNCrGFP kloniert, so dass vor dem *GFP::Centrin* Konstrukt die 5'UTR und das 1. Intron des *SFA* Gens lokalisiert war. Zum anderen wurde die *SFA* 5'UTR durch die 5'UTR des Centrin Gens ausgetauscht. Nach der Transformation dieser Konstrukte konnten aber weder in der Fluoreszenz noch in Western-Blot Analysen positive Klone detektiert werden. Der N-terminalen Domäne von Centrin wird eine Rolle für Centrin-Centrin Interaktionen zugesprochen (vgl. 4.2.1; Wiech et al., 1996). Somit könnte eine N-terminale GFP-Markierung eine solche Funktion der Kopfdomäne beeinträchtigen.

Eine Deletionsmutante von CdC31p, dem Centrin Homolog aus Hefe, konnte nicht durch N- und C-terminal Protein-A-markiertes CdC31p komplementiert werden (Kilmartin, 2003). Es wurde auch mehrfach beschrieben, dass GFP-Fusionsproteine mit dem Wildtypprotein co-lokalisieren, aber entsprechende Mutanten mit dem Fusionsprotein nicht komplementiert werden konnten (Carminati und Stearns, 1997; Kimbel et al., 2000). Da auch die *vfl2* Mutante nicht durch Centrin-GFP komplementiert werden konnte (vgl. 3.2.6) und auch keine Centrin-GFP Fasern in den transformierten *vfl2* Zellen nachgewiesen wurden, deutet dies darauf hin, dass Centrin-GFP abweichende Eigenschaften zu Wildtyp-Centrin aufweist und eventuell nicht funktional ist.

4.2.1 Der Aufbau von Centrin-haltigen Strukturen des Basalapparates

In Abhängigkeit von der Centrin- und der Calciumkonzentration kann Centrin in vitro aggregieren (Wiech et al., 1996; Koblenz, 2001). Die Kopfdomäne von Centrin soll an Centrin-Centrin Interaktionen beteiligt sein (Wiech et al., 1996). Die Inkubation von Centrin aus *Scherffelia dubia* (Prasinophyceae) mit einem Peptid, das der N-terminalen Domäne von Centrin entspricht, führte zur 65 %igen Reduzierung der Centrin Polymerisierung. Basierend auf diesen Ergebnissen postulierten Wiech et al. (1996) ein Modell für die Centrifilamentbildung in Algen. Die N-terminale Domäne des einen Centrinmoleküls interagiert dabei mit einer potentiellen Bindedomäne eines anderen Centrinmoleküls, wodurch lange Centrifilamente gebildet werden könnten. (Wiech et al., 1996). Die Beobachtung in dieser Arbeit, dass die GFP-markierte Kopfdomäne von Centrin alleine nicht in der Lage ist, an das Centrin-haltige Cytoskelett zu binden (vgl. 3.2.5), ist ein Anhaltspunkte darauf, dass weitere Komponenten am Aufbau Centrin-haltiger Strukturen in vivo beteiligt sein müssen. Da Centrin ein Phosphoprotein ist (Huang et al., 1988), könnte die Phosphorylierung von Centrin die Faserbildung beeinflussen. In *Sacharomyces cerevisiae* wurde das Centrin-bindende Protein Sfi1p entdeckt,

welches 17 konservierte Centrin-bindende Motive enthält (Kilmartin, 2003). Durch die Interaktion von Centrin mit solchen Proteinen könnten Centrin-haltige Fasern entstehen (Kilmartin, 2003; Salisbury, 2004). Durch Genomanalyse konnte ein zu Sfi1p homologes Protein, mit ca. 40 Centrin-bindenden Motiven, in *C. reinhardtii* identifiziert werden (Lechtreck, unveröffentlicht).

Unabhängig davon ob Centrin-haltige Fasern homo- oder heteropolymere Strukturen sind, konnte eine geringe Menge Centrin-GFP an die Centrin-haltigen Strukturen binden. Im Gegensatz zu den NBBCs und den Fimbriae, zeigte die distale Verbindungsfibrille (dVF) bei moderater und starker Expression eine gleich bleibende starke GFP-Markierung. Die Bindung oder der Einbau von Centrin-GFP an die dVF beeinträchtigte auch nicht den Abstand der Basalkörper. Auf die NBBCs und die Fimbriae wirkte die Überexpression von Centrin-GFP aber störend (vgl. 4.2). Um Einblicke in den Einbau von Centrin-GFP in die Centrin-haltigen Strukturen zu bekommen, wurde das Centrin-GFP Konstrukt unter die Kontrolle des induzierbaren Promotors *NITI* (Zhang et al., 1997) gebracht (vgl. 3.2.8). Die dVF zeigte erst spät nach Induktion von Centrin-GFP die gewohnte starke GFP-Markierung, während die NBBCs schon kurz nach der Induktion mit GFP markiert waren. Der Umsatz von Centrin scheint in der dVF und den NBBCs also unterschiedlich zu sein. Die dVF besitzt anscheinend eine hohe Affinität für Centrin und dadurch ist der Umsatz an Centrin-GFP geringer. Hingegen scheinen die NBBCs einen höheren Umsatz von Centrin-GFP aufzuweisen. Im Vergleich zu den NBBCs, scheint die dVF größere Mengen an Centrin-GFP zu tolerieren, was auch auf unterschiedliche Bindungseigenschaften der beiden Basalapparatstrukturen für Centrin hindeutet. Die NBBCs und die dVF könnten somit unterschiedliche molekulare Strukturen aufweisen und zwei verschiedene Typen von Centrin-haltigen Fasern sein.

Wie kommt es aber nun zu den Defekten in den NBBCs und den Fimbriae durch die Überexpression von Centrin-GFP? Die GFP-Aggregate in stark exprimierender Centrin-GFP Zellen waren entweder an den distalen Enden von oft verkürzten NBBCs (Abb. 26A, c-e) oder am Zellkern lokalisiert. Im letzten Fall waren keine Centrin-haltigen NBBCs mehr nachzuweisen (Abb. 26A, e-f). Auch bei den Centrin-GFP Induktionsversuchen wurden kleine Aggregate an den distalen Enden der NBBCs beobachtet. Nach der Induktion des *NITI* Promotors wurde Centrin-GFP zunächst in den proximalen Teilen der NBBCs lokalisiert. Später waren auch die distalen Enden der NBBCs dekoriert (vgl. 3.2.8).

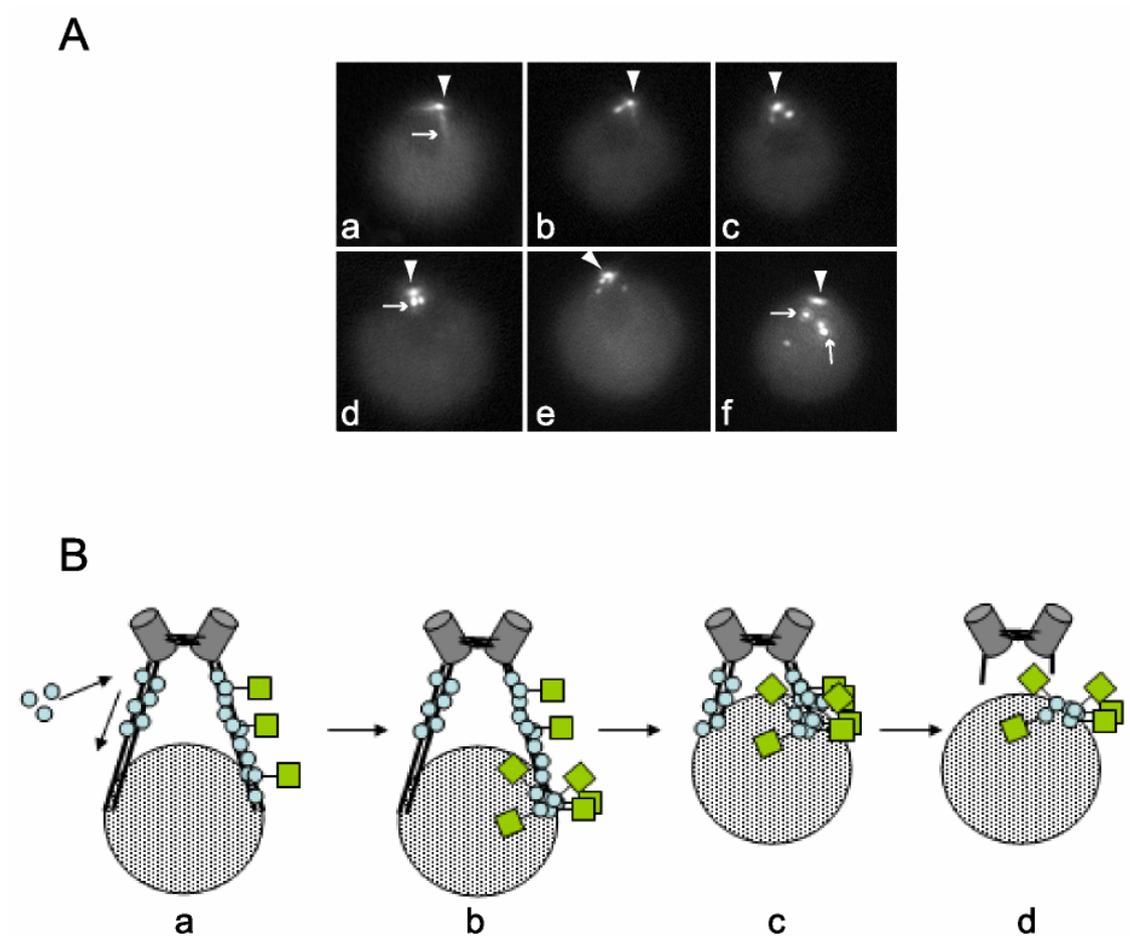


Abb. 26: Modell zur Destabilisierung der NBBCs in Centrin-GFP 8 Zellen

A: Einzelne Fluoreszenzaufnahmen von unterschiedlich stark exprimierenden Centrin-GFP Stämmen. Pfeilspitze: Centrin-GFP in der distalen Verbindungsfibrille. Bei moderater Centrin-GFP Expression werden die NBBCs markiert (Pfeil in a). Bei stärkerer Expression (b-f) können sich die NBBCs verkürzen (b) und zeigen GFP-Aggregate an ihren distalen Enden (c, Pfeil in d). Die starke Aggregation an den Enden der NBBCs verursacht eine Destabilisierung der NBBCs und die Aggregate lokalisieren auf der Kernoberfläche (e, Pfeile in f).

B: Der Einbau von Centrin in die NBBCs erfolgt von proximal nach distal. Geringe Mengen von Centrin-GFP tolerieren die NBBCs und stören den Aufbau nicht (a). Höhere Konzentrationen führen zur Aggregation von Centrin-GFP an den Ansatzstellen der NBBCs am Zellkern (b). Es kommt zur Aggregation von Centrin und Centrin-GFP und eventuell auch anderen NBBC-Partikeln; dadurch verkürzen sich die NBBCs (c). Die zunehmende Aggregation von Centrin-GFP an den distalen Enden der NBBCs destabilisiert die Verbindung zwischen Zellkern und Basalapparat und die Aggregate verbleiben an der Kernoberfläche (d).

Aufgrund dieser Beobachtungen, könnte man den Aufbau der NBBCs und die Verteilung des Fusionsproteins in Centrin-GFP 8 Zellen folgendermaßen erklären (vgl. Abb. 26B). Die Centrinmoleküle, werden von proximal nach distal in die NBBCs eingebaut, was eine gewisse Dynamik der NBBCs voraussetzt (Abb. 26B, a). Vom distalen Ende der NBBCs gelangen die Centrinmoleküle weiter über die Ansatzstellen am Zellkern in die Fimbriae. Bei nur geringer Konzentration von Centrin-GFP, kann das Fusionsprotein an die Centrin-haltigen Fasern binden oder mit ihnen polymerisieren, ohne sie zu beeinträchtigen. Hohe Konzentrationen von Centrin GFP stören allerdings diesen Aufbau (vgl. 4.2). Die Centrin-GFP Moleküle werden ebenfalls proximal in die NBBCs integriert und akkumulieren distal an den Ansatzstellen der NBBCs am Zellkern (Abb. 26B, b). An dieser Stelle scheinen sie nicht weiter in die Fimbriae gelangen zu können. Vielleicht ist dieser Ansatzpunkt besonders sensitiv gegen große Mengen an Centrin-GFP. Die Aggregation könnte durch Interaktionen zwischen Centrin und Centrin-GFP, und eventuell weiterem NBBC-Material, zustande kommen. Durch diese Interaktionen könnten sich die NBBCs verkürzen (Abb. 26B, c). Bei starker Aggregation, könnten diese Aggregate die NBBCs soweit destabilisieren, dass sie sich auflösen (Abb. 26B, d). Die Aggregate an der Oberfläche des Zellkerns würden somit die akkumulierten NBBC Reste sein. Die postulierte Dynamik der Centrin-haltigen Fasern in den NBBCs könnte man durch „Photobleaching“ Experimente, wie sie bereits für GFP-SFA durchgeführt wurden, untersuchen.

Über eine Funktion der C-terminalen Domäne für die Bindung an Centrin-haltige Fasern kann aufgrund der Ergebnisse dieser Arbeit nur spekuliert werden, da das Centrin-GFP wahrscheinlich nicht funktional war (vgl. 4.2). Trotzdem waren bei der Überexpression der verschiedenen C-terminal modifizierten Konstrukte, Unterschiede in der Anzahl der GFP-Aggregate am Kern zu beobachten (vgl. 3.2.4). In Stämmen, in denen das C-terminale Serin von Centrin-GFP mit Alanin ersetzt war (Verhinderung einer Phosphorylierung), waren mehr GFP-Aggregate am Kern zu sehen, als bei unverändertem Centrin-GFP. Der Austausch der Serins zu Glutamat (Imitation einer Phosphorylierung) aber, führte zu ähnlich vielen GFP-Aggregaten wie bei unverändertem Centrin-GFP. Dies wäre ein Hinweis darauf, dass vielleicht eine Phosphorylierung von Centrin der Aggregation von Centrin-GFP entgegenwirken könnte. Dies würde allerdings voraussetzen, dass Centrin-GFP eine konstitutiv hohe Phosphorylierung aufweist. Über die Funktion der Phosphorylierung von Centrin in *C. reinhardtii* ist allerdings wenig be-

kannt. Wie lässt sich nun aber erklären, dass in Centrin-GFP Stämmen mit deletierter C-terminaler Domäne, weniger Aggregate zu beobachten waren, und die Stabilität der NBBCs höher war? Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass die C-terminale Domäne von Centrin an Centrin-Centrin Interaktionen beteiligt ist. Wenn diese Domäne deletiert wird, könnten die postulierten Interaktionen zwischen Centrin und Centrin-GFP, die eventuell zur Aggregation führten (s. o.), geringer sein und somit kann das Wildtyp-Centrin besser an die Centrin-haltigen Strukturen, z. B. die Fimbriae, binden. Dass die C-terminale Domäne von Centrin mit anderen Proteinen interagieren kann, wurde in Hefe gezeigt (Ivanovska und Rose, 2001).

4.2.2 Die Funktion der NBBCs

Die Verbindung der Basalkörper mit dem Kern wird durch die „nucleus-basal body connectors“ (NBBCs) gewährleistet (Wright et al., 1985). Die NBBCs können abhängig von der Ca^{2+} -Konzentration kontrahieren, was zuerst für die System-II-Fibrillen (Rhoplast) von *Tetraselmis striata* gezeigt wurde (Salisbury et al., 1984). Ob Phosphorylierung und Dephosphorylierung von Centrin für die Kontraktion der Centrin-haltigen NBBCs eine Rolle spielt, ist noch umstritten (Martindale und Salisbury, 1990).

In vivo Beobachtungen von Centrin-GFP Zellen zeigten, dass die NBBCs flexibel sind. Durch die Geißelbewegungen wurden die NBBCs gebogen und die Basalkörper veränderten ihre Position in Bezug auf die NBBCs (vgl. 3.2.7). Diese Bewegungen wiesen auf eine flexible Verbindung zwischen den NBBCs und den Basalkörpern hin. Diese Eigenschaften würden verschiedene Funktionen, die für die Kontraktion der NBBCs postuliert wurden, unterstützen. Dazu gehören z. B. die Initiation und/oder die Koordination des Geißelschlages oder das Abfangen von Kräften, die durch die Geißelbewegung auf die Zelle übertragen werden (Lehtreck und Melkonian, 1991a).

Das Studium der *C. reinhardtii* Centrin Mutante *vfl2*, die keine Centrin-haltigen NBBCs mehr hat, zeigte Defekte in der Basalkörperverteilung. Deswegen wird vermutet, dass die NBBCs an der korrekten Lokalisation und der Verteilung der Basalkörper während der Mitose beteiligt sind (Wright et al., 1989; Taillon et al., 1992).

Die Überexpression von Centrin-GFP im Stamm Centrin-GFP 8 führte zum Verlust der Centrin-haltigen NBBCs. Zudem war in Centrin-GFP 8 Zellen zu 30 % die Verbindung zwischen Basalkörper und Kern destabilisiert. Dies wurde auch für *vfl2* Zellen gezeigt, die nach der Behandlung mit Detergens zu 40 % keine Verbindung zwischen Zellkern

und Basalapparat mehr aufwiesen (Wright et al., 1985). Im Vergleich zu *vfl2* Zellen, wurden bei Centrin-GFP 8 Zellen aber keine Fehler in der Verteilung der Basalkörper beobachtet. Dies weist darauf hin, dass die NBBCs für den Erhalt der konstanten Basalkörperanzahl nicht essentiell sind. Im Unterschied zur *vfl2* Mutante, sind die distale- und die proximale Verbindungsfibrille in Centrin-GFP 8 Zellen nicht defekt. Die Mutanten *vfl1* und *vfl3* haben, wie auch *vfl2*, abweichende Basalkörper- und Geißelanzahlen. Während die NBBCs in *vfl1*- und *vfl3* Zellen aber intakt sind, besitzen sie Defekte in den distalen und proximalen Verbindungsfibrillen (Wright et al., 1983; Wright et al., 1989). Möglicherweise sind also die Verbindungsfibrillen der Basalkörper, und nicht die NBBCs, für die korrekte Verteilung und Lokalisation der Basalkörper essentiell.

In Wildtypzellen von *C. reinhardtii* sind die Basalkörper während der Mitose an den Spindelpolen lokalisiert. In Centrin-GFP 8 Zellen sind die Basalkörper in der Nähe der Spindelpole lokalisiert (vgl. 3.2.3). Die NBBCs könnten somit in *C. reinhardtii* eine Funktion bei der Bindung der Basalkörper an die Spindelpole haben, während sie für die Verteilung der Basalkörper nicht essentiell sind. Diese Behauptung wird auch durch Beobachtungen bei verwandten Grünalgen unterstützt. *Polytomella parva* hat keine NBBCs, und die Basalkörper werden korrekt verteilt (Schulze et al., 1987). Bei *Dunaliella bioculata* besteht keine Centrinverbindung zwischen den Basalkörpern und den Spindelpolen, und die Basalkörper sind während der Mitose nicht direkt an den Spindelpolen lokalisiert (Grunow und Lechtreck, 2001). Zudem zeigte die Reduzierung der Centrinmenge in *C. reinhardtii* durch RNAi, dass die NBBCs nicht notwendig sind, um die Basalkörper korrekt zu verteilen (Koblentz et al., 2003). Weder die NBBCs noch die Lokalisation der Basalkörper an den Spindelpolen, scheinen also für die korrekte Verteilung der Basalkörper wichtig zu sein.

4.3 Die GFP-Markierung und mögliche Funktionen von DIP13 in *C. reinhardtii*

Neben SFA und Centrin wurde auch DIP13, ein weiteres Basalapparatprotein von *C. reinhardtii* (Pfannenschmid et al., 2003), mit einer C-terminalen GFP-Markierung exprimiert. Wie bei Centrin-GFP hing auch die DIP13-GFP Lokalisation von der Stärke der Expression ab. Bei einer moderaten DIP13-GFP Expression konnte das Fusionsprotein in der Nähe der Basalkörper nachgewiesen werden. Dies wurde bereits für Wildtyp-DIP13 durch Immunlokalisationen gezeigt (Pfannenschmid et al., 2003). Die starke Expression führte zur Aggregatbildung von DIP13-GFP und das Fusionsprotein war nicht mehr am Basalapparat lokalisiert. Zudem hatte, wie auch bei Centrin, die starke Expres-

sion von DIP13-GFP einen Einfluss auf die Verteilung und die Menge des Wildtypproteins. Wildtyp-DIP13 konnte nur noch in geringen Mengen am Basalapparat lokalisiert werden und die Western-Blot Analyse zeigte, dass die Wildtypproteinmenge reduziert war. Gründe für die Fehlverteilung und Aggregatbildung von GFP-Fusionsproteinen wurden bereits für Centrin-GFP diskutiert (vgl. 4.2).

Durch die Expression von DIP13-GFP konnte zum ersten Mal eine Veränderung des Phänotyps von *C. reinhardtii* im Zusammenhang mit der Expression eines GFP-Fusionsproteins beobachtet werden. Die Zellen zeigten, unabhängig von der Expressionsstärke des Fusionsproteins, eine verlangsamte Geißelregeneration. Die erhöhte Konzentration von DIP13-mRNA nach der Entgeißelung von *C. reinhardtii* (Pfannenschmid et al., 2003) deutet auf eine Funktion von DIP13 für den Aufbau der Geißeln hin. Die Anwesenheit von DIP13-GFP im Basalapparat oder die reduzierte Menge von Wildtyp-DIP13 könnte die Geißelregeneration negativ beeinflussen. Ein weiterer Anhaltspunkt, dass DIP13 wichtig für den Aufbau der Geißel ist, war die vermehrte Anzahl von Zellen ohne oder mit abnormalen kurzen Geißeln in älteren Zellkulturen stark exprimierender DIP13-GFP Stämme.

Neben den Effekten auf die Geißeln von *C. reinhardtii*, war in älteren Kulturen von stark exprimierenden DIP13-GFP Stämmen, zudem ein verlangsamtes Wachstum zu beobachten. Dieses verlangsamte Wachstum könnte eine Folge des vermehrten Zelltods sein, welches in diesen Kulturen beobachtet wurde (vgl. 3.3.2). Beruht der letale Effekt in den stark exprimierenden DIP13-GFP Stämmen aber nun auf der Überexpression des DIP13-GFPs oder auf der Reduzierung der Wildtyp-DIP13 Konzentration? In der Literatur ist nicht oft vermerkt, dass eine GFP-Markierung den Zelltod induziert. Es wird aber vermutet, dass eine anhaltende Anregung des GFPs freie Radikale produzieren kann, die dann toxisch für die Zellen sind (Liu et al., 1999). Für die GFP- α 2-Tubulin Expression in *Schizosaccharomyces pombe* wurde gezeigt, dass sich eine Überexpression des GFP-Fusionsproteins letal auf die transformierten Zellen auswirkte, während sich eine moderate Expression von GFP- α 2-Tubulin wie Wildtypprotein verhielt (Ding et al., 1998). Normalerweise scheint die GFP-Expression für *C. reinhardtii* aber nicht toxisch zu sein, was die Ergebnisse der GFP-Markierungen von SFA und Centrin zeigten. Deswegen ist es wahrscheinlicher, dass der negative Effekt auf der Reduzierung des Wildtyp-DIP13 Gehaltes beruhte. Dies würde sich auch besser mit den Ergebnissen decken, die durch Reduzierung der DIP13 Konzentration durch RNAi beo-

bachtet wurden (Pfannenschmid et al., 2003). Für solche *C. reinhardtii* Stämme wurde ebenfalls ein verlangsamtes Wachstum beschrieben, und die Zellen wiesen Defekte in der Zellteilung auf. Zudem hatten die Zellen eine unübliche Zellform (Pfannenschmid et al., 2003), was auch in den hier beschriebenen stark exprimierenden DIP13-GFP Stämmen zum Teil zu beobachten war (nicht gezeigt). Pfannenschmid et al. (2003) postulieren aufgrund ihrer RNAi Experimente mit *C. reinhardtii* DIP13 auch, dass eine Reduktion der Proteinkonzentration auf bis zu 90 - 100 %, einen letalen Effekt auf *C. reinhardtii* haben könnte.

Die Ergebnisse dieser Arbeit und die Arbeiten von Pfannenschmid et al. (2003) geben also Hinweise auf unterschiedliche Funktionen von DIP13. Zum einen könnte DIP13 am Geißelaufbau beteiligt sein, und zum anderen könnte DIP13 eine wichtige Funktion bei der Zellteilung von *C. reinhardtii* haben. Durch die Reduzierung des DIP13 Gehaltes in der Zelle könnten wichtige Mikrotubuli-stabilisierende Funktionen nicht mehr ausgeübt werden, die DIP13 aufgrund einer vermuteten Mikrotubuli-bindenden Domäne und seiner Co-Lokalisation mit Mikrotubuli, übernehmen könnte (Pfannenschmid et al., 2003).

4.4 Ist die GFP-Markierung in *C. reinhardtii* eine geeignete Methode zur Analyse von Basalapparatproteinen?

Die Ergebnisse der GFP-Markierungen von Centrin, SFA und DIP13 geben neue Hinweise auf die Eigenschaften und Funktionen der drei untersuchten Basalapparatproteine von *Chlamydomonas reinhardtii*. Versuche weitere Cytoskelettproteine von *C. reinhardtii* auf ähnliche Weise mit GFP zu markieren, waren nicht erfolgreich. Für einige dieser Konstrukte konnte aber nachgewiesen werden, dass die transformierte DNA im Genom vorhanden ist, und für ein α -1-Tubulin::*GFP* Konstrukt konnte gezeigt werden, dass das chimere Gen zumindest transkribiert wird. Diese ersten Experimente zur Untersuchung, warum die GFP-Fusionsproteine nicht exprimiert werden konnten, weisen darauf hin, dass diese Fusionsproteine nicht translatiert wurden, oder dass nach der Translation eine schnelle Degradation stattfand. Ein schneller Abbau der Fusionsproteine kann stattfinden, wenn die Fusionsproteine nicht korrekt gefaltet werden. Dabei kann zum einen das Fusionsprotein die Faltung des GFPs beeinträchtigen und auch umgekehrt. Eine nicht korrekte Faltung des Fusionsproteins kann aber auch dazu führen, dass das GFP nur schwach oder gar nicht leuchtet und somit nicht in der Zelle detektiert

werden kann (Brandizzi et al., 2002). Allerdings konnten in der vorliegenden Arbeit die Fusionsproteine auch nicht durch Western-Blot Analysen detektiert werden (vgl. 3.4). Ein Grund für eine nicht korrekte Faltung kann die Lage der GFP-Fusion sein. Des Weiteren könnten bestimmte Proteindomänen durch die Fusion beeinträchtigt werden, die für die korrekte Funktion und Lokalisation des Proteins essentiell sind (Brandizzi et al., 2002; Miyawaki et al., 2003). So wurde auch in dieser Arbeit gezeigt, dass die GFP-Fusion an den N-Terminus von SFA die Eigenschaften von SFA weniger beeinträchtigt als die C-terminale Fusion. Des Weiteren zeigten auch Centrin und DIP13 mit C-terminaler GFP Markierung veränderte Eigenschaften im Vergleich zum Wildtypprotein. Aufgrund dieser Beobachtungen scheint vielleicht eine N-terminale GFP-Markierung die bessere Wahl für die Markierung von *C. reinhardtii* Cytoskelettproteinen zu sein. Allerdings führten mehrere Versuche Centrin N-terminal mit GFP zu markieren, nicht zum gewünschten Erfolg (vgl. 4.2). In einigen Fällen könnte auch weder eine N- noch eine C-terminale Fusion zur gewünschten Expression, korrekten Lokalisation und Funktion führen. Dann bestünde aber noch die Möglichkeit das GFP in die Mitte des Proteins zu inserieren (Miyawaki et al., 2003)

Auch die Wahl eines geeigneten Linkers zwischen Protein und GFP kann sterische Hindernisse zwischen den beiden Fusionspartnern, Faltungsschwierigkeiten und veränderte Funktionen des Fusionsproteins im Vergleich zum Wildtypprotein vermeiden. Zum Beispiel wurde für die GFP-Markierung von Actin aus *S. cerevisiae* gezeigt, dass sich die Lokalisation des Fusionsproteins verbesserte, je größer die Anzahl der Alanine zwischen dem GFP und dem Actin war (Übersicht: Cubitt et al., 1995). In *Dictyostelium* führte die Expression von GFP-Actin ohne Linker zwischen den beiden Fusionspartnern zu Defekten in der Cytokinese (Aizawa et al., 1997). Westphal et al. (1997) zeigten, dass die Defekte der Cytokinese nicht auf der GFP-Markierung beruhten, sondern auf der Art der Fusion. Durch das Einfügen eines Linkers, bestehend aus fünf Aminosäuren, konnten Defekte in der Cytokinese von *Dictyostelium* vermieden werden (Westphal et al., 1997; Kimble et al., 2000). In der vorliegenden Arbeit wurden überwiegend Linker von zwei bis fünf Alaninen zwischen dem entsprechendem Protein und dem GFP eingefügt. Linker, die vielleicht besser geeignet sind, könnten aus mehreren Glycinen oder Glycinen in Abwechslung mit Serinen bestehen. Glycin gibt einer Peptidkette die meiste Flexibilität, da es die kleinste Seitenkette aller Aminosäuren besitzt (Miyawaki et al., 2003).

Insbesondere für α 1-Tubulin und MAP4BD wurden verschiedene Versuche unternommen, ein GFP-Fusionsprotein in *C. reinhardtii* zu exprimieren. Doch weder N- noch C-terminale GFP-Markierung führten zur Expression der Fusionsproteine (vgl. 3.4). In *C. reinhardtii* werden heterologe Gene oft nur schwach oder gar nicht exprimiert. Gründe hierfür können das „Silencing“ der Gene durch epigenetische Effekte in der chromosomalen Insertionsstelle sein, das Fehlen von geeigneten regulatorischen Sequenzen für die Transkription und Translation oder Fehler in der Prozessierung der heterologen Transkripte (Fuhrmann et al., 1999; Cerutti et al., 1997a).

Indem man Fremdgene zwischen 5'- und 3'UTRs von *C. reinhardtii* Genen klonierte, konnte diese in *C. reinhardtii* exprimiert werden (Stevens et al., 1996; Cerutti et al., 1997b). Die zusätzliche Einführung von *C. reinhardtii* Introns, mit Enhancer Eigenschaften, in das Fremdgen, führten zudem zur Steigerung der Expression (Lumbreras et al., 1998). Auch die Anpassung des heterologen Gens an die „codon usage“ von *C. reinhardtii* führte zur Expression von heterologen Genen (Fuhrmann et al., 1999). Für MAP4, das kein *C. reinhardtii* Protein ist (vgl. 3.4), könnten solche Veränderungen vielleicht zu einer Expression führen.

Die fehlende Expression von GFP-markiertem α 1-Tubulin und der anderen Geißelproteine ist nicht so einfach zu erklären. Zum Beispiel konnte GFP-markiertes IFT88 in dieser Arbeit nicht in *C. reinhardtii* exprimiert werden (vgl. 3.4). Das GFP-markierte IFT88 Homolog aus *Caenorhabditis elegans*, OSM-5, wurde aber in den Cilien der sensorischen Neuronen lokalisiert (Haycraft et al., 2001). Ein Grund für die fehlende Expression der Geißelproteine wäre, wie bereits für Centrin-GFP beschrieben, dass die GFP-Markierung den komplizierten Aufbau der Mikrotubuli und der Geißel in *C. reinhardtii* stören könnte. In *C. reinhardtii* codieren jeweils die beiden α - und β -Tubulin Gene für identische Proteine. Dies wurde auch für andere einzellige, begeißelte Organismen beobachtet, aber nicht für höhere Pflanzen, Tiere und Pilze (Silflow, 1991). Es besteht also die Möglichkeit, dass die Anwesenheit der Geißel in einzelligen Organismen einen selektiven Druck ausübt, der Unterschiede in der Aminosäurezusammensetzung von Tubulinen verhindert. Ein homogener Aufbau des Mikrotubuligrundgerüsts könnte essentiell für die Assoziation weiterer Geißelbausteine sein (Silflow, 1991). Die Proteine der Geißel könnten also einer „Qualitätskontrolle“ unterworfen werden, und eine GFP-Markierung würde dieser Kontrolle nicht standhalten können. Einen Hinweis hierauf ist, dass DIP13-GFP in dieser Arbeit nicht an den Geißeln nachgewiesen wurde.

Die Immunlokalisationen mit anti-DIP13 zeigte aber auch eine Markierung der Geißeln (Pfannenschmid et al., 2003).

In dieser Arbeit wurde beobachtet, dass die Expression der GFP-markierten Proteine verschiedene Effekte auf das Wildtypprotein ausübte. Die untersuchten Wildtypproteine von SFA, Centrin und DIP13 sind unlöslich. Die C-terminale GFP-Markierung führte aber zu einer erhöhten Löslichkeit der Fusionsproteine. Für SFA konnte dies durch die N-terminale Markierung mit GFP behoben werden. Die Überexpression der Fusionsproteine führte dazu, dass sich die Wildtypproteinmenge reduzierte. Die Wildtypproteinmenge könnte durch die Anwesenheit größerer Mengen an löslichem GFP-Fusionsprotein herunterreguliert werden. Zum Beispiel ist die Expression von Tubulin selbstregulierend. Große Mengen an löslichen Tubulin-Dimeren bewirken die Degradation von β -Tubulin mRNA (Übersicht: Cleveland, 1988). Die Regulation der Wildtypprotein-Menge könnte auch durch abgeschwächte Translation oder durch proteolytischen Abbau stattfinden. Mehrere Ergebnisse dieser Arbeit sprechen für solch einen Mechanismus. Die Wildtypmenge von DIP13-mRNA war ähnlich wie die der DIP13-GFP mRNA, während die Wildtypproteinmenge im Vergleich zur Fusionsproteinmenge aber reduziert war (vgl. 3.3.1). Zudem wurden in Western-Blot Analysen häufiger Degradationsprodukte nachgewiesen. Auch die ersten Analysen zur α 1-Tubulin-GFP Expression sprechen für eine Regulation auf Proteinebene (s. o.).

Es bestünde die Möglichkeit, dass sich bei den anderen Proteinen, die versucht wurden mit GFP zu markieren, eine solche Reduzierung der Wildtypproteinmengen letal auf die Zellen auswirkte, also noch stärker als bei DIP13-GFP exprimierenden Stämmen (vgl. 4.3), und so gar keine positiven Kolonien detektiert werden konnten. Defekte durch Überexpressionen der Fusionsproteine könnte man vermeiden, indem man weniger starke Promotoren zur Expression der chimären Konstrukte einsetzt, und so die Menge des Fusionsproteins reguliert. Zum Beispiel wurden bei der Expression von Centrin-GFP mit dem *NITI* Promotor nicht so starke Effekte beobachtet, wie mit dem *HSP70A/RBCS2* Promotor.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass für jedes Protein die Lage des GFPs, die Wahl des Linkers und die Expressionsbedingungen, wie Promotor und regulatorische Sequenzen, extra geprüft werden muss. Die hier angewandte Methode der GFP-Markierung lässt sich also nicht beliebig auf jedes gewünschte Protein übertragen.

Trotz der beschriebenen Nachteile der GFP-markierten Cytoskelettproteine konnten aber neue Hinweise auf die Funktionen von SFA, DIP13 und Centrin oder der Strukturen, in denen die Proteine integriert sind, durch diese Arbeit gewonnen werden. Die GFP-Markierung ist eine geeignete Methode für in vivo Beobachtungen von dynamischen Prozessen, wie diese Arbeit und frühere Arbeiten (Lehtreck et al., 2002; Ruiz-Binder et al., 2002) zeigten. Allerdings wurde dabei beobachtet, dass *C. reinhardtii* sehr anfällig gegen die UV-Strahlung während langer in vivo Beobachtungen war. Dies könnte durch den Einsatz von GFPs mit veränderten Spektralvarianten behoben werden. Durch die Veränderung von Domänen von GFP-SFA und Centrin-GFP wurden neue Erkenntnisse über die Funktion der Proteine gewonnen. Aus diesen Gründen, scheint die GFP-Markierung eine gute Methode für die Analyse von Cytoskelettproteinen in *C. reinhardtii* zu sein.

5 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde die GFP-Markierung verschiedener Cytoskelettproteine der Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* untersucht. Eine erfolgreiche GFP-Markierung gelang für die Basalapparatproteine „striated fiber assemblin“ (SFA), Centrin und „deflagellation induced protein of 13 kDa“ (DIP13).

SFA ist Hauptbestandteil der quergestreiften Mikrotubuli-assoziierten Fasern (SMAFs), die entlang der mikrotubulären Geißelwurzeln des Basalapparates von *C. reinhardtii* lokalisiert sind.

- Die Expression von SFA mit einer GFP-Fusion am N-Terminus (GFP-SFA) in *C. reinhardtii* führte zur Bildung von GFP-SFA Fasern. Zwei der vier kreuzförmig angeordneten Fasern waren länger, wobei die Länge mit der Expressionsstärke zunahm. In Wildtypzellen sind die SMAFs jeweils gleich lang.
- GFP-SFA zeigte ähnliche Löslichkeitseigenschaften wie das Wildtypprotein und war stabil bei höheren Temperaturen. Im Vergleich dazu, führte die C-terminale Fusion von GFP an SFA zur erhöhten Löslichkeit des Fusionsproteins. Die SFA-GFP Polymere waren instabil bei höheren Temperaturen.
- N-terminale Verkürzungen von 10 und 29 Aminosäuren von GFP-SFA erhöhten sequenziell die Löslichkeit des Fusionsproteins und resultierten in verkürzten Fasern. Die N-terminale Domäne von SFA scheint somit für die Faserbildung von SFA essentiell zu sein.
- „Photobleaching“-Versuche deuten darauf hin, dass SMAFs keine ausgeprägte Dynamik besitzen.
- GFP-SFA kann als Marker für die kreuzförmig angeordneten mikrotubulären Geißelwurzeln eingesetzt werden, mit denen die GFP-SFA Fasern assoziiert sind.
- Die Anordnung der GFP-SFA Fasern war in der Centrin Mutante *vfl2* und in Centrin-RNAi Zellen fehlerhaft. Somit sind die Basalkörperanzahl sowie die Centrinmenge wichtig für die korrekte Anordnung und die Ausbildung der GFP-SFA Fasern.

Centrin ist ein Calcium-bindendes Protein und Bestandteil verschiedener Cytoskelettelemente im Basalapparat von *C. reinhardtii*. Dazu gehören die „nucleus-basal body connectors“ (NBBCs), die distalen Verbindungsfibrille (dVF) und die Übergangsregion der Geißel.

- Die Lokalisation von Centrin-GFP variierte in Abhängigkeit von der Expressionsstärke. Eine moderate Expression von Centrin-GFP führte zum Einbau in die NBBCs und die Fimbriae um den Zellkern. Bei starker Centrin-GFP Expression waren die NBBCs defekt und Centrin-GFP Aggregate waren am Zellkern lokalisiert. Die Fimbriae waren stark fragmentiert. Die distale Verbindungsfibrille zeigte unabhängig von der Expressionsstärke eine gleich bleibende starke Centrin-GFP Markierung.
- Die unterschiedlichen Centrin-GFP Markierungen der NBBCs und der dVF weisen darauf hin, dass die beiden Strukturen aus unterschiedlichen Typen von Centrin-haltigen Fasern aufgebaut sind. Dies zeigten auch Induktionsversuche von Centrin-GFP. In diesen Versuchen waren die NBBCs bereits kurz nach der Induktion mit Centrin-GFP markiert, während die dVF erst spät nach der Induktion ein Centrin-GFP Signal aufwies.
- Die Überexpression von Centrin-GFP führte zu einer Fehlplatzierung der Basalkörper während der Mitose. Auswirkungen auf den Phänotyp, im Vergleich zu Wildtypzellen, hatte die Überexpression aber nicht.
- Die GFP-markierte Kopfdomäne von Centrin ist nicht in der Lage an Centrin-haltige Strukturen zu binden.
- In vivo Beobachtungen zeigten, dass die NBBCs elastisch sind.

DIP13 ist an mikrotubulären Strukturen des Basalapparates von *C. reinhardtii*, vornehmlich in der Nähe der Basalkörper, lokalisiert.

- Eine moderate Expression von DIP13-GFP führte zur Lokalisation an den Basalkörpern. Bei einer starken Expression bildete das Fusionsprotein Aggregate in der Zelle. Diese Aggregate waren überwiegend nicht am Basalapparat lokalisiert.
- Die Expression von DIP13-GFP führte im Vergleich zu Wildtypzellen zu einem veränderten Phänotyp. Die Zellen zeigten eine verlangsamte Geißelregeneration. Die Überexpression führte zur Verkürzung oder dem Fehlen von Geißeln und einem verlangsamten Kulturwachstum mit erhöhter Zellyse. Dieser letale Effekt ist eventuell auf die reduzierte Wildtypprotein-Menge zurückzuführen.
- Die Ergebnisse dieser Arbeit geben Hinweise auf Funktionen von DIP13 für den Aufbau der Geißeln und für die Cytokinese von *C. reinhardtii*.

Für acht andere Proteine des Basalapparates und der Geißel von *C. reinhardtii* konnten keine GFP-Fusionsproteine nachgewiesen werden. Die in dieser Arbeit angewandte

Methode der GFP-Markierung konnte somit nicht beliebig auf andere Proteine übertragen werden.

Die GFP-Markierung veränderte die Eigenschaften der untersuchten Proteine. Zudem wurde durch Überexpression die Lokalisation beeinflusst und die Menge des Wildtypproteins reduziert. Die Wildtyp-DIP13 mRNA Menge wurde durch die Expression nicht verändert. Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten darauf hin, dass die Menge der Basalapparatproteine strikt reguliert wird.

Aber gerade durch die veränderten Eigenschaften und Lokalisationen der Proteine konnten neue Hinweise für die Funktionen der untersuchten Proteine und der aus ihnen gebildeten Strukturen gewonnen werden. In vivo Beobachtungen und die Veränderung verschiedener Domänen von SFA und Centrin sind durch die GFP-Technik möglich. Somit ist die GFP-Markierung eine geeignete Methode zur Untersuchung von Cytoskelettproteinen in *C. reinhardtii*.

6 Literaturverzeichnis

- Adams, I.R. and Kilmartin, J.V. (2000). Spindle pole body duplication: a model for centrosome duplication? *Trends Cell Biol.* 10: 329-335.
- Aizawa, H., Sameshima, M. and Yahara, I. (1997). A green fluorescent protein-actin fusion protein dominantly inhibits cytokinesis, cell spreading, and locomotion in *Dicystostelium*. *Cell Struct. Funct.* 22: 335-345.
- Andersen, R.A., Barr, D.J.S., Lynn, D.H., Melkonian, M., Moestrup, Ø. and Sleigh, M.A. (1991). Terminology and nomenclature of the cytoskeletal elements associated with the flagellar/ciliary apparatus in protists. *Protoplasma.* 164: 1-8.
- Andersen, J.S., Wilkinson, C.J., Mayor, T., Mortensen, P., Nigg, E.A. and Mann, M. (2003). Proteomic characterization of the human centrosome by protein correlation profiling. *Nature.* 426: 570-574.
- Ausubel, F., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. and Struhl, K. (1995). Short protocols in molecular biology. 3. Auflage. Wiley & Sons, Inc., USA.
- Beisson, J. and Wright, M. (2003). Basal body/centriole assembly and continuity. *Curr. Opin. Cell Biol.* 15: 96-104.
- Bhattacharya, D., Steinkötter, J. and Melkonian, M. (1993). Molecular cloning and evolutionary analysis of the calcium-modulated contractile protein, Centrin, in green algae and land plants. *Plant Mol. Biol.* 23: 1243-1254.
- Blackman, L.M., Harper, J.D.I. and Overall, R.L. (1999). Localization of a centrin-like protein to higher plants plasmodesmata. *Eur. J. Cell Biol.* 78: 297-304.
- Bullitt, E., Rout, M.P., Kilmartin, J.V. and Akey, C.W. (1997). The yeast spindle pole body is assembled around a central crystal of Spc42p. *Cell.* 89: 1077-1086.
- Brandizzi, F., Fricker, M. and Hawes, C. (2002). A greener world: the revolution in plant bioimaging. *Nature Reviews Mol. Cell Biol.* 3: 520-530.
- Carminati, J.L. and Stearns, T. (1997). Microtubules orient the mitotic spindle in yeast through dynein-dependent interactions with the cell cortex. *J. Cell Biol.* 138: 629-641.
- Cavalier-Smith, T. (1974). Basal body and flagellar development during the vegetative cell cycle and the sexual cycle of *Chlamydomonas reinhardtii*. *J. Cell Sci.* 16: 529-556.
- Cerutti, H., Johnson, A.M., Gillham, N.W. and Boynton, J.E. (1997a). Epigenetic silencing of a foreign gene in nuclear transformants of *Chlamydomonas*. *Plant Cell.* 9: 925-945.
- Cerutti, H., Johnson, A.M., Gillham, N.W. and Boynton, J.E. (1997b). A eubacterial gene conferring spectinomycin resistance on *Chlamydomonas reinhardtii*: integration into the nuclear genome and gene expression. *Genetics.* 145: 97-110.

- Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W.W. and Prasher, D.C. (1994). Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science*. 263: 802-805.
- Chang, P., Giddings, T.H., Winey, M. and Stearns, T. (2003). ϵ -tubulin is required for centriole duplication and microtubule organization. *Nature Cell Biol.* 5: 71-76.
- Cleveland, D.W. (1988). Autoregulated instability of tubulin mRNAs: a novel eukaryotic regulatory mechanism. *TIBS*. 13: 339-343.
- Cole, D.G. (2003). The intraflagellar transport machinery of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Traffic*. 4: 435-442.
- Cubitt, A.B., Heim, R., Adams, S.R., Boyd, A.E., Gross, L.A. and Tsien, R.Y. (1995). Understanding, improving and using green fluorescent proteins. *TIBS*. 20: 448-455.
- Deane, J.A., Cole, D.G., Seeley, E.S., Diener, D.R. and Rosenbaum, J.L. (2001). Localization of intraflagellar transport protein IFT52 identifies basal body transitional fibers as the docking site for IFT particles. *Curr. Biol.* 11: 1586-1590.
- Debuchy, R., Purton, S. and Rochaix, J.D. (1989). The argininosuccinate lyase gene of *Chlamydomonas reinhardtii*: an important tool for nuclear transformation and for correlating the genetic and molecular maps of the *ARG7* locus. *EMBO J.* 8: 2803-2809.
- Ding, D.-Q., Chikashige, Y., Haraguchi, T. and Hiraoka, Y. (1998). Oscillatory nuclear movement in fission yeast meiotic prophase is driven by astral microtubules, as revealed by continuous observation of chromosomes and microtubules in living cells. *J. Cell Sci.* 111: 701-712.
- Dupuis-Williams, P., Fleury-Aubussen, A., Garreau de Loubresse, N., Geoffrey, H., Vyssie, L., Espigate, A. and Rossier, J. (2002). Functional role of ϵ -tubulin in the assembly of the centriole microtubule scaffold. *J. Cell Biol.* 158: 1183-1193.
- Dutcher, S.K. (1995). Flagellar assembly in two hundred and fifty easy-to-follow steps. *Trends Genet.* 11: 398-404.
- Dutcher, S.K. and Trabuco, E.C. (1998). The *UNI3* gene is required for assembly of basal bodies in *Chlamydomonas* and encodes δ -tubulin, a new member of the tubulin superfamily. *Mol. Biol. Cell.* 9: 1293-1308.
- Dutcher, S.K. (2001). The tubulin fraternity: alpha to eta. *Curr. Opin. Cell Biol.* 13: 49-54.
- Dutcher, S.K., Morrisette, N.S., Preble, A.M., Rackley, C. and Staga, J. (2002). ϵ -tubulin is an essential component of the centriole. *Mol. Biol. Cell.* 13: 3895-3869.
- Dutcher, S.K. (2003). Elucidation of basal body and centriole functions in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Traffic*. 4: 443-451.
- Ehler, L.L., Holmes, J.A. and Dutcher, S.K. (1995). Loss of spatial control of the mitotic spindle apparatus in a *Chlamydomonas reinhardtii* mutant strain lacking basal bodies. *Genetics*. 141: 945-960.

- Fernández, E., Schnell, R., Ranum, L.P.W., Hussey, S.C., Silflow, C.D. and Lefebvre, P.A. (1989). Isolation and characterization of the nitrate reductase structural gene of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 86: 6449-6453.
- Fischer, N. and Rochaix, J.-D. (2001). The flanking regions of *PsaD* drive efficient gene expression in the nucleus of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Mol. Genet. Genomics*. 265: 888-894.
- Fuhrmann, M., Oertel, W. and Hegemann, P. (1999). A synthetic gene coding for the green fluorescent protein (GFP) is a versatile reporter in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant J*. 19: 353-361.
- Fuhrmann, M. (2002). Expanding the molecular toolkit for *Chlamydomonas reinhardtii* – from history to new frontiers. *Protist*. 153: 357-364.
- Garreau de Loubresse, N., Ruiz, F., Beisson, J. and Klotz, C. (2001). Role of delta-tubulin and the C-tubule in assembly of *Paramecium* basal bodies. *BMC Cell Biol*. 2: 4.
- Gaffal, K.P. and el-Gammal, S. (1990). Elucidation of the enigma of the “metaphase-band” of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Protoplasma*. 156: 139-148.
- Geimer, S., Teltenkötter, A., Plessmann, U., Weber, K. and Lehtreck, K.-F. (1997). Purification and characterization of basal apparatuses from flagellate green alga. *Cell Motil. Cytoskeleton*. 37: 72-85.
- Goldschmidt-Clermont, M. and Rahire, M. (1986). Sequence, evolution and differential expression of the two genes encoding variant small subunits of ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase in *Chlamydomonas reinhardtii*. *J. Mol. Biol*. 191: 421-432.
- Gorman, D.S. and Levine, R.P. (1965). Cytochrome f and plastocyanin: their sequence in the photosynthetic electron transport chain of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 54: 1665-1669.
- Goodenough, U.W. and St. Clair, H.S. (1975). BALD-2: a mutation affecting the formation of doublet and triplet sets of microtubules on *Chlamydomonas reinhardtii*. *J. Cell Biol*. 66: 480-491.
- Grossmann, A.R., Harris, E.H., Lefebvre, P.A., Martinez, D., Rokhsar, D., Shrager, J., Silflow, C., Stern, D., Vallon, O. and Zhang, Z. (2003). *Chlamydomonas reinhardtii* at the crossroads of genomics. *Eukaryotic Cell*. 2: 1137-1150.
- Grunow, A. and Lehtreck, K.-F. (2001). Mitosis in *Dunaliella bioculata* (Chlorophyta): Centrin but not basal bodies are at the spindle poles. *J. Phycol*. 37: 1030-1043.
- Harris, E.H. (2001). *Chlamydomonas* as a model organism. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol*. 52: 363-406.
- Haycraft, C.J., Swoboda, P., Taulman, P.D., Thomas, J.H. and Yoder, B.K. (2001). The *C. elegans* homolog of the murine cystic kidney disease gene *TG737* functions in a ciliogenic pathway and is disrupted in *osm-5* mutant worms. *Development*. 128: 1493-1505.

- Holberton, D., Baker, D.A. and Marshall, J. (1988). Segmented α -helical coiled-coil structure of the protein giardin from the *Giardia* cytoskeleton. *J. Mol. Biol.* 204:789-795.
- Huang, B., Ramanis, Z., Dutcher, S.K. and Luck, D.J.L. (1982). Uniflagellar mutants of *Chlamydomonas*: evidence for the role of basal bodies in transmission of positional information. *Cell.* 29: 745-753.
- Huang, B., Mengersen, A. und Lee, V.D. (1988). Molecular cloning of cDNA for caltractin, a basal body-associated Ca^{2+} -binding protein: homology in its protein sequence with calmodulin and the yeast *CDC31* gene product. *J. Cell Biol.* 107: 133-140.
- Ikeda, K., Brown, J.A., Yagi, T., Norrander, J.M., Hirono, M., Eccleston, E., Kamiya, R. and Linck, R.W. (2003). Rib72, a conserved protein associated with the ribbon compartment of flagellar A-microtubules and potentially involved in the linkage between outer doublet microtubules. *J. Biol. Chem.* 278: 7725-7734.
- Ivanovska, I. and Rose, M.D. (2001). Fine structure analysis of the yeast Centrin, Cdc31p, identifies residues specific for cell morphology and spindle pole body duplication. *Genetics.* 157: 503-518.
- Jarvik, J.W. and Suhan, J.P. (1991). The role of the flagellar transition region: inferences from the analysis of a *Chlamydomonas* mutant with defective transition region structures. *J. Cell Sci.* 99: 731-740.
- Johnson, K.A. and Rosenbaum, J.L. (1992). Polarity of flagellar assembly in *Chlamydomonas*. *J. Cell Biol.* 119: 1605-1611.
- Kang, Y. and Mitchell, D.R. (1998). An intronic enhancer is required for deflagellation-induced transcriptional regulation of a *Chlamydomonas reinhardtii* dynein gene. *Mol. Biol. Cell.* 9: 3085-3094.
- Kalt, A. and Schliwa, M. (1993). Molecular components of the centrosome. *Trends Cell Biol.* 3: 118-127.
- Kellogg, D.R., Moritz, M. and Alberts, B.M. (1994). The centrosome and cellular organization. *Annu. Rev. Biochem.* 63: 639-74.
- Kilmartin, J.V. (2003). Sfi1p has conserved centrin-binding sites and an essential function in budding yeast spindle pole body duplication. *J. Cell Biol.* 162: 1211-1221.
- Kimble, M., Kuzmiak, C., McGovern, K.N. and de Hostos, E.L. (2000). Microtubule organization and the effects of GFP-tubulin expression in *Dictyostelium discoideum*. *Cell Motil. Cytoskeleton.* 47: 48-62.
- Kindle, K.L., Schnell, R.A., Fernández, E. and Lefebvre, P.A. (1989). Stable nuclear transformation of *Chlamydomonas* using the *Chlamydomonas* gene for nitrate reductase. *J. Cell Biol.* 109: 2589-2601.
- Kindle, K.L. (1990). High-frequency nuclear transformation of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87: 1228-1232.

- King, S.M. (1995). Large-scale isolation of *Chlamydomonas* flagella. *Methods Cell Biol.* 47: 9-12.
- King, S.M. and Patel-King, R.S. (1995). The $M_r = 8,000$ and 11,000 outer arm dynein light chain from *Chlamydomonas* flagella have cytoplasmic homologues. *J. Biol. Chem.* 270: 11445-11452.
- Koblenz, B. (2001). Charakterisierung von centrosomalen Proteinen aus *Spermatozopsis similis* (Chlorophyceae). Diplomarbeit. Botanisches Institut, Universität zu Köln.
- Koblenz, B., Schoppmeier, J., Grunow, A. and Lechtreck, K.-F. (2003). Centrin deficiency in *Chlamydomonas* causes defects in basal body replication, segregation and maturation. *J. Cell Sci.* 116: 2635-2646.
- Kost, B. Spielhofer, P. and Chua, N.-H. (1998). A GFP-mouse talin fusion protein labels plant actin filaments in vivo and visualizes actin cytoskeleton in growing pollen tubes. *Plant J.* 16: 393-402.
- Kozminski, K.G., Johnson, K.A., Forscher, P. and Rosenbaum J.L. (1993a). A motility in the eukaryotic flagellum unrelated to flagellar beating. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90: 5519-5523.
- Kozminski, K.G., Diener, D.R. and Rosenbaum, J.L. (1993b). High level expression of nonacetylatable α -tubulin in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Cell Motil. Cytoskeleton.* 25: 158-170.
- Kreis, T. and Vale, R. (1993). Guidebook to the cytoskeletal and motor proteins. Oxford University Press, Oxford, UK.
- Kuchka, M.R. and Jarvik, J.W. (1982). Analysis of flagellar size control using a mutant of *Chlamydomonas reinhardtii* with variable number of flagella. *J. Cell Biol.* 92: 170-175.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of the structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Lechtreck, K.-F. and Melkonian, M. (1991a). An update on fibrous flagellar roots in green algae. *Protoplasma.* 164: 38-44.
- Lechtreck, K.-F. and Melkonian, M. (1991b). Striated microtubule-associated fibers: identification of assemblin, a novel 34-kD protein that forms paracrystals of 2-nm filaments in vitro. *J. Cell Biol.* 115: 705-716.
- Lechtreck, K.-F., Frins, S., Bilski, J., Teltenkötter, A., Weber, K. and Melkonian, M. (1996). The cruciated microtubule-associated fibers of the green alga *Dunaliella bioculata* consist of 31 kDa SF-assemblin. *J. Cell Sci.* 109: 827-835.
- Lechtreck, K.-F. and Silflow, C.D. (1997). SF-assemblin in *Chlamydomonas*: Sequence conservation and localization during the cell cycle. *Cell Motil. Cytoskeleton.* 36: 190-201.

- Lechtreck, K.-F. (1998). Analysis of striated fiber formation by recombinant SF-assemblin in vitro. *J. Mol. Biol.* 279: 423-438.
- Lechtreck, K.-F. and Melkonian, M. (1998). SF-assemblin, striated fibers, and segmented coiled coil proteins. *Cell Motil. Cytoskeleton.* 41: 289-296.
- Lechtreck, K.-F., Rostmann, J., and Grunow, A. (2002). Analysis of *Chlamydomonas* SF-assemblin by GFP tagging and expression of antisense constructs. *J. Cell Sci.* 115: 1511-1522.
- Lechtreck, K.-F. (2003). Striated fiber assemblin in apikomplexan parasites. *Mol. Bioch. Parasit.* 128: 95-99.
- Lee, V.D., Stapleton, M. and Huang, B. (1991). Genomic structure of *Chlamydomonas* Caltractin. Evidence for intron insertion suggests a probable genealogy for the EF-hand superfamily of proteins. *J. Mol. Biol.* 221: 175-191.
- Lefebvre, P.A. and Silflow, C.D. (1999). *Chlamydomonas*: the cell and its genome. *Genetics.* 151: 9-14.
- Lippincott-Schwartz, J., Altan-Bonnet, N. and Patterson, G.H. (2003). Photobleaching and photoactivation: following protein dynamics in living cells. *Supplement Nature Cell Biol.* 5: S7-S14.
- Lisenbee, C.S., Karnik, S.K. and Trelease, R.N. (2003). Overexpression and mislocalization of a tail-anchored GFP redefines the identity of peroxisomal ER. *Traffic.* 4: 491-501.
- Liu, H.-S., Jan, M.-S., Chou, C.-K., Chen, P.-H. and Ke, N.-J. (1999). Is green fluorescent protein toxic to the living cells? *Bioch. Bioph. Res. Comm.* 260: 712-717.
- Ludin, B. and Matus, A. (1998). GFP illuminates the cytoskeleton. *Trends Cell Biol.* 8: 72-77.
- Lumbreras, V., Stevens, D.R. and Purton, S. (1998). Efficient foreign gene expression in *Chlamydomonas reinhardtii* mediated by an endogenous intron. *Plant J.* 14: 441-447.
- Lutz, W. L., Lingle, W.L., McCormick, D., Greenwood, T.W. and Salisbury, J.L. (2001). Phosphorylation of centrin during the cell cycle and its role in centriole separation preceding centrosome duplication. *J. Biol. Chem.* 276: 20774-20780.
- Maiza, D. (1984). Centrosomes and mitotic poles. *Exp. Cell Res.* 153: 1-15.
- Mandelkow, E. and Mandelkow, E.-M. (1995). Microtubules and microtubule-associated proteins. *Curr. Opin. Cell Biol.* 7: 72-81.
- Marc, J. (1997). Microtubule-organizing centres in plants. *Trends Plant Sci.* 2: 223-230.
- Marc, J. Granger, C.L., Brincat, J., Fisher, D.D., Kao, T. McCubbin, A.G. and Cyr, R. (1998). A *GFP-MAP4* reporter gene for visualizing cortical microtubule rearrangements in living epidermal cells. *Plant Cell.* 10: 1927-1939.

- Marshall, W.F. (2001). Centrioles take center stage. *Curr. Biol.* 11: R487-R496.
- Marshall, W.F. (2002). Size control in dynamic organelles. *Trends Cell Biol.* 12: 414-419.
- Marshall, W.F. und Rosenbaum, J.L. (2001). Intraflagellar transport balances continuous turnover of outer doublet microtubules: implications for flagellar length control. *J. Cell Biol.* 155: 405-414.
- Martindale, V.E. and Salisbury, J.L. (1990). Phosphorylation of algal centrin is rapidly responsive to changes in the external milieu. *J. Cell Sci.* 96:395-402.
- Mitchison, T.J. and Kirschner, M. (1984). Dynamic instability of microtubule growth. *Nature.* 312: 237-242.
- Miyawaki, A., Sawano, A. and Kogure, T. (2003). Lighting up cells: labeling proteins with fluorophores. *Supplement Nature Cell Biol.* 5: S1-S7.
- Morin, J.G. and Hastings, J.W. (1971). Energy transfer in a bioluminescent system. *J. Cell. Physiol.* 77: 313-318.
- Neuhoff, V., Philipp, K., Zimmer, H.-G. and Mesecke, S. (1979). A simple, versatile, sensitive and volume-independent method for quantitative protein determination which is independent of other external influences. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 360: 1657-1670.
- Oakley, B.R. (2000). An abundance of tubulins. *Trends Cell Biol.* 10: 537-542.
- O'Toole, E.T., Giddings, T.H., McIntosh, J.R. and Dutcher. S.K. (2003). Three-dimensional organization of basal bodies from wild-type and δ -tubulin deletion strains of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Mol. Biol. Cell.* 14: 2999-3012.
- Pazour, G.J., Dickert, B.L., Vucica, Y., Seeley, E.S., Rosenbaum, J.L, Witman, G.B. and Cole, D.G. (2000). *Chlamydomonas* IFT88 and its mouse homologue, polycystic kidney disease gene *Tg737*, are required for assembly of cilia and flagella. *J. Cell Biol.* 151: 709-718.
- Pfannenschmid, F., Wimmer, V.C., Rios, R.-M., Geimer, S., Kröckel, U., Leiherer, A., Haller, K., Nemcová, Y. and Mages, W. (2003). *Chlamydomonas* DIP13 and human NA14: a new class of proteins associated with microtubule structures is involved in cell division. *J. Cell Sci.* 116: 1449-1462.
- Phillips, G.N. (1997). Structure and dynamics of green fluorescent protein. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 7: 821-827.
- Pickett-Heaps, J.D. (1969). The evolution of the mitotic apparatus: an attempt at comparative ultrastructural cytology in dividing plant cells. *Cytobios.* 3: 257-280.
- Piel, M., Meyer, P., Khodjakov, A., Rieder, C.L. and Bornens, M. (2000). The respective contributions of the mother and daughter centrioles to centrosome activity and behavior in vertebrate cells. *J. Cell Biol.* 149: 317-329.

- Piperno, G., Mead, K. and Henderson, S. (1996). Inner dynein arms but not outer dynein arms require the activity of kinesin homologue protein KHP1^{Fla10} to reach the distal part of flagella in *Chlamydomonas*. *J. Cell Biol.* 133: 371-379.
- Prasher, D.C., Eckenrode, V.K., Ward, W.W., Prendergast, F.G. and Cormier, M.J. (1992). Primary structure of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein. *Gene.* 111: 229-233.
- Purton, S. and Pazour, G.J. (2002). Meeting report: tenth international conference on the cell and molecular biology of *Chlamydomonas*. *Protist.* 153: 325-336.
- Ramos-Morales, F., Infante, C., Fedriani, C., Bornens, M. and Rios, R.M. (1998). NA14 is a novel nuclear autoantigen with a coiled-coil domain. *J. Biol. Chem.* 273: 1634-1639.
- Ringo, D.L. (1967). Flagellar motion and fine structure of the flagellar apparatus in *Chlamydomonas*. *J. Cell Biol.* 33: 543-571.
- Rosenbaum, J.L. and Child, F.M. (1967). Flagellar Regeneration in protozoan flagellates. *J. Cell Biol.* 34: 345-364.
- Rosenbaum, J.L., Moulder, J.E. and Ringo, D.L. (1969). Flagellar elongation and shortening in *Chlamydomonas*. The use of cycloheximide and colchicines to study the synthesis and assembly of flagellar proteins. *J. Cell Biol.* 41: 600-619.
- Rosenbaum, J.L., Cole, D.G. and Diener, D.R. (1999). Intraflagellar transport: the eyes have it. *J. Cell Biol.* 114: 385-388.
- Ruiz, F., Beisson, J., Rossier, J. and Dupuis-Williams, P. (1999). Basal body duplication in *Paramecium* requires γ -tubulin. *Curr. Biol.* 9: 43-46.
- Ruiz, F., Krzywicka, A., Klotz, C., Keller, A., Cohen, J., Koll, F., Balavoine, G. and Beisson, J. (2000). The *SM19* gene, required for duplication of basal bodies in *Paramecium*, encodes a novel tubulin, η -tubulin. *Curr. Biol.* 10: 1451-1454.
- Ruiz-Binder, N.E., Geimer, S. and Melkonian, M. (2002). In vivo localization of centrin in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Cell Motil. Cytoskeleton.* 52: 43-55.
- Sager, R. and Granick, S. (1953). Nutritional studies with *Chlamydomonas reinhardi*. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 56: 831-838.
- Salisbury, J.L., Baron, A., Surek, B. and Melkonian, M. (1984). Striated flagellar roots: isolation partial characterization of a calcium-modulated contractile organelle. *J. Cell Biol.* 99: 962-970.
- Salisbury, J.L. (1995). Centrin, centrosomes, and mitotic spindle poles. *Curr. Opin. Cell Biol.* 7: 39-45.
- Salisbury, J.L., Suino, K.M., Busby, R. and Springett, M. (2002). Centrin-2 is required for centriole duplication in mammalian cells. *Curr. Biol.* 12: 1287-1292.

- Salisbury, J.L. (2004). Centrosomes: Sfi1p and Centrin unravel a structure riddle. *Curr. Biol.* 14: R27-R29.
- Sanders, M.A. and Salisbury, J.L. (1994). Centrin-plays an essential role in microtubule severing during flagellar excision in *Chlamydomonas reinhardtii*. *J. Cell Biol.* 124: 795-805.
- Schiebel, E. and Bornens, M. (1995). In search of a function for centrins. *Trends Cell Biol.* 5: 197-201.
- Schoppmeier, J. and Lechtreck, K.-F. (2002). Localization of p210-related proteins in green flagellates and analysis of flagellar assembly in the green alga *Dunaliella bioculata* with monoclonal anti-p210. *Protoplasma.* 220: 29-38.
- Schoppmeier, J. and Lechtreck, K.-F. (2003). Flagellar regeneration in *Spermatozopsis similis* (Chlorophyta). *J. Phycol.* 39: 918-922.
- Schroda, M., Blöcker, D. and Beck, C.F. (2000). The *HSP70A* promoter as a tool for the improved expression of transgenes in *Chlamydomonas*. *Plant J.* 21: 121-131.
- Schroda, M., Beck, C.F., Vallon, O. (2002). Sequence elements within an HSP70 promoter counteract transcriptional transgene silencing in *Chlamydomonas*. *Plant J.* 31: 445-455.
- Schulze, D., Robenek, H., McFadden, G.I. and Melkonian, M. (1987). Immunolocalization of a Ca^{2+} -modulated contractile protein in the flagellar apparatus of green algae: the nucleus basal body connector. *Eur. J. Cell Biol.* 45: 51-61.
- Shang, Y., Li, B. and Gorovski, M.A. (2002). *Tetrahymena thermophila* contains a conventional γ -Tubulin that is differentially required for the maintenance of different MTOCs. *J. Cell Biol.* 158: 1195-1206.
- Shimomura, O., Johnson, F.H. and Saiga, Y. (1962). Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusa, *Aequorea*. *J. Cell. Comp. Physiol.* 59: 223-240.
- Shrager, J., Hauser, C., Chang, C.-W., Harris, E.H., Davies, J., McDermott, J., Tamse, R., Zhang, Z. and Grossmann, A.R. (2003). *Chlamydomonas reinhardtii* genome project. A guide to the generation and use of the cDNA information. *Plant Physiol.* 131: 401-408.
- Silflow, C.D. and Rosenbaum, J.L. (1981). Multiple α - and β -tubulin genes in *Chlamydomonas* and regulation of tubulin mRNA levels after deflagellation. *Cell.* 24: 81-88.
- Silflow, C.D., Chisholm, R.L., Conner, T.W. and Ranum, L.P. (1985). The two alpha-tubulin genes of *Chlamydomonas reinhardtii* code for slightly different proteins. *Mol. Cell. Biol.* 5: 2389-2398.
- Silflow, C.D. (1991). Why do tubulin gene families lack diversity in flagellate/ciliate protists? *Protoplasma.* 164: 9-11.

- Silflow, C.D. and Lefebvre, P.A. (2001). Assembly and motility of eukaryotic cilia and flagella. Lessons from *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol.* 127: 1500-1507.
- Smith, E.F. and Lefebvre, P.A. (1996). PF16 encodes a protein with armadillo repeats and localizes to a single microtubule of the central apparatus in *Chlamydomonas* flagella. *J. Cell Biol.* 132: 359-370.
- Song, L. and Dentler, W.L. (2001). Flagellar protein dynamics in *Chlamydomonas*. *J. Biol. Chem.* 276: 29754-29763.
- Spang, A., Courtney, I., Fackler, U., Matzner, M. and Schiebel, E. (1993). The calcium binding protein cell division cycle 31 of *Saccharomyces cerevisiae* is a component of the half bridge of the spindle pole body. *J. Cell Biol.* 123: 405-416.
- Stevens, D.R., Rochaix, J.-D. and Purton, S. (1996). The bacterial phleomycin resistance gene *ble* as a dominant selectable marker in *Chlamydomonas*. *Mol. Gen. Genet.* 251: 23-30.
- Taillon, B.E., Adler, S.A., Suhan, J.P. and Jarvik, J.W. (1992). Mutational analysis of centrin: an EF-hand protein associated with three distinct contractile fibers in the basal body apparatus of *Chlamydomonas*. *J. Cell Biol.* 119: 1613-1624.
- Tam, L.-W. and Lefebvre, P.A. (1993). Cloning of flagellar genes in *Chlamydomonas reinhardtii* by DNA insertional mutagenesis. *Genetics.* 135: 375-384.
- Thomas, C.L. and Maule, A.J. (2000). Limitations on the use of fused green fluorescent protein to investigate structure-function relationships for the cauliflower mosaic virus movement protein. *J. General Virology.* 81: 1851-1855.
- Towbin, H., Steahlin, T. and Gordan, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 4350-4354.
- Tsien, R.Y. (1998). The green fluorescent protein. *Annu. Rev. Biochem.* 67: 509-544.
- Weber, R., Geissler, N., Plessmann, U., Bremerich, A., Lehtreck, K.-F., and Melkonian, M. (1993). SF-assemblin, the structural protein of 2-nm filaments from striated microtubule associated fibers of flagellar roots, forms a segmented coiled coil. *J. Cell Biol.* 121: 837-845.
- Weiss, R.L. (1984). Ultrastructure of the flagellar roots in *Chlamydomonas* gametes. *J. Cell Sci.* 67: 133-143.
- Westphal, M., Jungbluth, A., Heidecker, M., Mühlbauer, B., Heizer, C., Schwartz, J.M., Marriot, G. and Gerisch, G. (1997). Microfilament dynamics during cell movement and chemotaxis monitored using a GFP-actin fusion protein. *Curr. Biol.* 7: 176-183.
- Wiech, H. Geier, B.M, Paschke, T., Spang, A., Grein, K., Steinkötter, J., Melkonian, M. and Schiebel, E. (1996). Characterization of green alga, yeast and human Centrin. *J. Biol. Chem.* 271: 22453-22461.

- Wiese, C. und Zheng, Y. (1999). Gamma-tubulin complexes and their interactions with microtubule-organizing centres. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 9: 250-259.
- Wright, R.L., Chojnacki, B. and Jarvik, J.W. (1983). Abnormal basal-body number, location, and orientation in a striated fiber-defective mutant of *Chlamydomonas reinhardtii*. *J. Cell Biol.* 96: 1697-1707.
- Wright, R.L., Salisbury, J. and Jarvik, J.W. (1985). A nucleus-basal body connector in *Chlamydomonas reinhardtii* that may function in basal body localization or segregation. *J. Cell Biol.* 101: 1903-1912.
- Wright, R.L., Adler, S.A., Spanier, J.G. and Jarvik, J.W. (1989). Nucleus-basal body connector in *Chlamydomonas*: evidence for a role in basal body segregation and against essential roles in mitosis or in determining cell polarity. *Cell Motil. Cytoskeleton.* 14: 516-526.
- Wolfe, J. (1972). Basal body fine structure and chemistry. In: "Advances in cell and molecular biology". Vol. 2. (ed.: E. J. DuPraw). Academic Press, New York, London. S. 151-192.
- Yoon, K.H., Yoon, M., Moir, R.D., Khuon, S., Flitney, F.W. and Goldman, R.D. (2001). Insights into dynamic properties of keratin intermediate filaments in living epithelial cells. *J. Cell Biol.* 153: 503-516.
- Yoon, Y., Pitts, K. and McNiven, M. (2002). Studying cytoskeletal dynamics in living cells using green fluorescent protein. *Mol. Biotechnology.* 21: 241-250.
- Zhang, D. and Lefebvre, P.A. (1997). *FAR1*, a negative regulatory locus required for the repression of the nitrate reductase gene in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Genetics.* 146: 121-123.
- Zheng, Y., Wong, M.L., Alberts, B. and Mitchison, T. (1995). Nucleation of microtubule assembly by a gamma-tubulin-containing ring complex. *Nature.* 378: 578-583.
- Zimmermann, W., Sparks, C.A. and Doxsey, S.J. (1999). Amorphous no longer: the centrosome comes into focus. *Curr. Opin. Cell Biol.* 11: 122-128.

7 Anhang

Anhang 1: Originaldaten zur Geißelregeneration von DIP13-GFP Zellen

(vgl. 3.3.3 und Abb. 24B)

a.) Kontrolle

Entgeißelung	keine Geißeln [n]	zwei Geißeln [n]	n	[%] Zellen mit 2 Geißeln
vor	5	142	147	96,9
nach	146	2	148	1,4
nach 1h	155	13	168	7,7
nach 2h	80	54	134	40,3
nach 3h	36	109	145	75,2
nach 4h	13	133	146	91,1
nach 5h	13	159	172	92,1
nach 6h	9	140	149	94,0
nach 8h	1	130	131	99,2
nach 24h	1	132	133	99,2

b.) DIP13-GFP C7

Entgeißelung	keine Geißeln [n]	zwei Geißeln [n]	n	[%] Zellen mit 2 Geißeln
vor	7	153	160	95,6
nach	126	1	127	0,8
nach 1h	131	0	131	0
nach 2h	129	3	132	2,3
nach 3h	179	7	186	3,8
nach 4h	129	19	148	12,8
nach 5h	122	53	175	30,3
nach 6h	89	63	152	41,4
nach 8h	31	119	150	79,3
nach 24h	5	130	135	96,3

c.) DIP13-GFP G10

Entgeißelung	keine Geißeln [n]	zwei Geißeln [n]	n	[%] Zellen mit 2 Geißeln
vor	4	129	133	97,0
nach	122	0	122	0
nach 1h	147	0	147	0
nach 2h	132	2	134	1,5
nach 3h	139	4	143	2,8
nach 4h	136	14	150	9,3
nach 5h	126	33	159	20,8
nach 6h	114	34	148	23,0
nach 8h	65	89	154	57,8
nach 24h	17	159	176	90,3

Anhang 2: Verwendete Primer zum Nachweis von spezifischen cDNAs

P1: dip13cDNAf2: 5'-CGCAGGTCAACGAGTCCATCG-3'

P2: dip13cDNA3UTRr2: 5'- CCGAGCAGCATGCACACTCATCC-3'

P3: C-GFPTubfw: GCACCTACCGCCAGCTGTTCCAC-3'

P4: C-GFPcDNA-rv: 5'-GCCGGAGACGGAGAAGTTGTGG-3'

P5: cenHf1: 5'-CACACTCTAGAGCTAGCCTAAGTCGAAAACATGGGCCTGACT
GAGGAGCAGAAGCAGGAG-3'

P6: cenr1w: 5'-GCGTCTAGAGCGGCAGCCGCGGCGAAGAGCGAGGTCTTCTT
CATG-3'

P7: GFPfor1: 5'-GCGTCTAGATCCAAGGGCGAGGAGCTGTTC-3'

P8: GFPprev1: 5'-CGGGATCCTCGAGATCTGCGGCCGCCTTGTACAGCT-3'

P9: GN-SFAf1 5'-CGGGATCCGTTTGAGACCCCGGG-3'

P10: GN-SFAr1 5'-CGGGATCCTTATGCGCTGACCAGCTTG-3'

Danksagung

Ich danke Herrn Priv.-Doz. Dr. K.-F. Lechtreck für die Stellung des interessanten Themas, die Betreuung, seine Diskussionsbereitschaft, die umfassende Unterstützung und sein Interesse am Fortgang dieser Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt Frau B. Koblenz für die gute Zusammenarbeit, kritische Diskussionen, ihre Motivation, gute Laune und das gute Arbeitsklima. Ohne sie wäre es sehr einsam geworden im Labor. Zudem danke ich ihr für das Centrin-RNAi Konstrukt und den Vektor Nit/pCrGFP, welche ich für diese Arbeit benutzen durfte.

Frau Dr. A. Grunow danke ich für ihre Unterstützung und das Interesse an meiner Arbeit, dass sie auch noch nach ihrem Weggang aus unserer Arbeitsgruppe gezeigt hat. Zudem danke ich ihr für die Hilfe, die sie mir bei diversen EM-Arbeiten geleistet hat. In diesem Zusammenhang danke ich ihr und Herrn Dr. S. Geimer für die Anfertigung der Ultradünnschnitte.

Herrn Dr. Wolfgang Mages danke ich für den anti-DIP13 Antikörper.

Bei den Mitgliedern der Arbeitsgruppen Bothe und Melkonian bedanke ich mich für ihre Hilfsbereitschaft und das gute Arbeitsklima. Bei Herrn Prof. Dr. Weissenböck möchte ich mich für die Unterbringung in seinen Laboren gegen Ende dieser Arbeit bedanken. Besonders danke ich Herrn B. Podola für die große Hilfe bei unseren kleinen und großen Computerproblemen und für die schönen Mittags- und Kaffeepausen.

Für die Durchsicht dieses Manuskriptes bedanke ich mich bei Dr. K.-F. Lechtreck, Michael Schoppmeier, Birgit Schuhbauer und Bettina Koblenz.

Zum Schluss danke ich den wichtigsten Menschen: meiner Familie und Michael. Ohne ihr Vertrauen in mich, ihre Unterstützung und ihre Aufmunterungen wäre diese Arbeit nicht zustande gekommen.

Erklärung

„Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit – einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen –, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; dass sie – abgesehen von unten angegebenen Teilpublikationen – noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluss des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde.

Die Bestimmungen dieser Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Priv.-Doz. Dr. K.-F. Lechtreck betreut worden.“

Köln, April 2004

Jutta Schoppmeier

Teilpublikationen:

Koblenz, B., Schoppmeier, J., Grunow, A. and Lechtreck, K.-F. (2003). Centrin deficiency in *Chlamydomonas* causes defects in basal body replication, segregation and maturation. *J. Cell Sci.* 116: 2635-2646.

Schoppmeier, J. and Lechtreck, K.-F. (2004). Analysis of proteins of flagellar basal apparatus of *Chlamydomonas reinhardtii* using GFP. (in Vorbereitung).

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Jutta Christa Elisabeth Schoppmeier
Geburtsname: Rostmann
Familienstand: verheiratet
Geburtsdatum: 11.01.1969
Geburtsort: Köln
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung

1975-1979 Städtische Grundschule Ricarda-Huch-Strasse, Köln
1979-1985 Städtische Realschule Lassallestrasse, Köln
1985-1988 Städtisches Johann-Gottfried-Herder-Gymnasiums, Köln
Juni 1988 Abitur

Ausbildung und Beruf

8/1988-7/1991 Ausbildung zur Fachgehilfin in steuer- und wirtschaftsberatenden Berufen, StB/WP Dipl.-Kfm. Heinz Tappert
7/1991-6/1992 Anstellung zur Steuerfachgehilfin durch Herrn H. Tappert
7/1992-6/1994 Anstellung zur Steuerfachgehilfin, KPMG Deutsche Treuhand Gesellschaft

Studium

WS 1994/95-WS 2000/01 Studium der Biologie (Diplom) an der Universität zu Köln
1999-2000 Anfertigung der Diplomarbeit am Botanischen Institut der Universität zu Köln, bei Priv.-Doz. Dr. K.-F. Lechtreck.
Thema: Untersuchung zur Verbreitung des Basalapparatsproteins p210 in beißelnden Grünalgen (Chlorophyceae)

Oktober 2000

Diplom in Biologie

seit Dezember 2000

Doktorarbeit am Botanischen Institut der Universität zu Köln, bei Priv.-Doz. Dr. K.-F. Lechtreck

Publikationen:

Lechtreck, K.-F., Rostmann, J., and Grunow, A. (2002). Analysis of *Chlamydomonas* SF-assemblin by GFP tagging and expression of antisense constructs. *J. Cell Sci.* 115: 1511-1522.

Schoppmeier, J. and Lechtreck, K.-F. (2002). Localization of p210-related proteins in green flagellates and analysis of flagellar assembly in the green alga *Dunaliella bioculata* with monoclonal anti-p210. *Protoplasma.* 220: 29-38.

Schoppmeier, J. and Lechtreck, K.-F. (2003). Flagellar regeneration in *Spermatozopsis similis* (Chlorophyta). *J. Phycol.* 39: 918-922.

Koblenz, B., Schoppmeier, J., Grunow, A. and Lechtreck, K.-F. (2003). Centrin deficiency in *Chlamydomonas* causes defects in basal body replication, segregation and maturation. *J. Cell Sci.* 116: 2635-2646.

Schoppmeier, J. and Lechtreck, K.-F. (2004). Analysis of proteins of flagellar basal apparatus of *Chlamydomonas reinhardtii* using GFP. (in Vorbereitung).