

Aus dem Zentrum für Biochemie (Medizinische Fakultät) der Universität zu Köln  
Institut für Biochemie I  
Geschäftsführende Direktorin: Frau Universitätsprofessorin Dr. rer. net. A. A. Noegel

**Untersuchungen zu phr2AB, einer regulatorischen Untereinheit der  
Proteinphosphatase PP2A, im Modellorganismus *Dictyostelium discoideum***

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde  
der Medizinischen Fakultät der Universität Köln  
vorgelegt von Regina Margarethe Wehrstedt von Nessen-Lapp  
aus Waiblingen

promoviert am 25. November 2022

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln  
Jahr der Erstellung: 2022

Dekan: Universitätsprofessor Dr. med. G. R. Fink

1. Gutachter: Frau Universitätsprofessorin Dr. rer. nat. A. A. Noegel

2. Gutachter: Herr Universitätsprofessor Dr. rer. net. M. K. Lemberg

### Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskriptes habe ich Unterstützungsleistungen von folgenden Personen erhalten:

Frau Universitätsprofessorin Dr. rer. nat. A. A. Noegel

Weitere Personen waren an der geistigen Herstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die Hilfe einer Promotionsberaterin/eines Promotionsberaters in Anspruch genommen. Dritte haben von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertationsschrift stehen.


Die Dissertationsschrift wurde von mir bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Die dieser Arbeit zugrunde liegenden Experimente sind von mir mit Unterstützung von Frau Universitätsprofessorin Dr. rer. nat. A. A. Noegel und der medizinisch-technischen Assistentin Frau Maria Stumpf im Institut für Biochemie der Universität Köln in der Zeit von Juli 2016 bis Juli 2017 durchgeführt worden. Jegliche Experimente wurden von mir selbst durchgeführt und die daraus entstandenen Daten von mir selbst weiterverarbeitet. Die korrekte Ausführung wurde von Frau Stumpf und Frau Dr. rer. nat. A. A. Noegel überwacht. Jegliches Material zur Durchführung der Experimente wurde mir von Frau Dr. rer. nat. A. A. Noegel zur Verfügung gestellt.

Teile der Arbeit wurden bereits veröffentlicht in dem Paper: Müller R, Stumpf M, Wehrstedt R, Sukumaran SK, Karow MA, Marko M, Noegel AA, Eichinger L. The regulatory subunit phr2AB of Dictyostelium discoideum phosphatase PP2A interacts with the centrosomal protein CEP161, a CDK5RAP2 ortholog. Genes Cells. 2018 Oct;23(10):923-931. doi: 10.1111/gtc.12637. Epub 2018 Sep 21. PMID: 30133996.

Ich erkläre hiermit, dass ich die Ordnung zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis und zum Umgang mit wissenschaftlichem Fehlverhalten (Amtliche Mitteilung der Universität zu Köln AM 132/2020) der Universität zu Köln gelesen habe und verpflichte mich hiermit, die dort genannten Vorgaben bei allen wissenschaftlichen Tätigkeiten zu beachten und umzusetzen.

München, den 01.08.2022

Unterschrift:  .....

## Danksagung

Ich danke Frau Univ. Prof. Dr. Noegel, Frau Maria Stumpf, Herrn Rolf Müller, sowie dem restlichen Team des Institutes für Biochemie I, für die Möglichkeit an der Institutsforschung teilzuhaben und die nette Betreuung. Die wissenschaftliche Arbeit am Institut hat mir stets sehr viel Freude bereitet und mir neue Perspektiven im Gebiet der Forschung eröffnet.

Zudem möchte ich meiner Familie danken, für die stetige Unterstützung über die Zeit meines medizinischen Studiums und meiner besten Freundin Georgia Seraphim, die mit mir 6 spannende Jahre verbracht hat.

## **Inhaltsverzeichnis**

### **Abkürzungsverzeichnis**

7

### **1) Zusammenfassung**

8-9

### **2) Einleitung**

2.1 Der Modellorganismus *Dictyostelium discoideum*

10-12

2.2 Die Proteinphosphatase 2A (PP2A) und die Funktion des phr2AB Proteins

12-15

2.3 Das Zentrosom

15-17

2.4 Funktion von CEP161

17-19

2.5 Rolle von Phosphatasen am Zentrosom

19-21

2.6 Fragestellungen und Ziel der Arbeit

22

### **3) Methoden und Material**

#### **3.1 Material**

3.1.1 Labormaterial

23

3.1.2 Laborgeräte

23-24

3.1.3 Chemikalien

24-25

3.1.4 Medien und Puffer für *D. discoideum*

26-28

3.1.5 Zusammensetzung der Polyacrylamidgele

28

3.1.6 Antikörper

28-29

3.1.7 Antibiotika

29

3.1.8 Inhibitoren für Pulldown

30

3.1.9 Inhibitoren für Arbeiten mit Lysaten von HEK293T Zellen

30

## **3.2 Methoden**

3.2.1 Wachstumsanalysen ( <u><i>D. discoideum</i></u> Zellen)	30-32
3.2.1 A) in axenischem Medium	30-31
3.2.1 B) auf <i>Klebsiella</i> Rasen	31-32
3.2.2 Western Blot	33-37
3.2.3 Immunfluoreszenz	37-39
3.2.4 Präzipitation (Pulldown) von GFP-Fusionsproteinen aus <i>D. discoideum</i>	39-40
3.2.5 Pulldown mit GST-CEP161 Fusionsproteinen	40-41
3.2.6 Behandlung von <i>D. discoideum</i> mit Okadasäure	41-42
3.2.7 Immunpräzipitation der humanen PP2A - Subunit B aus HEK293T Zellen	42-44
A) Was sind HEK-Zellen?	42
B) Kultivierung und Transfektion von Säugerzellen und Herstellung von Lysaten für Präzipitationsexperimente	43-44
C) PEI-Transfektionsmethode	44

## **4) Ergebnisse**

4.1 Charakterisierung der regulatorischen PP2A Untereinheit phr2AB	44-46
4.2. Expression von phr2AB als GFP Fusionsprotein in AX2	47-48
4.3 Analyse der Interaktion von phr2AB mit CEP161	49-52
4.4 Lokalisation von phr2AB-GFP in der Zelle	52-54
4.5 Wachstumsanalysen	54-56
4.5.1 Wachstum in Schüttelkultur	54-55
4.5.2 Wachstum auf einem Bakterienrasen	56
4.6 Bestimmung der Zellkernanzahl im Wildtyp AX2 und AX2 phr2AB-GFP	57-59

4.7 Bestimmung des Zellkern-Zentrosomabstands	59-62
4.8 Verhältnis Zentrosom - Zellkernanzahl im Wildtyp AX2	63-66
4.9 Bestimmung der Zellgröße	66-67
4.10 Wirkung des Phosphataseinhibitors Okadasäure auf Wildtyp und Mutante	67-70
4.11 Interaktion des humanen CDK5RAP2 mit PP2A	70-73
<b><u>5) Diskussion</u></b>	74-77
<b><u>6) Literaturverzeichnis</u></b>	78-83
<b><u>7) Anhang</u></b>	
7.1 Abbildungsverzeichnis	84-85
<b><u>8) Vorabveröffentlichungen von Ergebnissen</u></b>	85

## Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
A	Ampere
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
g (Gewicht)	Gramm
g (Zentrifugation)	Erdbeschleunigung
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
kDa	Kilodalton
MG	Molekulargewicht
µg	Mikrogramm
mM	Millimolar
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
min	Minute
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Natriumchloridlösung
rpm	Umdrehungen pro Minute
SDS	Natriumdodecylsulfat
V	Volt

## **1) Zusammenfassung**

Phosphatasen spielen eine zentrale Rolle in der Regulation von Zellprozessen, so auch die Phosphatase PP2A, deren regulatorische Untereinheit phr2AB Thema dieser Arbeit ist. Um die Funktion von phr2AB und auch die Auswirkungen von Veränderungen des Proteins zu beleuchten, wurden Zellen des Modellorganismus *Dictyostelium discoideum* verwendet. Für die Durchführung der Versuche wurde eine Wildtyp-Variante und eine Mutante mit Überexpression von phr2AB verwendet. Darüberhinaus wurde die Interaktion zwischen phr2AB und dem Protein CEP161 untersucht, welches eine wichtige Rolle in zentrosomalen Prozessen spielt und das Ortholog von CDK5RAP2 in Säugetieren darstellt. CDK5RAP2 ist unter anderem ein entscheidender Faktor in der Pathogenese der Mikrozephalie. Die Versuche konnten die Interaktion von CEP161 mit phr2AB beweisen. Vor allem die yTuRC-Region scheint eine wichtige Rolle in der Interaktion zu spielen, was die Bedeutung von phr2AB auch in zentrosomalen Prozessen unterstreicht.

Die Zellen mit einer Überexpression von phr2AB zeigten unter anderem ein verlangsamtes Wachstumsverhalten, eine veränderte Kernanzahl und auch ein verändertes Verhältnis von Zellkern- zu Zentrosomenanzahl im Vergleich zur Wildtyp-Variante. Bedingt durch diese Ergebnisse kann man auf die zentrale Funktion der Phosphatase bei zellulären Prozessen rückschließen. Auch durch die Behandlung der Wildtyp- und Mutante-Zellen mittels des Phosphataseinhibitors Okadasäure konnte ein Unterschied im Zellverhalten festgestellt werden. Die Zellen mit der phr2AB Überexpression zeigten unter der Behandlung mit Okadasäure unter anderem einen vergrößerten Zellkerndurchmesser im Vergleich zu den Wildtyp-Zellen.

Schließlich wurde die Interaktion zwischen CDK5RAP2 und PP2A in Säugetierzellen untersucht, um die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf humane Zellen zu überprüfen. Dabei konnten erste Hinweise auf die Interaktion zwischen beiden Proteinen dargestellt werden. Inwieweit sich die Ergebnisse der Interaktion von CEP161 mit phr2AB in *Dictyostelium discoideum* auf die Proteine CDK5RAP2 und B55 in Säugetieren übertragen lässt, ist in der Zukunft zu untersuchen.

## **2) Einleitung**

### 2.1 Der Modellorganismus *Dictyostelium discoideum*

*D. discoideum*, ein niederer Eukaryot, ist eine im Waldboden lebende soziale Amöbe, die zur Gattung der Nacktamöben gezählt wird. Der Organismus ist zur Sporenbildung befähigt. Die Sporen sind von einer Hülle aus Proteinen und Cellulose umgeben und erlauben ein Überleben unter ungünstigen Bedingungen. Cellulose ist ein typisches Charakteristikum von Pflanzen und Pilzen, jedoch weist *D. discoideum* auch tierische Eigenschaften auf, z. B. bei der Art und Weise, wie sich die Amöbe fortbewegt und durch Phagozytose ernährt. Diese Eigenschaften sind denen von Neutrophilen sehr ähnlich (Otto und Kessin;2001). *D. discoideum* ernährt sich von Pilzen und Bakterien. Zudem wechselt *D. discoideum* seine Erscheinungsform zwischen einzelliger Amöbe bis hin zum mehrzelligen Organismus. Letztere Erscheinungsform wird bei Nahrungsmangel ausgebildet, wobei die Zellen zusammenströmen und sich über Zelladhäsionsproteine aneinander lagern und ein multizelluläres Aggregat bilden, in dem Zelldifferenzierung und Zellsortierung stattfindet und aus dem schließlich ein Fruchtkörper mit Sporen entsteht (Annesly und Fisher, 2009).

Diese Form der Zellaggregation ermöglicht das effektive Überleben der Zellen auch bei Nahrungsknappheit. Eine einzelne Zelle allein hat nicht viele Möglichkeiten, ihr Überleben bei Nahrungsmangel zu sichern. Aufgrund dessen ist der Zusammenschluss vieler Zellen eine effektive Weise die Überlebenschance zu verbessern. Dabei können sich bis zu 100.000 Zellen ansammeln, die sich gegenseitig das Signal zum Zusammenschluss über die Produktion des Signalstoffes cAMP geben (Kawabe et al., 2019). Zusammen bewegen sich die Zellen dann zu einem Ort mit besseren

Überlebenschancen, wobei sie dabei von ihren Licht- und Wärmesensoren geleitet werden. Schließlich wird ein Fruchtkörper, bestehend aus einer basalen Platte (basal disc), einem Stiel (stalk) und Sporen im Sorus ausgebildet. Die reifen Sporen können durch Wind und Regen fortgetragen werden. An einem günstigen Ort und unter günstigen Bedingungen, bezogen auf Nahrung und Wachstumsbedingungen, werden Amöben aus den Sporen freigesetzt, die dann wieder in den Entwicklungszyklus eintreten können (Dormann et al., 2002) (Abbildung 1).



Abbildung 1: Fruchtkörper von *D. discoideum* mit basaler Platte, Stiel und Sporenköpfchen, entnommen aus (Loomis, 2006)

Für die folgenden Untersuchungen wurde als Modellorganismus *D. discoideum* verwendet, da sich durch die Ähnlichkeit der Zellprozesse und der Entwicklungsabläufe mit denen höherer Eukaryonten, Ergebnisse von genereller Bedeutung erzielen lassen. So ist *D. discoideum* ein wichtiges Modell für Chemotaxis und Zellmotilität, Phagozytose und Zelldifferenzierung (Bozzaro, 2019). *D. discoideum* ist leicht kultivierbar, die Verdopplungszeit in Schüttelkultur beträgt 10 bis 11 Stunden, und zudem ist *D. discoideum* genetisch manipulierbar. Die Entschlüsselung des Genoms wurde in 2005 berichtet (Eichinger et al., 2005). Darüber hinaus ist eine Vielzahl von zellbiologischen Methoden etabliert, die für die Charakterisierung von Mutanten eingesetzt werden können.

## 2.2 Die Proteinphosphatase 2A (PP2A) und die Funktion des phr2AB Proteins

Die reversible Proteinphosphorylierung ist eine der häufigsten posttranslationalen Modifikationen und reguliert eine Vielzahl von Prozessen, die von Stoffwechselabläufen bis zur Regulation des Zellzyklus reichen (Humphrey et al., 2015; Li and Xin, 2017). Für die Phosphorylierungen sind Proteinkinasen verantwortlich, wobei man nach den phosphorylierten Aminosäureresten zwischen Tyrosin- (Tyr) und Serin/Threoninkinasen (Ser/Thr Kinasen) unterscheidet. Im menschlichen Genom gibt es mehr als 500 Gene, die für Tyr- und Ser/Thr-Kinasen kodieren. Für die Entfernung der Phosphatreste sind Proteinphosphatasen zuständig. Sie werden eingeteilt in Tyrosinphosphatasen, die nur Tyrosinreste dephosphorylieren, Ser/Thr-Phosphatasen, die Serin und Threoninreste dephosphorylieren, und Phosphatasen mit dualer Spezifität, die sowohl Tyrosin- als auch Serin- und Threoninreste in einem Substrat

dephosphorylieren. Das menschliche Genom kodiert für circa 137 Phosphatasen. 107 Gene kodieren für Tyrosinphosphatasen. Diese Zahl entspricht ungefähr der Anzahl der Gene, die für Tyrosinkinasen kodieren. Ungefähr 30 Gene kodieren für Ser/Thr-Phosphatasen. Dies ist ca. zehnmal weniger als die Zahl an Genen, die für Ser/Thr-Kinasen kodieren. Die niedrige Anzahl wird dadurch kompensiert, dass Ser/Thr-Phosphatasen unterschiedliche Komplexe mit interagierenden und katalytischen Untereinheiten bilden, die die Substratspezifität ermöglichen, und dass es Enzyme mit dualer Spezifität gibt, die sowohl Tyrosin- als auch Serin- oder Threoninreste innerhalb eines Substrats dephosphorylieren (Kim et al., 2016). Im Fall der PP2A wird die komplexe Diversität durch Assoziation mit unterschiedlichsten regulatorischen Untereinheiten zu verschiedensten Holoenzymen erreicht, z.B. formt allein PP2A über 100 heterotrimere Holoenzymkomplexe (Kim et al., 2016).

Thema dieser Arbeit sind Untersuchungen zur Proteinphosphatase 2A (PP2A) in *D. discoideum* und speziell zur regulatorischen Untereinheit phr2AB. PP2A ist ein Heterotrimer, bestehend aus einer katalytischen Untereinheit (pho2A), einer stabilisierenden Untereinheit (pppA) und einer regulatorischen Untereinheit (phr2AB, psrA). In Säugern gibt es im Gegensatz zu *D. discoideum* vier Klassen von regulatorischen B Untereinheiten (B, B', B'' und B''') und mehrere Isoformen der Proteine (Sangodkar et al., 2016) (Abbildung 2). phr2AB ist das Ortholog der B55 Untereinheit, psrA das Ortholog von B56.

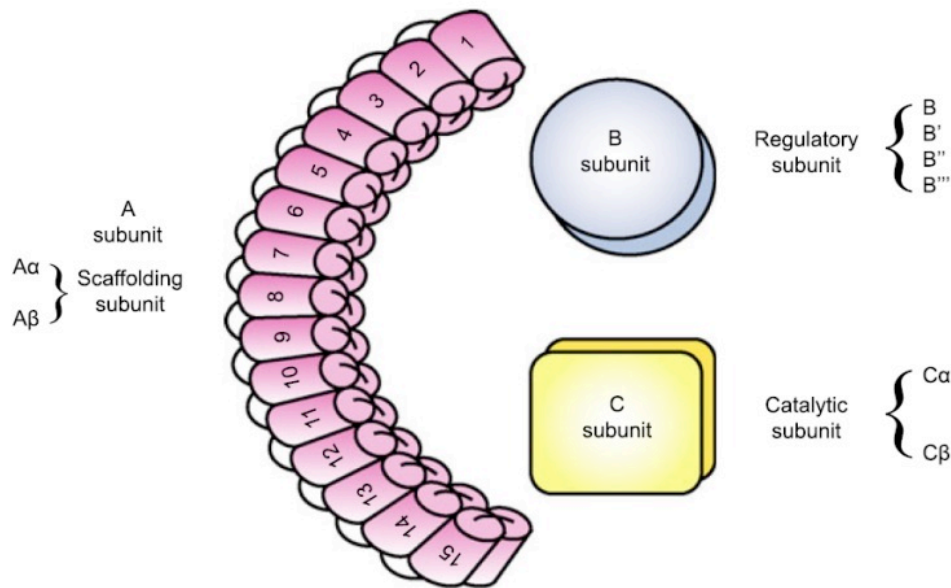


Abbildung 2: Die Phosphatase PP2A ist ein Heterotrimer bestehend aus einer stabilisierenden Untereinheit (A), einer regulatorischen Untereinheit (B) und eine katalytischen Untereinheit (C). Die stabilisierende Untereinheit und die katalytische Untereinheit existieren in zwei Isoformen, für die B Untereinheit gibt es vier Klassen (aus Sangodkar et al., 2016).

Die Phosphatase 2A ist an vielen zellulären Prozessen beteiligt. So hat sie wichtige Funktionen in der Entwicklung, in der Mitose und in weiteren Prozessen. Zum Beispiel konnte in *D. discoideum* eine der Myosin-Schwere-Kette-Phosphatase-Aktivitäten der Phosphatase 2A zugeordnet werden (Murphy und Egelhoff, 1999). Somit ist sie das biochemische Schlüsselement bei der Dephosphorylierung der schweren Kette des Myosins (Rai und Egelhoff, 2011). Zellen, in denen die regulatorischen Untereinheiten der PP2A entfernt wurden, zeigten eine verzögerte Entwicklung, die Myosin Assemblierung war reduziert und zudem die Zytokinese gestört (Rai und Egelhoff, 2011). Darüberhinaus ist PP2A am Austritt aus der Mitose im Zellzyklus beteiligt (Cundell et al., 2016). Aufgrund ihrer vielfältigen Funktionen findet man die

Phosphatasen in mehreren Kompartimenten der Zelle wieder, z. B. im Zytoplasma, im Mikrotubuli-organisierenden Zentrum und im Zytoskelett (Löffler/Petrides, 2014).

Da die Proteinphosphatase 2A auch entscheidend an der Antwort auf DNA-Schäden beteiligt ist, wird sie sehr häufig in verschiedensten Krebsformen in mutierter Form aufgefunden. Dies verdeutlicht ihre zentrale Rolle als Tumorsuppressor. In Säugetierzellen führen PP2A Mutationen oder das Fehlen von PP2A zu Chromosomenaberrationen und DNA-Doppelstrangbrüchen (Merigliano et al., 2017; Sangodkar et al., 2016).

In dieser Arbeit wurde die regulatorische Untereinheit p<sub>hr</sub>2AB der PP2A als Bindepartner von CEP161, dem *Dictyostelium* Homolog der Zentrosomkomponente CDK5RAP2, identifiziert.

### 2.3 Das Zentrosom

Das Zentrosom hat die Funktion eines Mikrotubuli-organisierenden Zentrums (MTOC) in der Zelle inne, erlaubt also die Bildung von Mikrotubuli (Welsch, 2014). Im MTOC sind die Minusenden der Mikrotubuli verankert, von denen ausgehend sich die Mikrotubuli verlängern und mit ihren schnell wachsenden Plus(+)-Enden in die Zellperipherie wachsen. Das Zentrosom besitzt meist ein Zentriolenpaar, das in eine proteinreiche Matrix, dem perizentriolären Material (PCM), eingebettet ist. Auf Grund seiner Funktion als MTOC, ist das Zentrosom an vielen Mikrotubuli-basierenden Prozessen beteiligt, wie dem intrazellulären Transport, der Zellform, der Verteilung der Zellorganellen, dem Aufbau des Spindelapparats und der genomischen Stabilität. Daneben ist es ein Integrator und Koordinator von Signalwegen und beeinflusst dadurch viele zelluläre

Prozesse. Außerdem bestimmt es die Zellpolarität, da es am Zellkern lokalisiert ist (Conduit et al., 2015).

Die Zentriolen des Zentrosoms sind essenziell für den Aufbau des Spindelapparats in der Mitose. Auch die Basalkörper der Kinozilien werden aus ihnen gebildet. Zentriolen bestehen jeweils aus einem Mutter- und einem Tochterzentriol, die jeweils durch neun Mikrotubulitriplets gebildet werden, die im rechten Winkel zueinander stehen (Abbildung 3). Fehler im Zentrosomenaufbau resultieren unter anderem in Krebserkrankungen, was die zentrale Stellung dieser Zellkomponente unterstreicht. LGALS3BP (Lectin galactoside-binding soluble 3 binding protein), ein Protein, das mit dem Zentriol und dem Basalkörper assoziiert ist, wurde z.B. als ein entscheidender Faktor bei der Entstehung von Defekten im Zentrosom bei Krebszellen identifiziert (Fogeron et al., 2013).

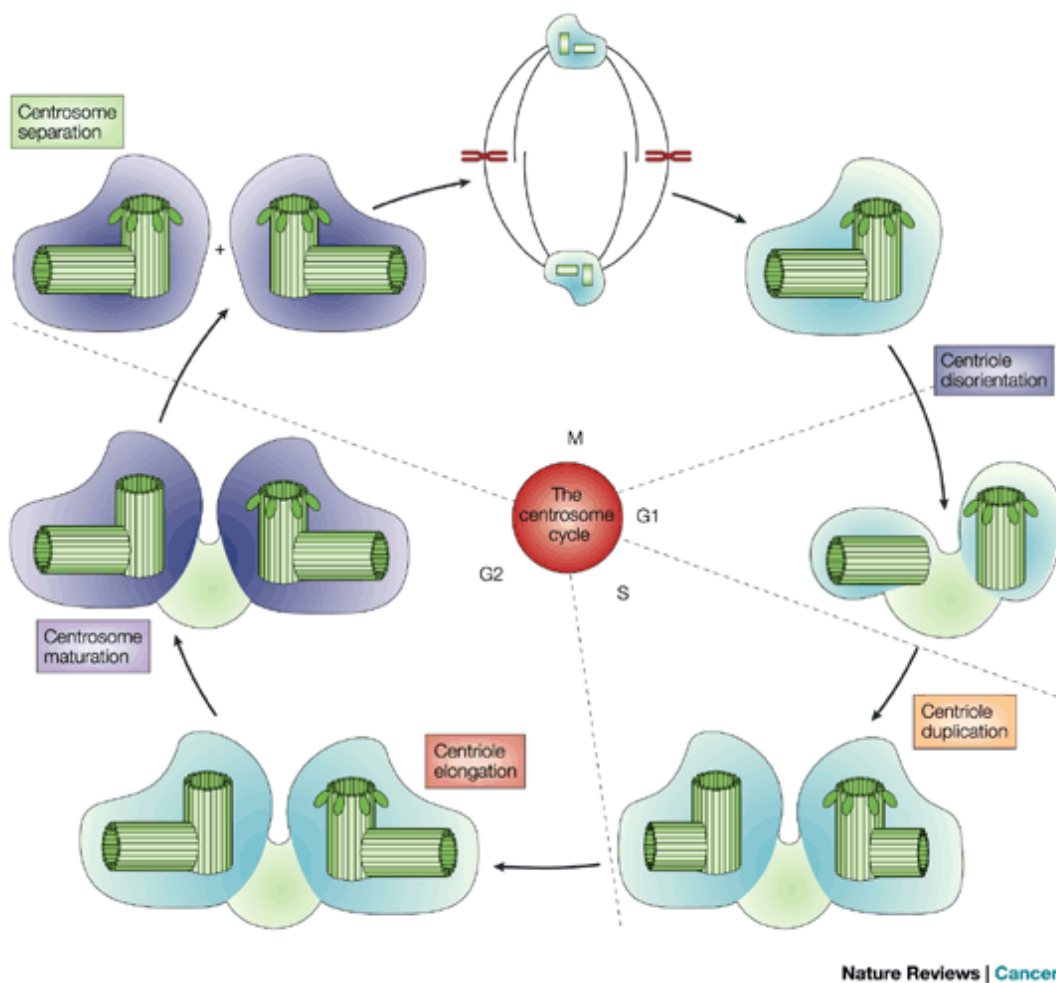


Abbildung 3: Zentrosomale Veränderungen während des Teilungszyklus; die rechtwinklige Anordnung von Mutter- und Tochterzentriol ist klar erkennbar, entnommen aus (Erich A. Nigg, 2002)

#### 2.4 Funktion von CEP161

CEP161 ist eine erst kürzlich entdeckte Komponente des Zentrosoms von *D. discoideum*. Das Protein wurde als Bindepartner des perizentriolären Proteins CP250 in Koimmunpräzipitationsexperimenten mit Hilfe der Massenspektrometrie identifiziert. CEP161 spielt sowohl im Wachstum als auch in der Entwicklung von *D. discoideum* eine wichtige Rolle, da eine Überexpression des Vollängenproteins und einzelner Domänen

das Wachstum von *D.discoideum* beeinträchtigt und zu einer verzögerten Entwicklung führt (Sukumaran et al., 2015). Es wird von einem Gen, *cepL*, auf Chromosom 3 kodiert, welches 4146 Basen umfasst, und ist das Ortholog des zentrosomalen Proteins CDK5RAP2 in Säugetieren. CDK5RAP2 ist ein perizentrioläres Protein. Mutationen im Gen verursachen autosomal-rezessiv vererbte primäre Mikrozephalie 3 (MCPH3). Dies wird möglicherweise bedingt durch seine Rolle als Kontrolleur der korrekten Zentriolenreplikation (Megraw et al., 2011).

Autosomal-rezessive primäre Mikrozephalie (MCPH) ist eine genetische Erkrankung, bei der die neuronale Entwicklung gestört ist. Die betroffenen Individuen werden mit einem verkleinerten Kopf und einem kleinen Gehirn geboren, auf Grund eines reduzierten Cortex. Die Struktur des Gehirns selber ist normal. Die intellektuellen Fähigkeiten der Patienten sind beeinträchtigt, während es häufig keine weiteren Störungen gibt (Mahmood et al., 2011). MCPH ist darüber hinaus zu einem interessanten Forschungsgebiet geworden, da man annimmt, dass Veränderungen in MCPH-Genen vermutlich auch für die Zunahme der Gehirngröße während der Evolution des Menschen verantwortlich sind (Woods et al., 2005).

Eine vom Institut für Biochemie I der medizinische Fakultät der Universität zu Köln beschriebene Mutation im CDK5RAP2 Gen, die mit primärer Mikrozephalie assoziiert ist, verursacht ein verfrühtes Stopp-Codon und behindert somit die regelhafte Expression des Proteins. Aufgrund dessen leiden die Patienten unter einem verminderten occipitofrontalen Umfang des Kopfes, einer verminderten Gehirnmasse, sowie geistiger Retardation. In primären Fibroblasten der Patienten konnte eine starke Reduktion in der Expression des CDK5RAP2 Proteins beobachtet werden. Auf Zellebene führte dies zu

zentrosomalen und nukleären Abnormalitäten, Veränderungen der Zellgröße und Zellmigration (Sukumaran et al., 2017).

CP250, der Interaktionspartner von CEP161, hat wichtige zelluläre Funktionen. Dies wurde deutlich durch Untersuchungen an Zellen, denen CP250 fehlt. Dort sind sowohl Zellwachstum, als auch Entwicklung und Bewegung beeinträchtigt (Blau-Wasser et al., 2009). Für CEP161 konnten keine Mutanten erzeugt werden, denen das Protein fehlt. Es wird angenommen, dass dies ein letales Ereignis ist, da auch im Menschen kein vollständiger Verlust des orthologen Proteins beobachtet worden ist. Allerdings sind Zellen erzeugt worden, in denen sowohl das Volllängenprotein, als auch verkürzte CEP161 Proteine überexprimiert wurden. Dies beeinträchtigte die Zellen und führte unter anderem zur Zunahme des Zelldurchmessers. Darüberhinaus waren das Wachstum und die Entwicklung beeinträchtigt (Sukumaran et al., 2015).

### 2.5 Rolle von Phosphatasen am Zentrosom

Reversible Phosphorylierung von Proteinen während des Zellzyklus und der Mitose spielt eine zentrale Rolle in eukaryotischen Zellen. Phosphatasen nehmen somit eine führende Funktion in der Kontrolle des mitotischen Ablaufs ein, wie z.B. bei dem Eintritt in die Mitose, der architektonischen Beschaffenheit und dem Zusammenhalt von Chromosomen und auch bei der Beendigung des Teilungszyklus (Kim et al., 2016). Aufgrund dessen führt von der Regel abweichende Phosphorylierung auch zu vielen pathologischen Prozessen und Krankheitsbildern. Wegen ihrer wichtigen Stellung müssen Phosphatasen streng reguliert werden. Ihre Tätigkeit muss in Balance mit ihren Gegenpartnern, den Kinasen, gehalten werden.

In Hefe ermöglichen die Phosphatasen Cdc25B und Cdc25C, beides Phosphatasen mit einer dualen Spezifität, den Eintritt in den mitotischen Teilungszyklus durch Entfernen inhibitorischer Phosphorylierungen an der Cyclin-abhängigen Kinase Cdk1 (Lindqvist et al., 2005). Im Fadenwurm *C. elegans* bildet PP2A-B'' mit RSA1, einer Untereinheit, die für die Lokalisation von PP2A am Zentrosom wichtig ist, und RSA2, das RSA1 bindet und zum Zentrosom bringt, einen Komplex, der ausgehend von seiner Position an den Zentrosomen das Auswachsen der Mikrotubuli koordiniert und ihre Stabilität garantiert (Schlätz et al., 2007). PP2A-B56 dagegen fördert die Interaktion zwischen Spindelapparat und Chromosomen (Kim et al., 2016).

Die humane Ssu72, eine Phosphatase mit dualer Aktivität, bindet direkt an Kohäsin, das die Schwesterchromatiden während des Zellzyklus zusammenhält. Dabei ist Ssu72 in der Lage, direkt in diesen Zusammenhalt einzugreifen und ihn zu regulieren. Wenn diese Aktivität nicht korrekt von Ssu72 ausgeführt wird, führt dies zu verschiedensten Problemen. Der Ausfall dieser Kontrolle führt z.B. zu verfrühtem Verlust des Zusammenhalts zwischen den Chromatiden. Des Weiteren hat Ssu72 eine wichtige Rolle in der Chromosomen Architektur (Kim et al. 2010; 2013).

PP2A besitzt ebenfalls eine Rolle im Zusammenhalt der Geschwisterchromatiden. Es verhindert an den Zentromeren im Zusammenspiel mit Shugosin die Dissoziation von Kohäsin. Shugosin und Kohäsin sind ein Ziel der Polokinase und dissoziieren im phosphorylierten Zustand von den Zentromeren (Gutiérrez-Caballero et al., 2012). Ausserdem ist PP2A bereits in die Chromosomenkondensation während der Mitose involviert und ermöglicht im Komplex mit TBP (TATA-binding protein) eine effiziente Regulation (Xing et al., 2008).

Um den mitotischen Zyklus zu verlassen, sind weitere Phosphatasen, wie z.B. Cdc14, notwendig. In Hefe hat Cdc14 die Möglichkeit, Cdk1 und all seine Substrate zu inaktivieren. Welche Phosphatasen in eukaryotischen Zellen diesen Schritt hin zum Verlassen des Teilungszyklus ermöglichen, ist noch nicht bekannt.

Durch diese zentralen Rollen in der Regulation wiegen Fehler in der Aktivität der Phosphatasen schwer. So ist PP2A in Kombination mit verschiedenen regulatorischen Untereinheiten bei fehlerhafter oder fehlender Aktivität für eine große Anzahl an Krankheiten verantwortlich. Dazu zählen unter anderem Brust-, Lungen- und Prostatakrebs. Zudem ist auch PP1 verantwortlich für verschiedenste Krankheiten wie AIDS und Hepatitis, wenn genetische Fehler z.B. eine Überexpression von PP1 bedingen (Kim et al., 2016).

Der Verlust von Ssu72 resultiert in der Ausbildung einer Fettleber (steatosis hepatis) ohne den Konsum von Alkohol als grundlegenden Stimulus. Das Wissen über diese entscheidende Rolle wird in Zukunft neue therapeutische Ansätze ermöglichen und zudem auch die Entwicklung spezifischer Medikamente, wie z.B. selektive Ssu72 Phosphatase Modulatoren, in den Fokus der Medizin rücken.

## 2.6 Fragestellungen und Ziel der Arbeit

Die regulatorische PP2A Untereinheit phr2AB ist das *D. discoideum* Ortholog von B55, der regulatorischen Untereinheit in Säugern. Sie wurde als Bindepartner des zentrosomalen Proteins CEP161 identifiziert. Zielsetzung dieser Arbeit ist, die Interaktion mit unabhängigen Methoden zu bestätigen und zu untersuchen, ob diese Interaktion direkt oder indirekt ist. Darüberhinaus soll herausgearbeitet werden, an welchen Bereich von CEP161 phr2AB bindet. In Immunfluoreszenzanalysen soll die Lokalisation von phr2AB festgestellt werden. Schließlich sollen die Konsequenzen einer Überexpression von phr2AB als GFP-Fusionsprotein auf Eigenschaften von *D. discoideum* analysiert werden.

### **3) Material und Methoden**

#### **3.1 Material**

##### **3.1.1 Labormaterial**

Western blot: Nitrocellulose Blotting Membrane 0,2 µm NC	Amersham™Protran™
Deckgläschen 12 mm, 15 mm, 18 mm	VWR
Einweg-Pipetten, 5 ml, 10 ml und 25 ml	Sarstedt
Einweg-Pipettenspitzen	Greiner
Objektträger	Menzel
Tissue Culture Dish	Falcon
Parafilm	Bemis
Petrischalen, 10 cm Typ 3003	Falcon
Petrischalen, 3,5 cm Typ 3801	Falcon
Reaktionsgefäße 0,5 ml, 1,5 ml, 2,2 ml	Sarstedt
Tubes 50 ml	Greiner
GFP-Trap® Beads	Chromotek
GST-Beads (Glutathione Agarose 4B)	Protino®
ChemiGlow West - Chemiluminescence Substrate Kit (100ml)	Proteinsimple
Myc-Trap®_A	Chromotek
Spritze (HeLa-Versuch)	Microlance™ 3; 27G¾ - Nr.20; 0,4 × 19mm

##### **3.1.2 Laborgeräte**

Heizblock	Digi Block JR	Laboratory Devices Inc
Magnetrührer	MR 3001 K	Heidolph
Mikroskope	Leica DMIL	Leica
	Leica DMI 6000B	Leica
	Leica TCS SP5	Leica
Rüttler	Lab Shaker	Kühner

Spannungsverstärker	Power Pac 200	Bio-Rad
Vortexer	Vortex REAX Top	Heidolph
Zentrifugen	Allegra X-22R Centrifuge	Beckman
	5417 C Centrifuge	Eppendorf
Kamera	CCD Color Camera	
	Model KP-F0140F-S1	
Ultraschallgerät	Hielscher	

Mikroskop Software: LAS AF Lite for Confocal Systems

Diskus - Programm (Zellanzahl-Bestimmung durch Zählen mithilfe der CCD Color Camera)

### 3.1.3 Chemikalien

Acrylamid-Solution (30%)	PanReac AppliChem
Agar-Agar (BRC-RG)	Biomatic
5-Amino-2,3-Dihydro-1,4-Phtalazindion (Luminol)	Appllichem
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Roth
4,6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI)	Sigma
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Merck
Essigsäure 98-100%	Sigma
Ethanol	Sigma
Fischgelatine	Sigma
Gelvatol	Pfizer
Glucose	Merck
Glycerin (Glycerol)	Merck
Glycin	Merck
Hefeextrakt	Oxoid

Hydroxyzimtsäure/ Coumaric acid	Sigma
Isopropanol	Merck
Kaliumchlorid	Sigma
Kaliumdihydrogenphosphat	Sigma
Kaliumhydroxid	Merck
Lysozym	AppliChem
Maltose	Merck
Magnesiumsulfat	Merck
$\beta$ -Mercaptoethanol	Sigma
Methanol	Sigma
Natriumchlorid	Sigma
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva
Natriumhydrogenphosphat	Merck
NP40	Calbiochem
Pepton	Oxoid
Phosphorsäure	Merck
PonceauS Konzentrat	Sigma
Rinderserumalbumin (BSA)	Roth
Salzsäure	Sigma
Sarcosyl	Sigma
Triethylendiamin (DABCO)	Sigma
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Merck
Tris(hydroxymethyl)aminomethan	Sigma
Triton X-100	Roth
(Octylphenylpoly(ethylenglykolether))	
Tween 20 (Polyoxyethylensorbitan-monolaurat)	Sigma
Wasserstoffperoxid (30% ige Lösung)	Fluka

### 3.1.4 Medien und Puffer für *D. discoideum*

#### AX2-Medium (pH 6,7):

7,15 g Hefeextrakt  
14,3 g Pepton  
18,0 g Maltose  
0,486 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$   
0,616 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_2 \times \text{H}_2\text{O}$   
Mit Phosphorsäure auf pH 6,7 eingestellt, mit  $\text{H}_2\text{O}$  auf 1 Liter aufgefüllt

#### Soerensen-Phosphatpuffer (pH 6,0):

3,56 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$   
19,97 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$   
auf pH 6,0 eingestellt

#### Phosphat-Agarplatten (pH 6,0):

12 g Agar  
100 ml Soerensen-Phosphatpuffer  
auf pH 6,0 eingestellt, mit  $\text{H}_2\text{O}$  auf 1 Liter aufgefüllt

#### SM-Agarplatten (pH 6,5):

10 g Agar agar  
10 g Pepton  
10 g (55 mmol) Glucose  
1 g Hefeextrakt  
1 g (4,1 mmol)  $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$   
2,2 g (16,2 mmol)  $\text{KH}_2\text{PO}_4$   
1 g (5,7 mmol)  $\text{K}_2\text{HPO}_4$   
mit  $\text{H}_2\text{O}$  auf 1 l auffüllen.

#### 1 x TBS-T-Puffer (pH 8,0):

150 mM NaCl  
10 mM Tris-HCl  
0,2% Tween 20  
auf pH 8,0 eingestellt

1 x TBS-IF

150 mM NaCl  
2 mM KCl  
10 mM Tris-HCl pH 7,4

1 x PBS (pH 7,2):

8,0 g NaCl  
0,2 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
1,15 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
0,2 g KCl  
auf pH 7,2 eingestellt, mit H<sub>2</sub>O auf 1 Liter aufgefüllt

1 x PBG -Puffer

1 x PBS  
0,5% BSA  
0,045% Fischgelatine

1 x PG-Puffer

1 x PBS  
100 mM Glycine

1 x RIPA Puffer (Lysis-Puffer)

50mM Tris-HCl, pH 7,5  
150 mM NaCl  
1% Nonidet P-40  
0,5% Na-desoxycholat

1 x RIPA light (wash Puffer)

50 mM Tris-HCl, pH 7,5  
50 mM Na Cl  
0,5 % NP40  
0,5 % Na-desoxycholat

5 x SDS-Probenpuffer (20 ml):

3,12 ml 1 M Tris-HCl, pH 6,8  
10 ml 10% SDS  
5 ml Glycerin  
2 ml 14,3 M  $\beta$ -Mercaptoethanol

10 x SDS-PAGE-Laufpuffer:

30,25 g Tris  
144 g Glycin  
100 ml 10% SDS  
mit H<sub>2</sub>O auf 1 Liter aufgefüllt

STE Puffer:

10 mM Tris-HCl, pH 8,0 (1 M) – 0,5 ml 1M/ 50 ml  
150 mM NaCl (5 M) - 1,5 ml 5 M/ 50 ml  
1 mM EDTA (0,5 M) - 0,1 ml 0,5 M/ 50 ml

Wet-Blot-Puffer:

14,8 g Glycin  
3 g Tris, lösen in 1 Liter H<sub>2</sub>O

3.1.5 Zusammensetzung der Polyacrylamidgele

Trenngel (10 %; 100 ml):

39,6 ml H<sub>2</sub>O  
33,4 ml 30 % Acrylamid  
25,0 ml 1,5 M Tris-HCl, pH 8,8  
1,0 ml 10 % SDS  
1,0 ml 10 % APS  
0,04 ml TEMED

Sammelgel (5 %; 25 ml):

17 ml H<sub>2</sub>O  
4,25 ml 30 % Acrylamid  
3,125 ml 0,5 M Tris-HCl, pH 6,8  
0,25 ml 10 % SDS  
0,25 ml 10 % APS  
0,025 ml TEMED

3.1.6 Antikörper

A) Westernblot:

1. Antikörper	K3-184-2 anti-GFP Maus	monoklonal
2. Antikörper	anti-Mouse IgG Peroxidase konjugiert	Sigma A4416

### B) Immunfluoreszenz:

1. Antikörper		
1.1	Kaninchen anti-GFP (1:5000)	polyklonal
1.2	Maus anti-CP250 (1:3)	monoklonal
1.3	K68-139-8 monoklonal Ratte anti-Tubulin YL $\frac{1}{2}$ (1:5)	monoklonal
2. Antikörper		
2.1	Alexa Fluor 488; Donkey anti-rabbit IgG	Molecular Probes A 21206
2.2	Alexa Fluor 568; Donkey anti-mouse IgG	Molecular Probes A 10037
2.3	Alexa Fluor 568; Goat anti-rat IgG	Molecular Probes A 11077

### C) pulldown phr2ab:

1. Antikörper	Rabbit anti-CEP161	polyklonal ; Pineda
2. Antikörper	anti-Kaninchen IgG Peroxidase Konjugat 6154 (1:10.000)	Sigma

### D) pulldown CEP161 (*D. discoideum*):

1. Antikörper	K3-184-2-Maus GFP	monoklonal
---------------	-------------------	------------

### E) HEK293T Zellen:

1. Antikörper	PP2AB Subunit Antibody	Cell Signaling Technology®
---------------	------------------------	----------------------------

### 3.1.7 Antibiotika

Alle Antibiotika wurden gemäß den Herstellerangaben angesetzt und gelagert.

Dihydrostreptomycinsulfat 40 µg/ml

Sigma

BlasticidinS 2 µg/ml

ICN Biomedicals

G418 (Geneticin) 1 µg/ml

Sigma

### 3.1.8 Inhibitoren für Pulldown

5 mM DTT (1 M) – 35 µl/ 7 ml

5 mM Benzamidin (1 M) – 7 µl/ 7 ml

1× Pefablock (100×) – 70 µl/ 7 ml

evtl. noch 1×Proteaseinhibitor Cocktail (50×) – 140 µl/ 7 ml

10 µg/ µl Aprotinin und Leupeptin (10 mg/ ml) - je 7 µl/ 7 ml

### 3.1.9 Inhibitoren für Arbeiten mit Lysaten von HEK293T Zellen

1mM DTT

1mM Benzamidin

1× PEFA-Block

10µg/ml Aprotinin

10µg/ml Leupeptin

1mM EDTA

## **3.2 Methoden**

### 3.2.1 Wachstumsanalysen (*D. discoideum* Zellen)

#### 3.2.1 A) in axenischem Medium

In diesem Versuch wurde das Wachstum der jeweiligen Zellstämme in axenischem Medium (AX2-Medium) untersucht. Dabei wurde die Zellzahl jeweils nach 24 Stunden bestimmt und die erhobenen Werte mit den Ausgangswerten verglichen, um das Wachstumsverhalten zu beurteilen. Dieser Versuch erlaubt es auch, die Fähigkeit der Zellen zur Makropinozytose zu beurteilen, da *D. discoideum* unter diesen Bedingungen mit Hilfe der Makropinozytose die flüssige Nahrung aufnimmt.

Um das Wachstum der Zellen zu fördern, wurden sie kontinuierlich mit 160 Kreisbewegungen pro Minute (160 rpm) in Erlenmeyerkolben geschüttelt. Dies

unterstützt die Versorgung der Zellen mit Sauerstoff und die gleichmäßige Verteilung im Nährmedium, sodass die Zellen sich nicht am Boden absetzen. Bei konstanter Raumtemperatur (22°C bis 23°C) wird so ein optimales Wachstumsverhalten unterstützt.

Das Zählen der Zellen erfolgte mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer am Mikroskop. Dazu wird ein spezielles Glasplättchen auf der Neubauer Zählkammer befestigt und einige Tropfen der jeweiligen Zellprobe mit einer sterilen Pasteurpipette auf die Zählkammer gegeben. Danach wird anhand der vorgegeben Kästchen der Zählkammer die Anzahl der jeweiligen Zellen bestimmt.

### 3.2.1 B) auf Klebsiella Rasen

Dieser Versuch wird auf SM-Agarplatten durchgeführt, die mit *Klebsiella aerogenes* (K. a.) als Nahrungsquelle beschichtet sind (Abbildung 4). K. a. sind gramnegative stäbchenförmige Bakterien der Familie Enterobacteriaceae. Mit diesem Experiment wird die Fähigkeit der Zellen zur Phagozytose getestet, also der Aufnahme von Partikeln. Für den Versuch werden 30 µl AX2-Nährmedium in die Mitte der Agarplatte gegeben. Danach werden mit einer ausgeglühten sterilen Impföse *Klebsilla* Bakterien von einer Vorkultur auf einer Kobalt-haltigen Platte abgenommen und vorsichtig neben das Nährmedium auf die Agarplatte aufgetragen. Mit einem mit Alkohol abgeflamnten, somit sterilen Drigalski-Spatel, werden das Medium und die Bakterien gleichmäßig auf der Agarplatte verteilt. Zur besseren Übersicht des Wachstumsverhaltens wird ein Punkt auf der Agarplatte mit Marker von außen angebracht. Auf diese Stelle wird der jeweilige Zellstamm gegeben. Dafür wird eine Pipette kurz in die jeweilige Zellkultur

getaucht und die Zellen werden mit der Pipettenspitze auf die markierte Stelle der Agarplatte aufgebracht.

In den darauf folgenden Tagen wird anhand des Orientierungspunktes auf der Agarplatte das Wachstum der jeweiligen Kulturen beobachtet und im 24 Stunden Rhythmus dokumentiert und verglichen.

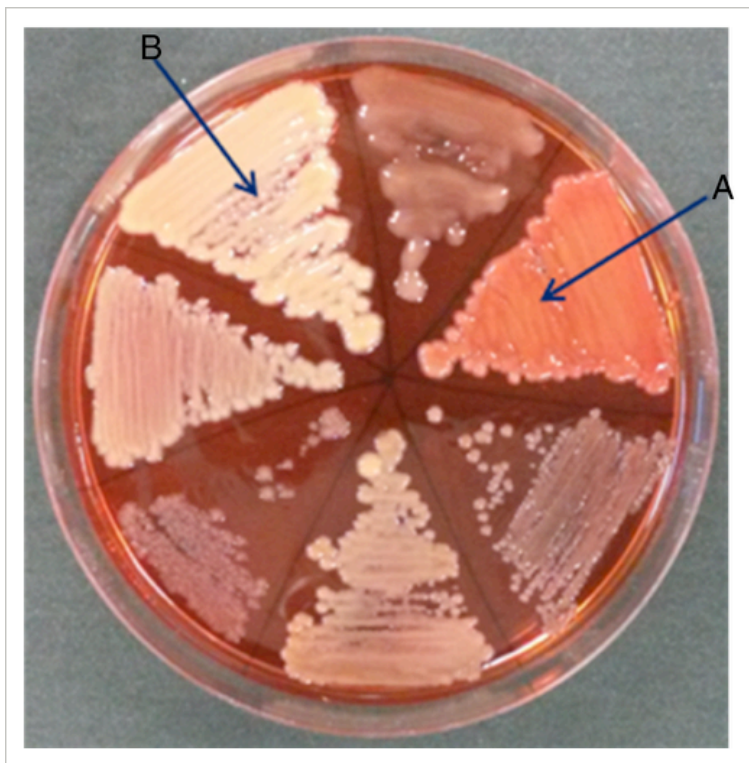


Abbildung 4: Agarplatte mit *Klebsiella*-Wachstum. Das bakterielle Wachstum ist deutlich als weißer Belag zu sehen. Die Farbunterschiede ergeben sich durch die Menge an produzierten Exopolysacchariden, wobei die Bakterien in (A) mehr Exopolysaccharide produzieren als die Bakterien in (B), entnommen aus (Vuotto et al., 2017)

### 3.2.2 Westernblot

Der Westernblot dient dem Nachweis von Proteinen mit Hilfe spezifischer Antikörper. Dabei trennt man in einem Polyacrylamidgel, welches wie ein molekulares Sieb wirkt, die Proteine nach ihrer Größe auf und überträgt sie mit Hilfe eines elektrischen Feldes auf eine Membran. Dabei ist die Wanderungsgeschwindigkeit im jeweiligen Gel von der Molekülgröße und der Konzentration des Gels abhängig. Je kleiner das Protein, desto schneller wandert es in dem Gel. Je höher die Konzentration, desto langsamer laufen die Proteine.

Nach Beendigung der Gelelektrophorese werden die Proteine auf eine Membran übertragen und können dann mit Hilfe von Antikörpern nachgewiesen werden. Zu diesem Zweck müssen jedoch zuerst die freien Bindungsstellen auf der Membran mit Proteinen, die nicht vom Antikörper erkannt werden, blockiert werden, um eine unspezifische Bindung an die Membran zu verhindern. Dies erreicht man durch die Behandlung der Membran mit Milchpulver.

Nacheinander werden daraufhin Erst- und Zweitantikörper dazugegeben und dazwischen immer wieder mit Puffer gewaschen, um überschüssige oder unspezifisch gebundene Antikörper zu entfernen. Der Primärantikörper bindet sich an das gesuchte Protein, der Sekundärantikörper erkennt den Primärantikörper.

Der Sekundärantikörper ist in der Regel an ein Enzym gekoppelt, welches eine Farbreaktion katalysiert, die durch die Zugabe eines entsprechenden Substrats gestartet werden kann. Als weitere Option kann der Sekundärantikörper auch radioaktiv

markiert oder Peroxidase-gekoppelt sein. Bei Letzterem erfolgt der Proteinnachweis anhand von Chemolumineszenz.

#### Analyse von *D. discoideum* Zellhomogenaten im Western Blot

Hierbei wurde das Wet-Blot-Verfahren verwendet, ein Transfer im feuchten Milieu.

Zunächst wurden zur Herstellung von *D. discoideum* Zellhomogenaten jeweils  $2 \times 10^6$  Zellen der jeweiligen Zellkultur mit 2000 rpm (rounds per minutes) 2 Minuten in der Eppendorf-Tischzentrifuge pelletiert. Das überstehende Medium wurde vollständig abgesaugt und die Zellen mit kaltem Soerensen Phosphatpuffer gewaschen, um Mediumreste zu entfernen. Daraufhin wurden 100  $\mu$ l SDS-Probenpuffer auf die Zellen gegeben. Das Ganze wurde dann bei 95°C für 5 Minuten erhitzt. Durch diesen Schritt werden die Zellen lysiert, die Proteine denaturiert und mit SDS umgeben, um so die Proteinauftrennung nach der Größe zu ermöglichen.

10  $\mu$ l der Proben (entspricht  $2 \times 10^5$  Zellen) wurden in die Taschen eines 10% Polyacrylamidgels (Trägermaterial) gegeben. Das Proteingel war in einer Laufkammer befestigt und mit Agarose abgedichtet. SDS-Lauf-Puffer wurde in die beiden Kompartimente der Kammer gegeben und Strom an die Kammer angeschlossen. Zusätzlich zu den Proben wurden 5  $\mu$ l eines prestained Markers links neben die Proben aufgetragen. Danach wurde mit 150 V über 2 Stunden die Auftrennung der Proben durchgeführt.

Da die Proteine durch die SDS-Behandlung negativ geladen sind, wandern sie bei Stromfluss zur Anode (+ Pol). Somit findet der Proteintransfer in Richtung der positiven

Ladung statt. Polyacrylamidgele zur Auftrennung von Proteinen bestehen aus einem Sammelgel mit niedrigerer Acrylamidkonzentration und einem Trenngel mit einer höheren Acrylamidkonzentration mit unterschiedlichem pH.

Sie stellen somit ein diskontinuierliches System dar. Dies erlaubt die Konzentration der Proteine an der Grenze zwischen Sammel- und Trenngel und somit eine gute Trennung.

Für den Transfer der Proteine wurde das Gel auf eine Nitrocellulosemembran (Nitrocellulose Blotting Membrane 0,45 µm; Transfermembran) gelegt und jeweils mit 2 Whatman-Filtern und einem Schwamm pro Seite versehen. Sowohl Membran als auch Filterpapier waren in Blot-Puffer angefeuchtet worden.

Abblauf eines Western Blots siehe Abbildung 5.

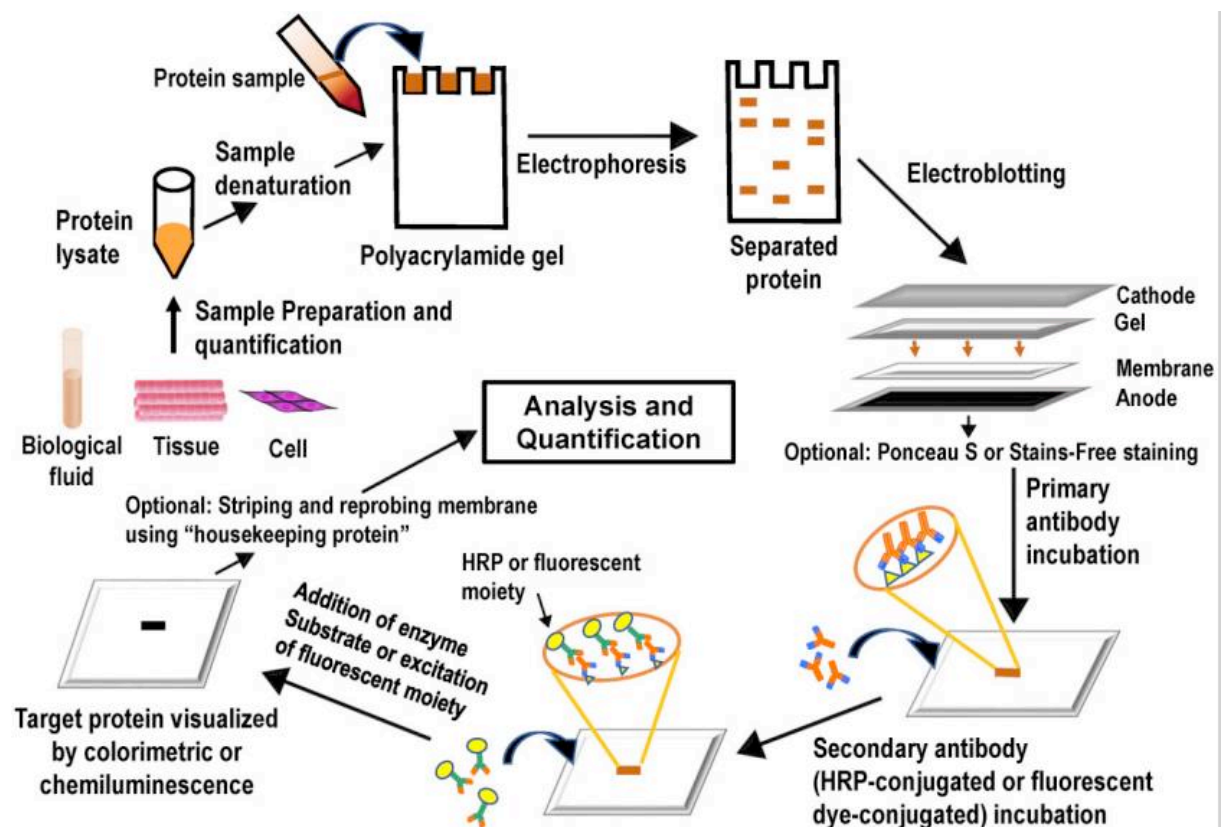


Abbildung 5: Darstellung der Abläufe während eines Western Blots, entnommen aus (Mishra et al., 2017)

Über Nacht wurde die Kammer an 100 mA angeschlossen, wobei sie auf einem Magnetrührer in den Kühlraum gestellt war, um den Puffer ständig zu durchmischen. Nach ca. 12 Stunden wurde die Membran abgenommen und die Proteine auf der Membran mit PonceauS angefärbt (Abbildung 6). Das Anfärbemittel wurde auf die Transfermembran gegeben und überschüssige Farbe mit destilliertem Wasser abgespült. Die Membran wurde dann mit TBS-T Puffer mehrfach gewaschen.

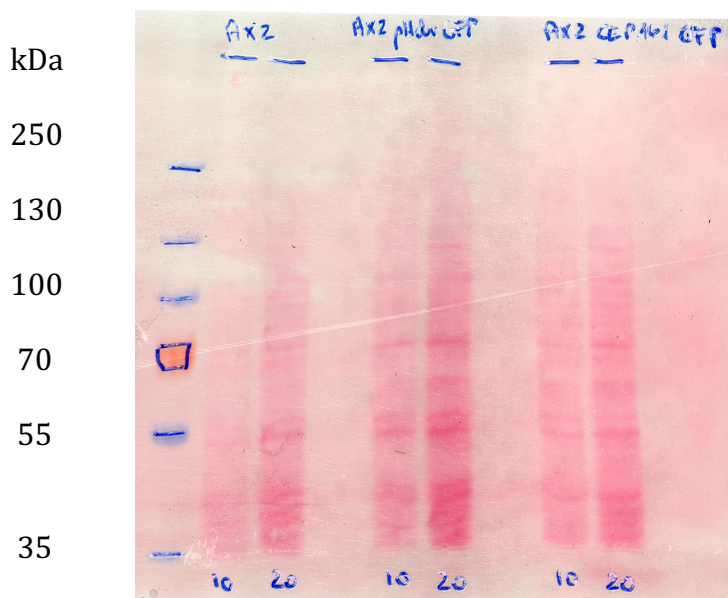


Abbildung 6: Beispiel eines Western Blots mit unterschiedlichen Zellhomogenaten (10% Acrylamid). Links sind die Molekulargewichte der Markerproteine in kDa angegeben.

Anschließend wurde die Membran in Milchpulver (4 g auf 100 ml TBS-T (4%)) gelegt und 1 Stunde auf einem Schüttler gleichmäßig geschüttelt, um später nichtspezifische Bindungen der Antikörper an die Membran zu verhindern. Das Milchpulver wurde mit TBS-T gewaschen und die Membran mit dem ersten Antikörper (in TBS-T) für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert.

Dann wurde die Membran erneut mit TBS-T Puffer einige Male gewaschen, bevor der zweite Antikörper, der an eine Peroxidase gekoppelt war, zugegeben wurde. Der Zweitantikörper wurde 1:10.000 in TBS-T Puffer verdünnt (1 µl des Antikörpers in 10 ml TBS-T) und danach auf die Membran gegeben. Das Ganze wurde erneut 1 Stunde auf dem Schüttler geschüttelt, damit die Membran gleichmäßig benetzt werden konnte. Nach der Einwirkzeit wurde der zweite Antikörper entfernt und der Filter 3×5 Minuten mit TBS-T geschüttelt. Zum Detektieren der hybridisierten Proteine wurde eine Lösung aus 5 ml Luminol (Detektionsreagenz) + 5 ml 4IPBA (4-Iodophenylboronic acid) hergestellt. Zu dieser wurden 5 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30%) gegeben. Dieses startet die Peroxidasereaktion. Die Transfermembran wurde 1 Minute in die Lösung gelegt und dann an einem Film exponiert (für Sekunden bis eine Stunde) (Chemilumineszenz). Die Filme wurden in einer Entwicklermaschine entwickelt.

### 3.2.3 Immunfluoreszenz

Mit der Immunfluoreszenz können ganze Zellen bis hin zu Gewebeschnitten eingefärbt werden. Die Färbung lässt sich mit Hilfe spezieller Mikroskope detektieren. Dies ermöglicht den Nachweis bestimmter Strukturen und Proteine.

Dafür werden Antikörper mit einem fluoreszierenden Farbstoff versehen und können dann zum Nachweis ihres spezifischen Antigens genutzt werden. In den meisten Fällen ist dieser Farbstoff ein Fluorochrom, das von Licht spezifischer Wellenlänge angeregt wird, und daraufhin ein spezifisches Signal emittiert.

Es wird zwischen direkter und indirekter Immunfluoreszenz unterschieden. Bei der Ersteren wird der Antikörper direkt markiert. Sie ist aber eher unüblich. Die indirekte

Immunfluoreszenz ist hingegen die gängige Methode zum Antigennachweis. Dafür ist der fluoreszierende Farbstoff nicht an den primären Antikörper gebunden, sondern erst an einen sekundären Antikörper, der sich gegen den zuerst verwendeten Antikörper richtet, z. B. Anti-Maus-IgG, wenn der erste Antikörper aus einer Maus stammt (Beutner, 1961).

Für die Immunfluoreszenzanalyse von *D. discoideum* Zellen wurden Petri-Schalen mit einem Durchmesser von 6 cm benutzt, in die  $2 \times 10^5$  Zellen pro  $\text{cm}^2$  gegeben wurden. In den Petri-Schalen wurden mehrere Deckgläschen (acht Stück pro Schale) mit einem Tropfen Vaseline fixiert. Dann wurde in jede der Schalen 4 ml AX2 Nährmedium gegeben. Daraufhin wurden die Zellen der jeweiligen Probe hinzugefügt. Nach dem Absitzen der Zellen für 15 bis 20 Minuten wurde die Flüssigkeit vollständig entfernt und eiskaltes Methanol (MeOH,  $-20\text{ }^\circ\text{C}$ ) in die Schalen gegeben und für 5 Minuten bei  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  gehalten. Mit diesem Schritt werden die Zellen permeabilisiert und die Proteine fixiert. Danach wurde das Methanol abgegossen und die Proben an der Luft getrocknet.

Zur besseren Übersicht wurde eine Glasplatte tabellarisch mit den jeweiligen Namen des ersten Antikörpers beschriftet, welcher auf die Deckgläschen gegeben werden sollte.

Um eine feuchte Atmosphäre in der Kammer zu generieren, in der die Glasplatte mit den Deckgläschen lag, wurden rechts und links feuchte Tücher neben die Glasplatte gelegt, so dass die Deckgläschen in der feuchten Kammer inkubieren konnten. Die Zellen wurden  $3 \times 5$  Minuten lang mit PG-Puffer behandelt. Nach der dritten Wiederholung wurde die gleiche Prozedur mit PBG-Puffer für  $2 \times 15$  Minuten wiederholt. Anschließend wurde der erste Antikörper aufgetragen und für mindestens eineinhalb Stunden in der feuchten Kammer zum Einwirken auf den Deckgläschen gelassen. Nach drei Waschschritten mit PBG (je 5 Minuten) und einem Waschschriff mit TBS-IF wurde der

zweite Antikörper, verdünnt in TBS-IF, auf die Deckgläschen gegeben und das Ganze wurde für ein bis zwei Stunden im Dunkeln inkubiert. Zur Inkubationslösung wurde DAPI (1mg/ml), ein Farbstoff der die DNA anfärbt, auf 1:1000 verdünnt hinzugegeben. Nach der Einwirkzeit wurde 3× 5 Minuten mit PBS gespült.

Die Deckgläschen wurden von der Glasplatte abgenommen, kurz in Wasser getaucht und mit einem Papiertuch überschüssige Flüssigkeit entfernt. Mit dem Einbettmittel Gelvatol wurden sie auf einem Objektträger befestigt, wobei die Seite mit den Zellen zum Klebstoff gewandt war. Für die Analyse wurden entsprechende Fluoreszenzmikroskope verwendet.

#### 3.2.4 Präzipitation (Pulldown) von GFP-Fusionsproteinen aus *D. discoideum*

Zur Herstellung der Zelllysate wurden  $2,3 \times 10^7$  *D. discoideum* Zellen mit Soerensen Phosphatpuffer zweimal gewaschen. Zwischen den Waschvorgängen wurden die Zellen jeweils 2 Minuten mit 2000 rpm bei 4°C zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 1 ml Lysis-Puffer aufgenommen und 15 Minuten auf Eis gestellt. Der Lysis-Puffer bewirkt die Zerstörung der Zellen, damit das Protein isoliert werden kann. Um die Zellen vollständig zu zerstören, wurden die Zellen auf Eis im Lysis-Puffer mit Ultraschall behandelt. Dabei wurden 3 × 20 Sekunden Ultraschall mit einer Amplitude von 30% angewendet, mit jeweils 10 Sekunden Pause dazwischen.

Danach wurde das Lysat 10 Minuten bei 16.400 rpm und 4°C zentrifugiert, um die restlichen nicht lysierten Zellen und Zellreste abzutrennen. Der Überstand (Protein-Lysat) wurde für 2 bis 3 Stunden im Kühlraum unter ständiger Drehbewegung mit äquilibrierten GFP-Trap®-A beads (Chromotek) inkubiert, damit die GFP-

Fusionsproteine an die GFP-beads binden konnten. Anschließend wurde das Lysat für 2 Minuten bei 4°C und 500 rpm zentrifugiert. Vom Überstand wurde eine Probe entnommen.

Die GFP-beads wurden mit 500 µl Wash-Puffer gewaschen und bei 500 rpm und 4°C für 2 Minuten zentrifugiert. Dieser Schritt wurde vier Mal wiederholt. Auf die gewaschenen Beads wurden 40 µl Wasser mit 10 µl SDS-Puffer gegeben. Daraufhin wurde die Probe bei 95 °C für 5 Minuten erhitzt, damit alle Proteine denaturieren und sich von den Beads lösen. Die Proteine wurden in einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und anschliessend auf eine Nitrozellulosemembran übertragen.

### 3.2.5 Pulldown mit GST-CEP161 Fusionsproteinen

#### Isolierung der GST-CEP161 Fusionsproteine

CEP161-D2 und -D3 wurden als GST (Glutathion S-Transferase) Fusionsproteine in *E. coli* XL1 Blue exprimiert (Sukumaran et al., 2015). Expressionsvektor war pGEX-4T-1. Die Expression der Fusionsproteine wurde bei einer optischen Dichte OD<sub>600 nm</sub> von ca. 0,6 mit 0,1 mM IPTG (isopropyl β-D-thio-galactosid) induziert. Anschließend wurden die Zellen bei Raumtemperatur über Nacht bei 250 rpm inkubiert und dann die Zellen durch Zentrifugation bei 7000 rpm für 10 Minuten geerntet und in 7 ml STE Puffer mit Proteaseinhibitoren lysiert. Die Lyse wird durch Zugabe von Lysozym (10 µg/ml) und durch Behandlung in einem Dounce Homogenisator (10 bis 20 Hoch- und Niederziehen des Glasstabs) unterstützt, gefolgt von einer 15-minütigen Inkubation auf Eis. Durch Zugabe von 1,5% Sarcosyl und anschliessender Ultraschallbehandlung (Amplitude 20%

für insgesamt eine Minute, 10 Sekunden Pulse und 10 Sekunden Pause) wurde sichergestellt, dass die Lyse vollständig war.

Das Homogenat wurde bei 4°C und 16.000 rpm für 30 Minuten zentrifugiert. Daraufhin wurde der klare Überstand abgenommen und in ein neues Gefäß überführt. Nach Zugabe von 2% Triton X-100 wurde das Lysat mit den Glutathione Sepharose beads, die mit GST-Fusionsproteinen beladen waren, zugegeben und bei 4°C im Kühlraum unter Drehen für zwei bis drei Stunden inkubiert. Die Sepharose wurde durch Zentrifugieren (2 min, 2000 rpm) pelletiert und anschließend fünf Mal mit 500 µl STE Puffer gewaschen. Ein Teil der Sepharose wurde für die Analyse im Proteingel mit SDS Probenpuffer versetzt. Die restlichen Proteinbeads können bei 4°C gelagert werden. Die Auswertung erfolgte per Westernblotanalyse.

### 3.2.6 Behandlung von *D. discoideum* mit Okadasäure

Okadasäure ist ein Toxin, das von marinen Algen und Schwämmen produziert wird. In der Forschung wird es als genereller Hemmer der Serin/Threonin Phosphatasen PP1 und PP2A eingesetzt. Die Wirkung auf die Phosphatasen ist konzentrationsabhängig, wobei PP2A bei niedrigeren Konzentrationen als PP1 gehemmt wird.  $2 \times 10^7$  Zellen von jeweils AX2 und AX2 phr2AB-GFP wurden zweimal mit Soerensen Phosphatpuffer gewaschen. Zwischen jedem Waschschrift wurden die Zellen mit 1500 rpm 5 Minuten abzentrifugiert.

$5 \times 10^6$  Zellen wurden anschließend in 2 ml Soerensen Phosphatpuffer aufgenommen und mit Okadasäure inkubiert. Dafür wurden jeweils 5 Kolben von AX2 und AX2 phr2AB-GFP mit aufsteigenden Konzentrationen von Okadasäure inkubiert.

Um einen Vergleich zu ermöglichen, wurde zu den ersten Kolben kein Toxin hinzugefügt. In den 2. Kolben wurden 0,25  $\mu\text{M}$ , in den 3. Kolben 0,5  $\mu\text{M}$  und in den 4. Kolben 1,5  $\mu\text{M}$  Okadasäure der Stocklösung (100  $\mu\text{M}$ ) gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 3,5 Stunden bei leichtem Schütteln wurden die Zellen mit Methanol fixiert und mit dem monoklonalen Antikörper K29-359-31 (1:2 verdünnt) und DAPI inkubiert. Der Antikörper K29-359-31 erkennt das Zentrosom (Xiong et al., 2008). Anschließend wurden mit Hilfe des Immunfluoreszenzmikroskops Aufnahmen der Zellen gemacht. Anhand der Bilder wurde der Zellkerndurchmesser bestimmt und prozentual ausgewertet.

### 3.2.7 Immunpräzipitation der humanen PP2A - Subunit B aus HEK293T Zellen

#### A) Was sind HEK Zellen?

HEK Zellen sind eine Zelllinie, die von einer humanen embryonalen Niere abstammt (Thomas und Smart, 2005). Sie lassen sich leicht transfizieren und werden für die Expression rekombinanter Proteine vor allem in der Krebsforschung genutzt. Die Zellen sind in der Lage die meisten posttranslationalen Modifikationen diverser Proteine durchzuführen und können somit eine große Auswahl an Säugetier- und Nicht-Säugetier-Proteinen herstellen. In den beschriebenen Versuchen wurden HEK293T Zellen verwendet.

## B) Kultivierung und Transfektion von Säugerzellen und Herstellung von Lysaten für Präzipitationsexperimente

Die Zellen werden in einer feuchten Atmosphäre mit 5% CO<sub>2</sub> bei 37°C in DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium, mit hoher Glukosekonzentration, Life Technologies), das 10% fötales Rinderserum (FBS), 2 mM Glutamine (SIGMA) und 1% Penicillin/Streptomycin enthielt, gehalten. Transiente Transfektionen wurden mit der PEI Transfektionsmethode durchgeführt.

Die transfizierten Zellen wurden mit Hilfe eines Gummischabers von den Schalen abgeschabt, bei 200×g für 5 min bei 4 °C zentrifugiert und mit PBS gewaschen. Die Zellen werden daraufhin in Lysis Puffer (RIPA-Puffer mit Proteaseinhibitoren und 1×PhosSTOP) aufgenommen und für den Aufschluß mehrfach durch eine sehr feine Spritze (23G) gezogen. Danach erfolgt eine Inkubation auf Eis für 15 min, bevor die Zellen mit Ultraschall (insgesamt für 30 Sekunden 5 sec Pulse mit 2 sec Pause, 20% Amplitude) behandelt wurden. Das Zellysate wird bei 16,400 ×g für 30 min bei 4°C zentrifugiert, um die unlöslichen Bestandteile abzutrennen. Anschließend wird das Lysat mit Myc-Trap®\_A Beads bei 4°C für 2-3 Stunden im Kühlraum inkubiert. Diese Beads erkennen die Myc-Tag Sequenz EQKLISEEDL am N oder C-terminus eines Myc-Fusionsproteins.

Die Beads werden fünfmal mit 500 µl RIPA light-Puffer gewaschen und für 2 min bei 500×g zentrifugiert. Die gebundenen Proteine werden mit SDS-Probenpuffer abgelöst und bei 95°C für 5 min denaturiert. Ein Gradientengel (5-15% Acrylamid) wird mit den Proben beladen und anschließend der Proteintransfer per Wet Blot durchgeführt. Das an den Myc-Beads gebundene Myc-CEP215 (Myc-CDK5RAP2) kann mit Hilfe des Myc spezifischen Antikörpers mAb 9E10 nachgewiesen werden (Hilpert et al., 2001). Die

möglicherweise kopräzipitierende regulatorische Untereinheit B der PP2A kann mit einem kommerziellen PP2A B Subunit Antikörper (1:1000 verdünnt in 5% w/v BSA, 1× TBS und 0,1 Tween®20) im Western Blot nachgewiesen werden. Die Inkubation fand über Nacht bei 4°C und unter leichtem Schütteln statt.

### C) PEI-Transfektionsmethode

HEK293T Zellen wurden in einer 150cm<sup>2</sup> große Petri-Schale angezogen, bis die Zelldichte 40-50% betrug. Für die Transfektion wurden 20 µg der Vektor-DNA mit 1,5 ml DMEM ohne Serum gemischt. Dazu wurden 60 µl der 1 mg/ml Polyethyleneimin Lösung gegeben (PEI-Lösung). Das Gemisch wurde nach 10 Minuten auf die Zellen gegeben und die Zellen über Nacht im Brutschrank inkubiert.

## **4) Ergebnisse:**

### 4.1 Charakterisierung der regulatorischen PP2A Untereinheit phr2AB

Die regulatorische Untereinheit phr2AB (= PHosphatase 2A Regulatory B subunit) der PP2A ist das Ortholog der B55 Untereinheit des Säugerenzyms. Sie wird in *D. discoideum* vom *phr2AB* Gen (DDB0191428) auf Chromosom 4 kodiert. Das Gen besteht aus 5 Exons. Dies ist für *D. discoideum* Gene, die in der Regel nur ein bis zwei kurze Introns enthalten, eine relativ hohe Anzahl (Eichinger et al., 2005). Das Protein besteht aus 483 Aminosäuren und hat ein errechnetes theoretisches Molekulargewicht von 55.204,6 Da. Die strukturelle Vorhersage zeigt sieben WD40 Repeats an (Smart Programm: <http://smart.embl-heidelberg.de/>) (Abbildung 7).

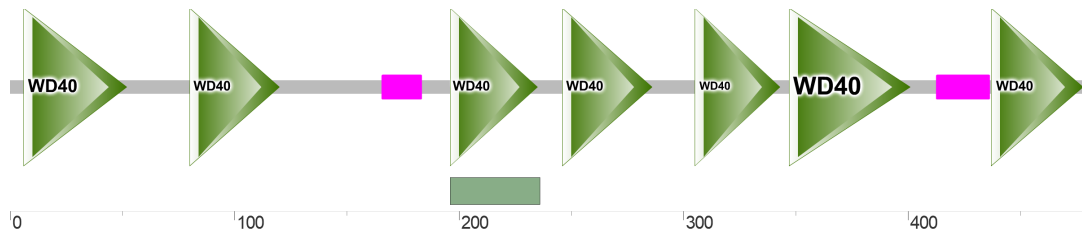


Abbildung 7: Vorhersage der Struktur von phr2AB mit dem Programm Smart <http://smart.embl-heidelberg.de/>. Die Anzahl und Lokalisation der WD40 Wiederholungseinheiten (in grün) ist angegeben. In Magenta: Bereiche mit niedriger Komplexität.

Phr2AB gehört somit zur Familie der WD40 Repeat Proteine. WD40 Repeats sind ~40 Aminosäuren lange Motive, die bevorzugt mit einem Tryptophan-Aspartat Dipeptid (WD) enden. Strukturell bilden sie einen sieben- oder achtblättrigen  $\beta$ -Propeller. WD-Repeat Proteine gibt es in allen Eukaryoten.

Sie haben eine Vielzahl von Funktionen, so sind sie z. B. in Signaltransduktionsprozesse, in Transkriptionsregulation, Zellzykluskontrolle, Regulation des Aktinzytoskeletts und in die Apoptose involviert (Xu und Min, 2011; Swaminathan et al., 2014).

Die Spezifität der Proteine wird über die unterschiedlichen Oberflächen und den Sequenzen zwischen den Repeats erzielt. Generell wird angenommen, dass diese Proteine Plattformen bilden, an denen sich Proteinkomplexe bilden können. Sie sind eine der häufigsten Protein-Proteininteraktionsdomänen und üben so räumlich und zeitlich eine spezifische Funktion aus, wie es z.B. auch für Coronin7, einen Regulator des Aktinzytoskeletts gezeigt wurde, der über Interaktionen mit Cdc42 und N-WASP die Aktinorganisation beeinflusst (Bhattacharya et al. 2016).

Ein Vergleich der phr2AB Proteinsequenz mit menschlichen Proteinsequenzen in der NCBI Datenbank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>) ergab als höchstverwandtes Protein die PP2A Untereinheit B Isoform B55 alpha (Sequence ID: NP\_002708.1) mit 51% identischen Aminosäuren, die sich über die gesamte Sequenz erstrecken (Abbildung 8).

Alignment statistics for match #1

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps	Frame
506 bits(1303)	6e-177()	Compositional matrix adjust.	242/473(51%)	335/473(70%)	40/473(8%)	
Features:						
Query	5	LDWRFSQTFGGKGNEDASDANVVP AIEFDQTGDFIAVGDKGGKVL LKRT HDKQSSKSK				64
		+ W FSQ G ++D ++A+++ +EF+ +G+ +A GDKGG+V++ ++ + + S+				
Sbjct	10	IQWCFSQV-KGAVDDDDVAEADIISTVEFNHSGELLATGDKGGRVVIFQQEQENKIQSHSR				68
Query	65	LPEYRFYSEFQSHEPEFDY LKSL EIEEKINKIKWCPKQND A QFLLTNDKTIK LKWKVYEK				124
		EY YS FQSHEPEFDY LKSL EIEEKINKI+W P++N AQFLL+TNDKTIK LKWK+ E+				
Sbjct	69	-GEYNVYSTFQSHEPEFDY LKSL EIEEKINKIRWLPQKNA A QFLLSTNDKTIK LKWKISER				127
Query	125	KIKQVSTSATTTGPSYNGSLASNTRSPSHTTYIYNSSGAHNMNNMNSNNNNLNNFK				184
		+ YN R P+ T +				
Sbjct	128	DKRP-----EGYNLKEEDGRYRDPTTVT-----TLR				153
Query	185	IPKLTRET VVTATPRKIFQNAHAYHINSISLNSDGETYISSDDLRIHLWNLNINTECFN				244
		+P + +V A+PR+IF NAH YHINSIS+NSD ETY+S+DDLRI+LW+L I FN				
Sbjct	154	VPVFRPMDLMVEASPRRIFANAHTYHINSISINSYET YLSADDLRI NLWHLEITDRSFN				213
Query	245	VVDIKPTNME DLTEVITSAEFHPTSCNIFMYSSSKGTIKLGLDRSSALCDNHAKVFEEYE				304
		+VDIKP NME+LTEVIT+AEFHP SCN F+YSSSKGTI+L D+R+SALCD H+K+FEE E				
Sbjct	214	IVDIKPANMEELTEVITAAEFHPNSCNTFVYSSSKGTIRLCDMRASALCDRHSKLFEEPE				273
Query	305	DPSNKSFFSEI IISISDIKFSRDGRYILSRDFLT LKLDINMENKPVKTIQIH DY LKPKL				364
		DPSN+SFFSEI IISISD+KFS GRY+++RD+L++K+WD+NMEN+PV+T Q+H+YL+ KL				
Sbjct	274	DPSNRSFFSEI IISISDVKFSHSGRYMMTRDYLSVKI WDLNMENRPVETYQVHEYLRSKL				333
Query	365	CDLYENDC I FDKFECTLNHDGTQMLTGSYHNYLHIYDRNSKQDVCL EASKQATKSKTKTL				424
		C LYENDC I FDKFEC N + ++TGSY+N+ ++DRN+K+D+ LEAS++ +K +T+				
Sbjct	334	CSLYENDC I FDKFECCWNGSDSVMTGSYNNFFRMFDRNTKR DITLEASRE--NNKPRTV				391
Query	425	TTKMKLRSSKKEPKKPEDIH PDAIEYTKKTLHCAWHPKDNLI AVGAANTVYLY				477
		K+ +S K +K ++I D++++ KK LH AWHPK+N+IAV N +Y++				
Sbjct	392	LKPRKVCASG--RKKDEISVDSLDFNKKILHTAWHPKENI IAVATTNNLYIF				442

Abbildung 8: Vergleich der Proteinsequenz des *D. discoideum* phr2AB (Query) mit der menschlichen regulatorischen B Untereinheit Isoform alpha (Sbjct). +, konservativer Aminosäureaustausch.

#### 4.2. Expression von phr2AB als GFP Fusionsprotein in AX2

Die cDNA von *phr2AB* lag im *D. discoideum* Vektor p1A G418 kloniert vor und konnte im *D. discoideum* Stamm AX2 als ein ca. 95 kDa großes GFP-Fusionsprotein exprimiert werden (Abbildung 9). Das errechnete Molekulargewicht beträgt ~85 kDa und weicht somit vom im SDS-Gel beobachteten Molekulargewicht ab. p1A G418 vermittelt eine Resistenz gegen G418 und ermöglicht somit die Selektion der Transformanten. Die Expression wurde in einem Western Blot mit Homogenaten von Transformanten und AX2 Wildtyp Zellen überprüft. Der Nachweis des GFP-Fusionsproteins erfolgte mit dem GFP-spezifischen monoklonalen Antikörper K3-184-2 (Noegel et al., 2004). Es wurden jeweils Lysate aufgetragen, die von unterschiedlichen Zellzahlen stammten. mAb K3-184-2 erkannte in Lysaten der Transformantenzellen AX2 *phr2AB*-GFP ein Protein bei ~95 kDa. Im Lysat, das einer höheren Zellzahl entspricht, ist ein weiteres, aber schwaches Signal bei ~72 kDa sichtbar. Dies könnte von einem Abbauprodukt stammen. In den AX2-Lysaten war kein Signal vorhanden. Die PonceauS-gefärbte Membran zeigt die Beladung mit Proteinen (Abbildung 9). In einer quantitativen PCR-Analyse wurden die Transkriptmengen von *phr2AB*-GFP in den Transformantenzellen im Vergleich zu *phr2AB* in AX2 bestimmt. Dies ergab eine achtfach erhöhte Menge in den Transformantenzellen (Daten von Maria Stumpf und Sarah Fischer).

### Ponceau S - Färbung

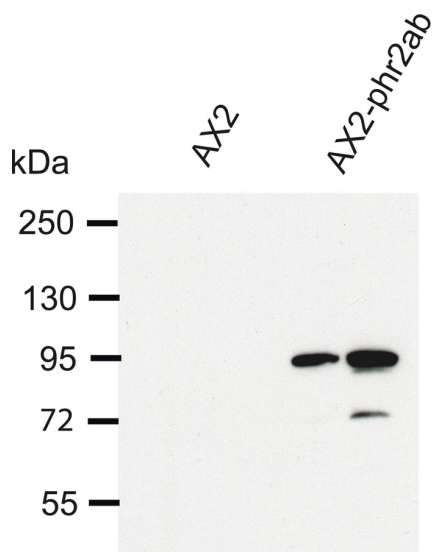
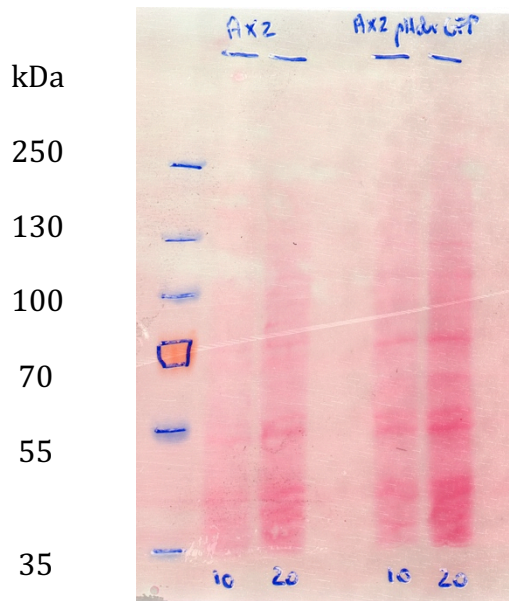


Abbildung 9: Expression von phr2AB-GFP in AX2. Proteine von Gesamtzelllysaten von AX2 und AX2 phr2AB-GFP wurden in einem SDS-PA-Gel (10% Acrylamid) aufgetrennt, auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und die Membran mit mAb K3-184-2 inkubiert. Es wurden pro Zellstamm jeweils zwei unterschiedliche Mengen aufgetragen, die einer Zellzahl von  $5 \times 10^5$  und  $1 \times 10^6$  Zellen entsprechen. Um die Beladung mit Proteinen zu demonstrieren, wurde die Membran mit PonceauS gefärbt (oberer Teil der Abbildung).

### 4.3 Analyse der Interaktion von phr2AB mit CEP161

Salil Sukumaran identifizierte in seiner Doktorarbeit phr2AB als Interaktionspartner von CEP161 in einem Pulldownexperiment, in dem Zelllysate von AX2-Transformanten verwendet wurden, die CEP161-GFP exprimierten. Um die Interaktion in einem unabhängigen Experiment zu bestätigen, wurden hier phr2AB-GFP exprimierende AX2 Zellen in einem Pulldown eingesetzt, phr2AB-GFP mit GFP-Trap beads präzipitiert, die präzipitierten Proteine in einem SDS-Gel aufgetrennt und CEP161 mit polyklonalen Antikörpern nachgewiesen. Sowohl im Gesamtzelllysat, als auch im Pulldown, konnte CEP161 als schwache Bande nachgewiesen werden (Pfeil in Abbildung 10). Im Pulldown waren zusätzliche Banden zu sehen, die wahrscheinlich Proteolyseprodukte von CEP161 sind (Pfeilspitzen in Abbildung 10). Aus früheren Arbeiten ist bekannt, dass CEP161 sehr sensitiv gegenüber Proteolyse ist. Die Präzipitation von phr2AB-GFP wurde mit mAb K3-184-2 bestätigt. Als Kontrolle wurden AX2 Zellen verwendet, die GFP exprimierten (Pfeil bei ~25 kDa in Abbildung 10). GFP war im Pulldown mit CEP161 spezifischen Antikörpern nicht nachweisbar, was die Spezifität der Interaktion bestätigt.

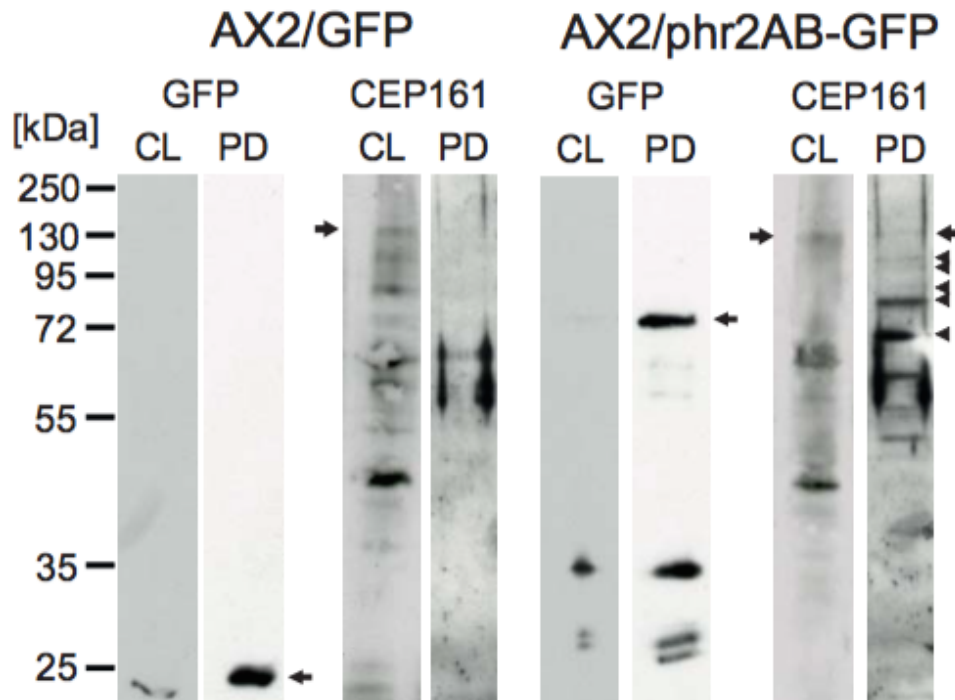


Abbildung 10: Ko-Immünpräzipitation von CEP161. phr2AB-GFP wurde mit GFP-Trap beads aus AX2 phr2AB-GFP Zelllysaten präzipitiert und CEP161 mit polyklonalen Antikörpern (CEP161) nachgewiesen. CEP161 ist im Zelllysate und im Pulldown oberhalb von 130 kDa zu erkennen. Zur Kontrolle für die Spezifität der Interaktion wurde ein Pulldown mit AX2 Zellen durchgeführt, die GFP exprimieren (AX2/GFP). GFP und phr2AB-GFP wurden mit dem GFP-spezifischen mAb K3-184-2 (GFP) nachgewiesen. CL, Zelllysate; PD, Pulldown, Abbildung entnommen aus (Müller et al., 2018)

Um die Bindungsstelle von phr2AB in CEP161 einzuengen, wurden zwei GST-CEP161 Fusionsproteine, D2 und D3, verwendet, die die Aminosäuren 1 bis 763 (D2) und 763 bis 1114 (D3) des 1381 Aminosäuren umfassenden CEP161 enthalten und an Glutathione Sepharose Beads gebunden waren (Abbildung 11). Diese Beads und GST-Kontrollbeads wurden mit Lysaten von AX2 phr2AB-GFP inkubiert. Die präzipitierten Proteine wurden im Western Blot aufgetrennt und die Anwesenheit von phr2AB-GFP im Pulldown mit mAb K3-184-2 überprüft.

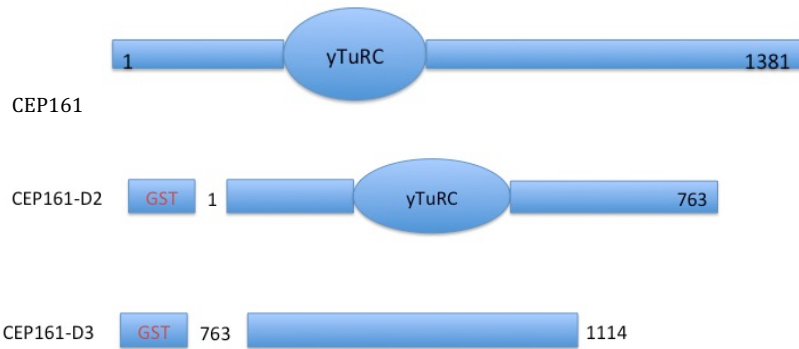


Abbildung 11: Übersicht über CEP161 und die GST-Fusionsproteine D2 und D3, die die Aminosäuren 1 bis 763 in D2 und 763 bis 1114 in D3 enthalten (Sukumaran et al., 2015). GST ist am N-Terminus lokalisiert.  $\gamma$ TuRC,  $\gamma$ Tubulin Ring Complex bindende Domäne (Abbildung mittels Microsoft Word selber erstellt).

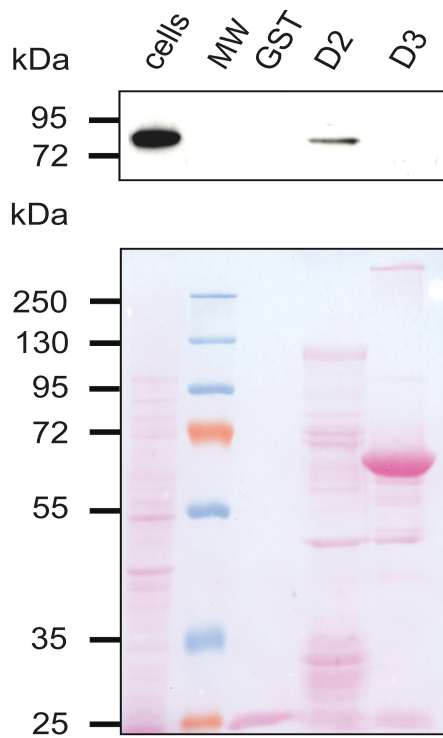


Abbildung 12: Bindung von phr2AB-GFP an GST-CEP161-Fusionsproteine D2 und D3. Oberer Teil, Western Blot nach Inkubation mit mAb K3-184-2. Unterer Teil, die PonceauS gefärbte Nitrozellulosemembran. Für den Pulldown wurden Zelllysate von AX2 phr2AB-GFP verwendet. Cells, Zellhomogenat von  $2 \times 10^5$  Zellen. MW, Molekulargewichtsmarker; GST, GST Pulldown; D2, GST-D2 Pulldown; D3, GST-D3 Pulldown. GST, ~25 kDa; GST-D2, ~120 kDa; GST-D3, ~70 kDa, Abbildung entnommen aus (Müller et al., 2018)

In diesem Experiment zeigte sich, dass phr2AB an GST-D2 bindet. Das D2 Protein enthält die sogenannte  $\gamma$ TuRC Region, die für die Rekrutierung des  $\gamma$ Tubulin Ring Complexes ( $\gamma$ TuRC) an das Zentrosom verantwortlich ist. Der  $\gamma$ Tubulin Ring Complex ist entscheidend für die Ausbildung des Mikrotubulinetzwerks, da dort die Mikrotubuli nukleiert werden (Choi et al., 2010). Dieser Bereich ist somit wesentlich für die Funktion von CEP161 am Zentrosom. GST und GST-D3 zeigten keine Bindung (Abbildung 12).

#### 4.4 Lokalisation von phr2AB-GFP in der Zelle

In Methanol-fixierten Zellen ist phr2AB-GFP diffus über die gesamte Zelle verteilt und zeigt punktuelle Anreicherungen. Eine Färbung mit mAb K68-439-8, einem CP250 spezifischen monoklonalen Antikörper (Blau-Wasser et al., 2009), wies auf eine Lokalisation dieser Punkte am Zentrosom hin (Abbildung 13). Eine zentrosomale Lokalisation von phr2AB ist bereits von Murphy et al. (1999) berichtet worden. In dieser Arbeit wurden spezifische Antikörper verwendet.

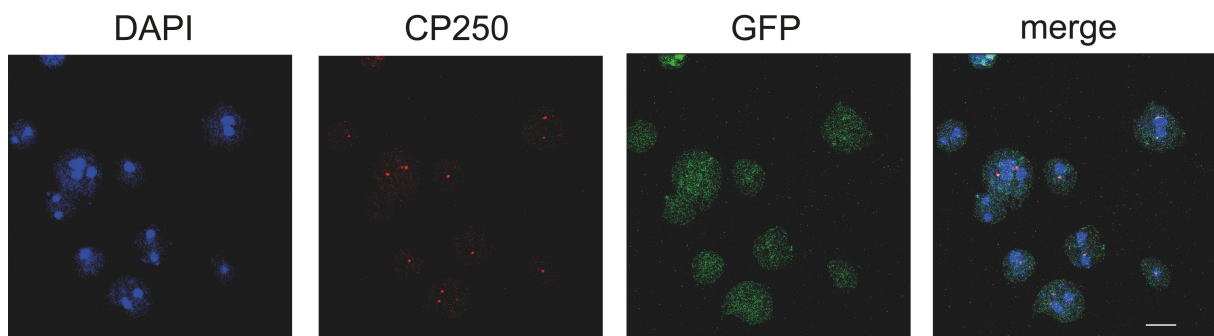


Abbildung 13: Lokalisation von phr2AB-GFP in AX2 Zellen. Die Zellen wurden mit eiskaltem Methanol fixiert, das Zentrosom wurde mit dem CP250-spezifischen monoklonalen Antikörper mAb K68-439-8 angefärbt, der Zellkern mit DAPI. Größenmarker 10  $\mu$ m, Abbildung nach (Müller et al., 2018)

Eine Zentrosomenlokalisierung wurde auch für CEP161-GFP in Immunfluoreszenzanalysen nachgewiesen. Als zentrosomaler Marker wurde wiederum CP250 gewählt. In allen Zellen ist CEP161-GFP am CP250-positiven Zentrosom lokalisiert (Abbildung 14).

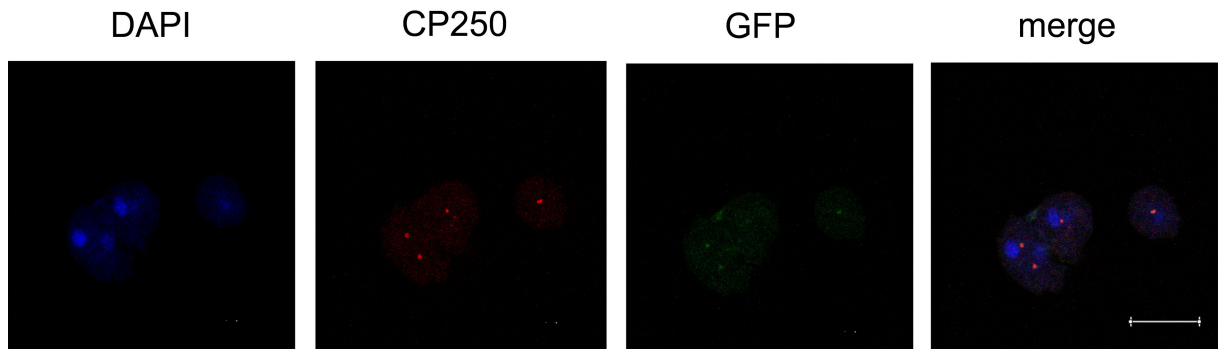


Abbildung 14: Kolokalisation von GFP-CEP161 mit CP250 (in rot) am Zentrosom. CP250 wurde mit mAb K68-439-8 detektiert. Die Kerne wurden mit DAPI (blau) gefärbt. Größenmarker 10 µm. Abbildung aus (Müller et al., 2018)

In weiteren Immunfluoreszenzanalysen wurden die Mikrotubuli in den *phr2AB*-GFP exprimierenden Zellen analysiert. Mikrotubuli haben in der Regel ihren Startpunkt am Zentrosom (MTOC, Mikrotubuli organisierendes Zentrum) und reichen bis in die Zellperipherie. Die Mikrotubuli wurden mit Hilfe des monoklonalen Antikörpers YL1/2 dargestellt, der spezifisch  $\alpha$ -Tubulin erkennt (Kilmartin et al. 1982). In den GFP-positiven Zellen wurden gut ausgebildete Tubulinnetzwerke beobachtet, die sich nicht von denen in Kontrollzellen unterschieden (Abbildung 15).

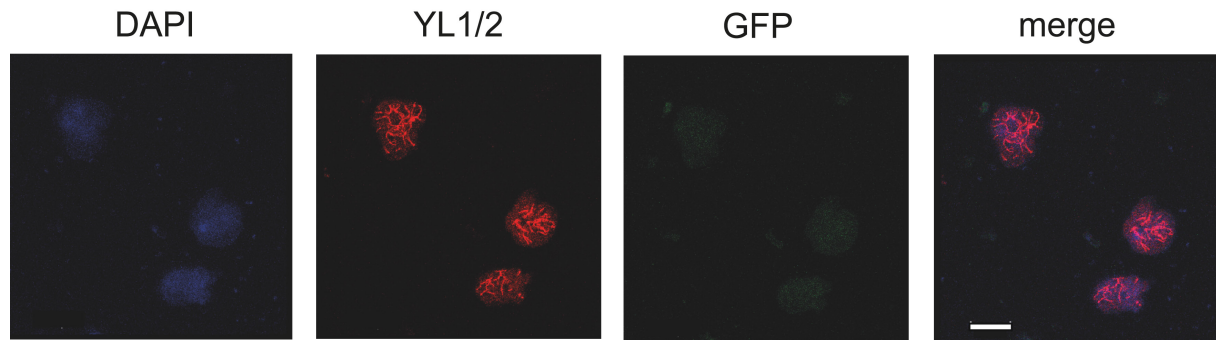


Abbildung 15: Analyse des Tubulinnetzwerks in phr2AB-GFP Zellen. Das Tubulinnetzwerk wurde mit Hilfe des monoklonalen Antikörpers YL1/2 visualisiert. Der Zellkern wurde mit DAPI angefärbt. Größenmarker 10  $\mu\text{m}$ .

In Arbeiten zu CEP161 hat S. Sukumaran gefunden, dass eine ektopische Expression von CEP161 und von Teilproteinen Auswirkungen auf das Wachstum der Zellen, die Zellgröße, auf die Anzahl der Kerne pro Zelle und auf den Abstand der Zentrosomen vom Zellkern hat (Sukumaran et al., 2015). Deshalb wurden im folgenden Zellen untersucht, die zusätzlich zum endogenen phr2AB das GFP-markierte Protein exprimieren. Wie oben bereits beschrieben, haben diese Zellen eine achtfach erhöhte Transkriptmenge im Vergleich zu AX2. Bei den folgenden Untersuchungen wurden die Eigenschaften besonders berücksichtigt, die auch bei CEP161-Überexpression verändert waren.

#### 4.5 Wachstumsanalysen

##### 4.5.1 Wachstum in Schüttelkultur

Um den Einfluss von phr2AB auf das Wachstum zu untersuchen, wurden Wildtyp AX2 und AX2 phr2AB-GFP Zellen über mehrere Tage in Nährmedium kultiviert und die Zellzahl nach jeweils ca. 24 Stunden bestimmt (Abbildung 16).

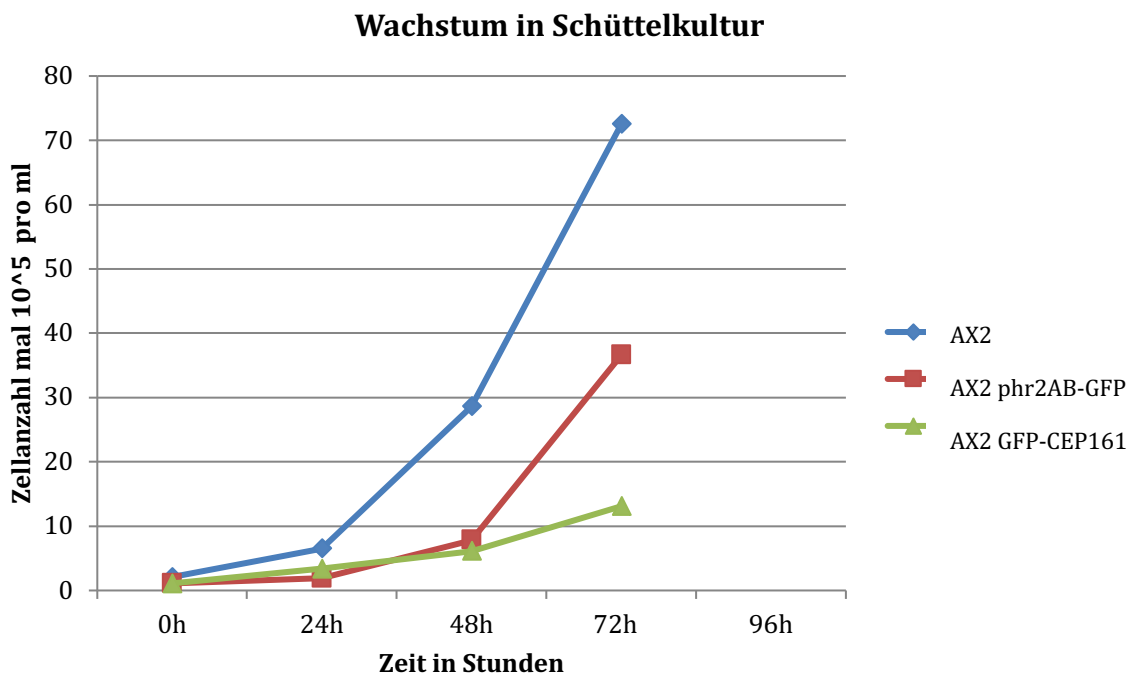


Abbildung 16: Wachstum von AX2 und AX2 phr2AB-GFP in Schüttelkultur. Für AX2 phr2AB-GFP sind die Ergebnisse aus drei unabhängigen Zählungen gezeigt (Mittelwert). Zum Vergleich ist das Wachstum von AX2 GFP-CEP161 gezeigt.

Das Ergebnis zeigt ein deutlich langsames Wachstum für AX2 phr2AB-GFP. Die Zellen erreichten nach 96 Stunden Inkubation eine Zellzahl von  $8 \times 10^6$  Zellen, während für den Wildtyp AX2  $1,4 \times 10^7$  Zellen gezählt wurden. Das Wachstum von AX2 GFP-CEP161 war in diesem Versuch stark eingeschränkt.

Daraus lässt sich folgern, dass die Überexpression der Phosphatase Untereinheit phr2AB einen deutlichen Einfluss auf das Zellwachstum hat. Da das Protein zusammen mit seinem Interaktor CEP161 an zentrosomalen Abläufen und damit auch an der Zellteilung beteiligt ist, könnte seine Überexpression diese möglicherweise stören oder einschränken.

#### 4.5.2 Wachstum auf einem Bakterienrasen

*D. discoideum* ist ein natürlicher Phagozyt und ernährt sich normalerweise von Bakterien und Hefen. Im Labor wird häufig *Klebsiella aerogenes* als Nahrungsquelle verwendet. Das Wachstum auf einem Bakterienrasen gibt gleichzeitig Auskunft über die Fähigkeit, Partikel über Phagozytose aufzunehmen.

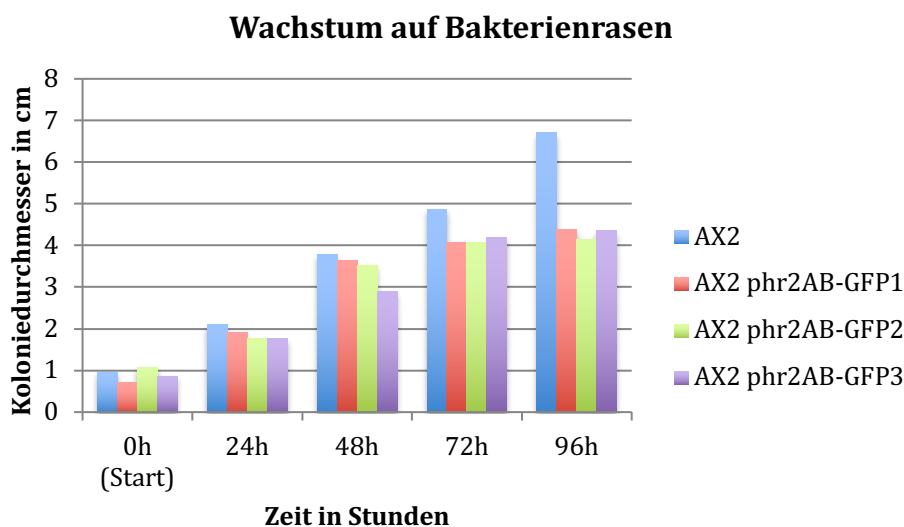


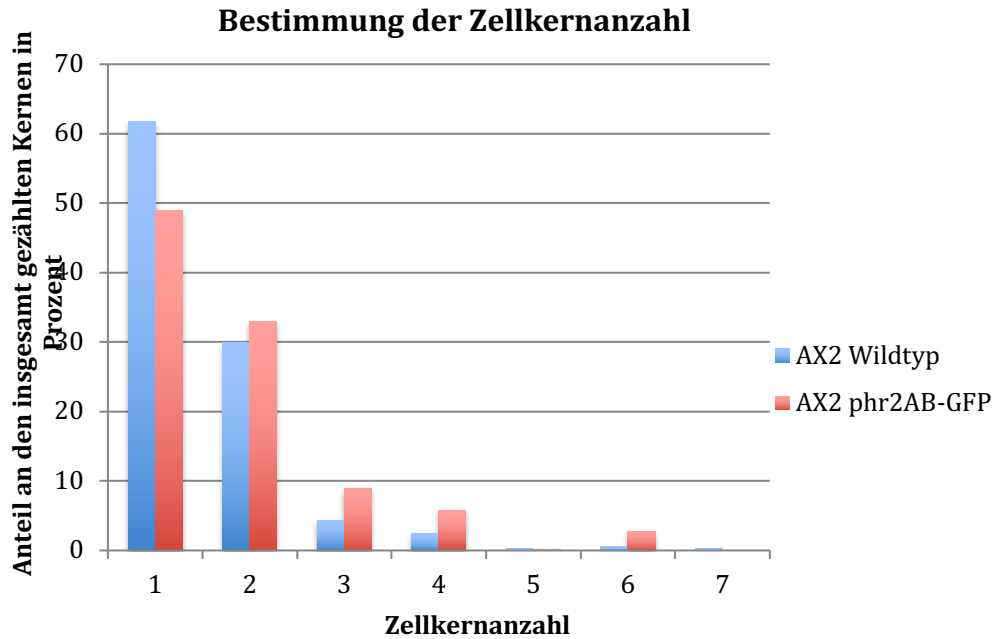
Abbildung 17: Wachstum von AX2 und AX2 phr2AB-GFP auf einem Bakterienrasen. Für AX2 phr2AB-GFP wurden drei unabhängige Kulturen verwendet. Pro Stamm wurden je Experiment 3 Platten angelegt. Auf der Y-Achse ist der Koloniedurchmesser in cm angegeben. Gezeigt sind Mittelwerte der Messungen.

In diesem Versuch wird klar ersichtlich, dass AX2 ein deutlich stärkeres Wachstum auf Bakterienrasen zeigt, als die AX2 phr2AB-GFP Zellen, bei denen das Wachstum schon fast zu stagnieren scheint, während der Koloniedurchmesser für AX2 noch linear zunimmt (Abbildung 17).

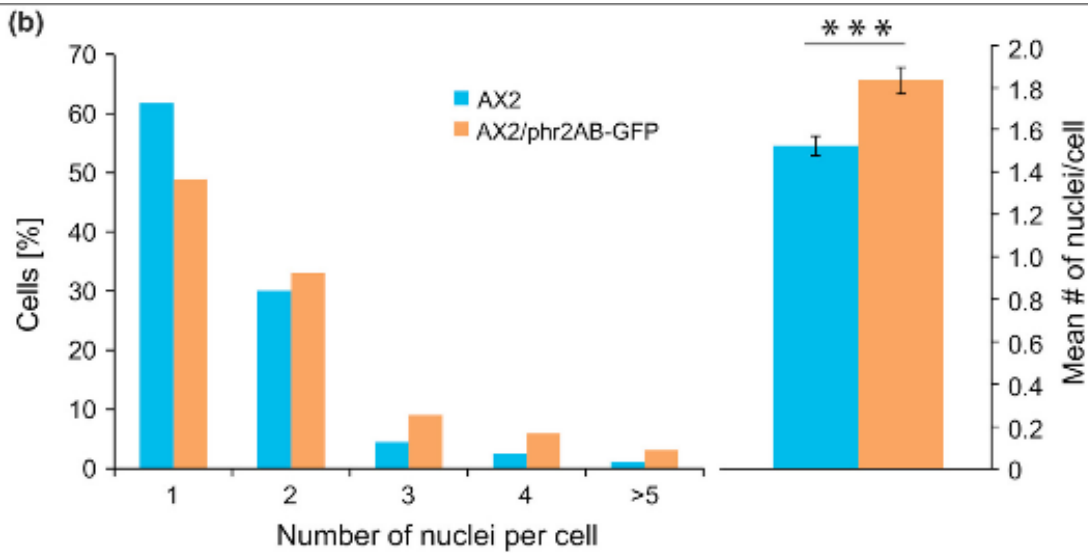
#### 4.6 Bestimmung der Zellkernanzahl im Wildtyp AX2 und AX2 phr2AB-GFP

*Dictyostelium* Zellen sind normalerweise ein- bis zwei-kernig. Eine Erhöhung der Kernanzahl wurde in verschiedenen Mutanten beobachtet. So haben z. B. Zellen, in denen Myosin II (ein Motormolekül) oder Coronin (ein Protein, das in die Regulation des Aktinnetzwerkes involviert ist) verändert sind, eine erhöhte Anzahl an Zellkernen. Dies könnte die Folge eines Zytokinesedefekts sein (Masud Rana et al., 2013; Swaminathan et al., 2014). Ebenfalls hatte der Verlust von zentrosomalen Komponenten wie CP250 oder die ektopische Expression von CEP161 einen Einfluss auf die Kernzahl (Blau-Wasser et al., 2009; Sukumaran et al., 2015). Basierend auf der Rolle der PP2A bei der Zellteilung wurde in den phr2AB-GFP exprimierenden Zellen im Vergleich mit AX2 die Anzahl der Kerne bestimmt.

A)



B)



Abbildungen 18 A) und B): Anzahl der Zellkerne pro Zelle in AX2 und AX2 phr2AB-GFP. Insgesamt wurden 360 Zellen für AX2 und 444 Zellen für AX2 phr2AB-GFP analysiert. In B) ist rechts die statistische Analyse gezeigt. \*\*\*  $p < 0.001$ . B) entnommen aus (Müller et al., 2018)

Bei der Analyse der Zellkernanzahl zeigte sich, dass AX2 phr2AB-GFP weniger einkernige Zellen besitzt als AX2 und stattdessen mehr Zellen mit einer ungewöhnlich großen Zellkernanzahl aufweist (Abbildung 18A, B). Am stärksten ist diese Differenz in der Zellanzahl mit drei Zellkernen erkennbar, wobei ca. 9% der Zellen von AX2 phr2AB-GFP drei Kerne besitzen, im Gegensatz zu nur 4,5% der Zellen des Wildtyps. Auffällig ist auch die hohe Anzahl an Zellen mit sechs Zellkernen in AX2 phr2AB-GFP. Hier besitzen 2,8% der Zellen sechs Zellkerne, wobei nur 0,56% des Wildtyps sechs Kerne aufweisen. Die Zunahme an Zellkernen pro Zelle in AX2 phr2AB-GFP war statistisch signifikant (Abbildung 18B).

Die Überexpression der Phosphataseuntereinheit und damit die veränderte Regulation von PP2A, könnte somit einen Einfluss auf die Anzahl der Kerne und auch die Teilungsfähigkeit der Zellen haben. Ob eine größere Kernanzahl einen Vorteil für die AX2 phr2AB-GFP Mutante darstellt ist unklar, denn eine größere DNA-Menge birgt auch das Risiko vermehrter DNA-Schäden und damit eine größere Vulnerabilität der Zelle gegenüber äußeren Einflüssen.

#### 4.7 Bestimmung des Zellkern-Zentrosomabstands

Um die Auswirkung der Überexpression der phr2AB Untereinheit auf das Zentrosom zu erfassen, wurde der Zellkern - Zentrosomen - Abstand bestimmt. Die folgenden Graphen zeigen die Anzahl der Zellen mit den jeweiligen Abständen von Zellkern und Zentrosom in  $\mu\text{m}$  (Abbildung 19 und 20).

### Zellkern-Zentrosomen-Abstand AX2

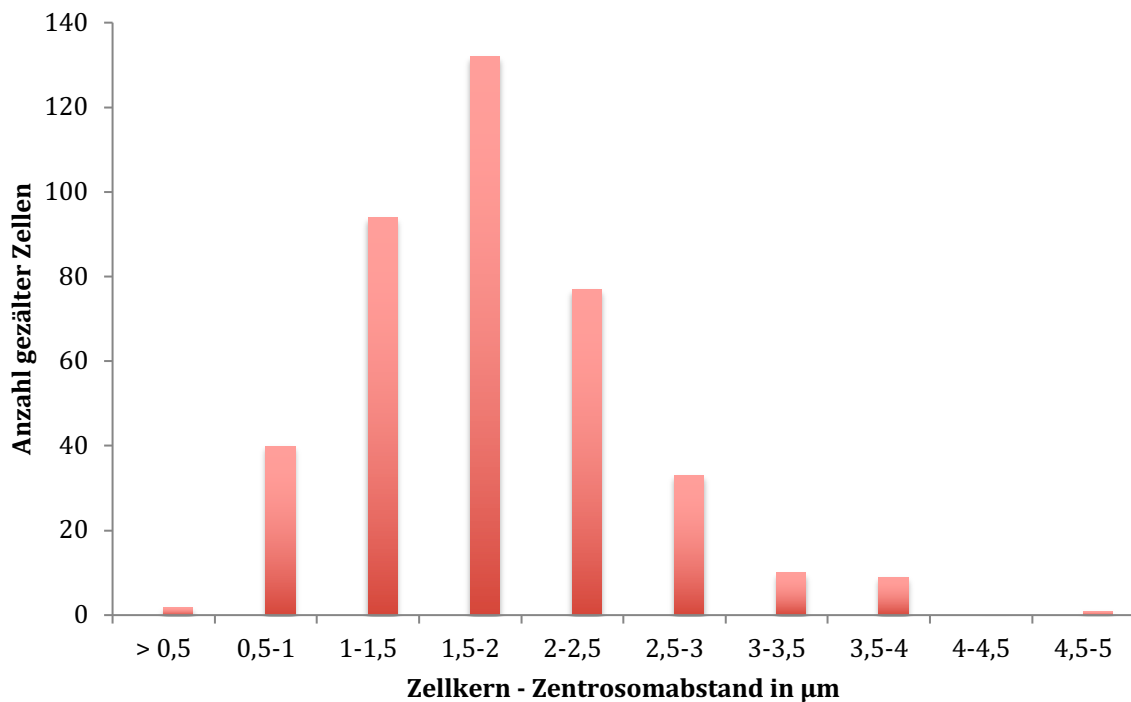


Abbildung 19: Zentrosom-Zellkernabstand bei AX2 Wildtyp. Insgesamt wurden 402 Zellen analysiert.

In AX2 haben die meisten Zellen einen Zellkern-Zentrosomen-Abstand von 1,5 bis 2  $\mu\text{m}$  (Abbildung 19). Der Mittelwert der Abstände liegt bei 1,8  $\mu\text{m}$ , die Standardabweichung beträgt gerundet 0,6684. Es wurden insgesamt 402 Zellen analysiert. Der kleinste beobachtete Abstand betrug 0,373  $\mu\text{m}$ , der größte 4,6  $\mu\text{m}$ .

### Zentrosom-Zellkernabstand AX2 phr2AB-GFP

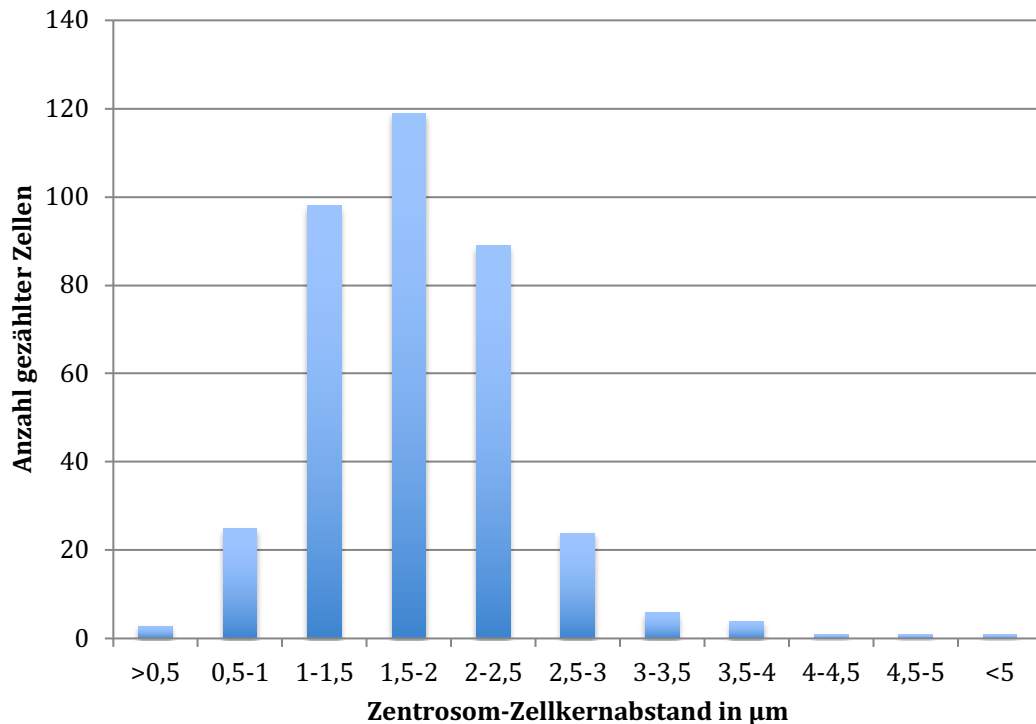


Abbildung 20: Zentrosom-Zellkernabstand bei AX2 phr2AB-GFP. Insgesamt wurden 380 Zellen analysiert.

Die meisten Zellen der Mutante haben einen Zellkern-Zentrosom-Abstand von 1,5 bis 2  $\mu\text{m}$ . Dies ist vergleichbar zu den Werten von AX2. Der Mittelwert des Abstandes beträgt ebenfalls 1,8  $\mu\text{m}$ , die Standardabweichung gerundet 0,6382. Es wurden insgesamt 380 Zellen gezählt (Abbildung 20). Der kleinste beobachtete Abstand betrug 0,394  $\mu\text{m}$ , der größte 5,31  $\mu\text{m}$ .

Ein prozentualer Vergleich der Abstände in den beiden Zellstämmen verdeutlicht das Ergebnis und zeigt, dass der Zentrosom - Zellkernabstand beider Zelllinien sehr ähnlich ist. Der Mittelwert aus den Ausmessungen ist fast identisch mit 1,8  $\mu\text{m}$  Abstand des Zentrosoms vom Zellkern. Der Unterschied der Standardabweichung bei beiden

Zelllinien ist gering. Die ektopische Expression von phr2AB scheint somit keinen Einfluss auf diese Eigenschaft zu haben (Abbildung 21).

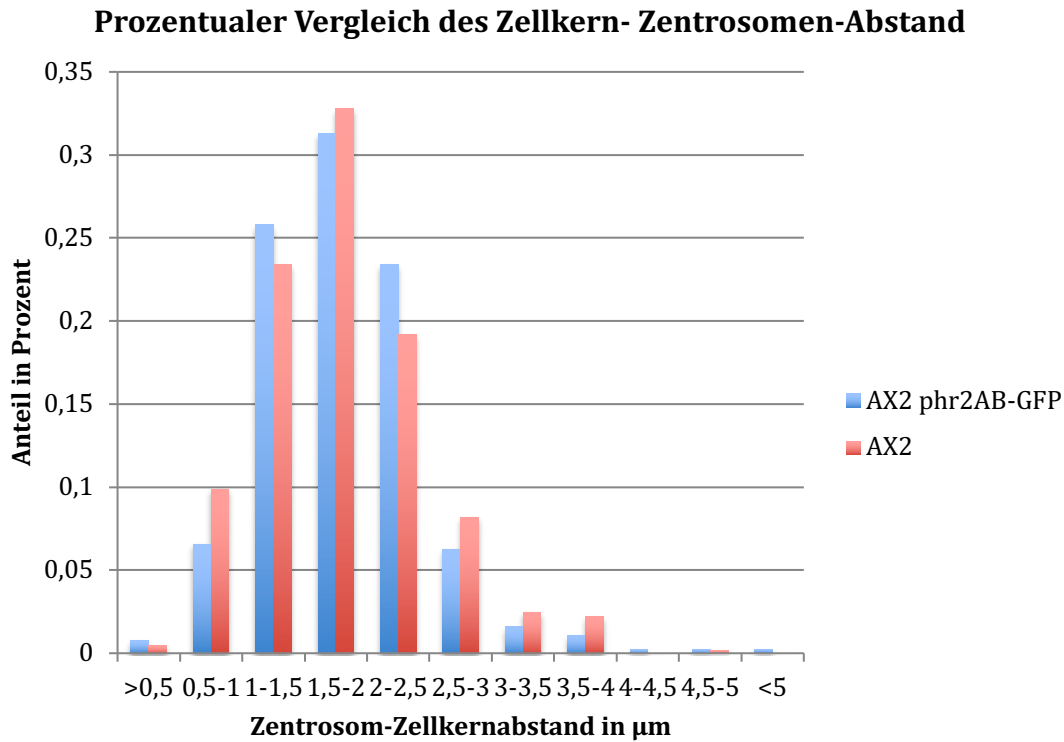


Abbildung 21: Zellkern-Zentrosomenabstand im prozentualen Vergleich von AX2 und AX2 GFP-phr2AB. Die Daten wurden für 402 AX2 und 380 AX2 phr2AB-GFP Zellen erhoben.

Im Gegensatz zur Zellkernanzahl pro Zelle wurden hier also keine Unterschiede zwischen beiden Stämmen beobachtet.

#### 4.8 Verhältnis Zentrosom - Zellkernanzahl im Wildtyp AX2

In diesem Versuch wurde anhand von Immunfluoreszenzaufnahmen das Verhältnis von Zentrosom- zu Zellkernanzahl in den Zellen ausgewertet. Da die Phosphatase PP2A einen entscheidenden Einfluss auf die zentrosomalen Komponenten hat, besteht die Möglichkeit, dass die Überexpression der regulatorischen Untereinheit eine Veränderung der Zentrosomenzahl in der Zelle bewirkt.

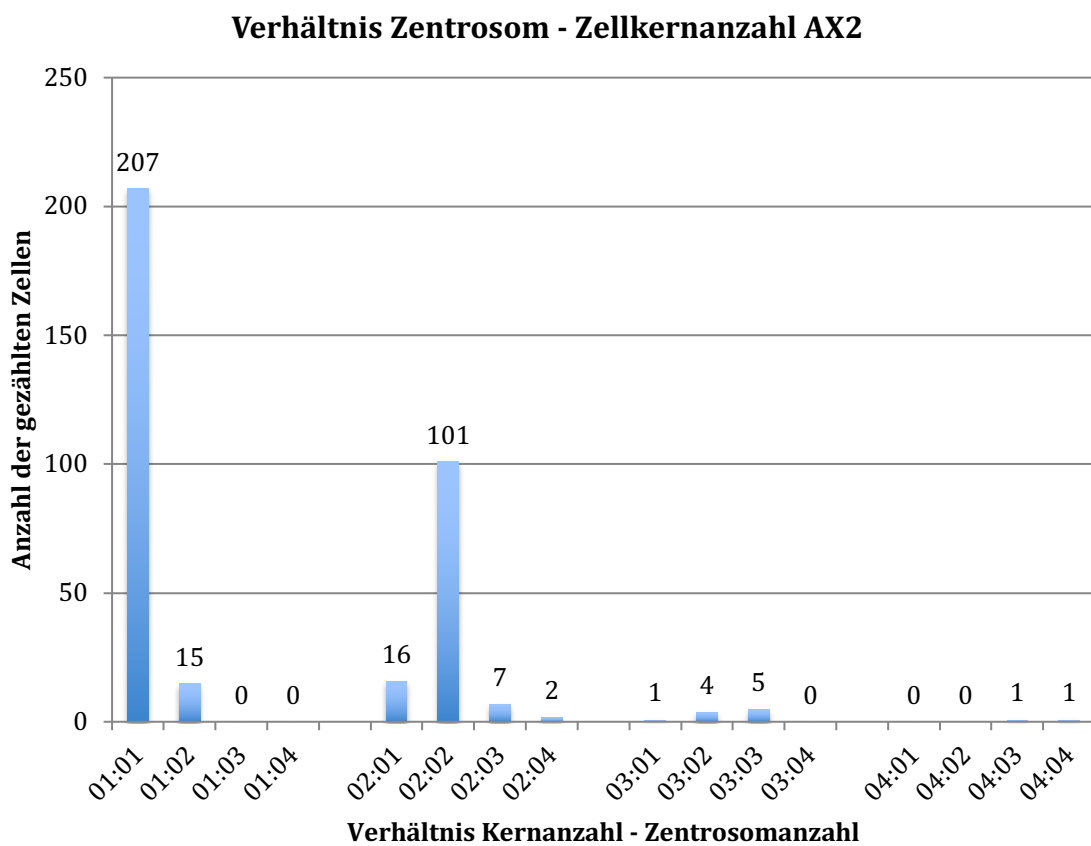


Abbildung 22: Verhältnis der Zellkern- und Zentrosomenanzahl im Wildtyp AX2. Insgesamt wurden für AX2 360 Zellen analysiert.

### Verhältnis Zentrosom - Zellkernanzahl AX2 phr2AB-GFP

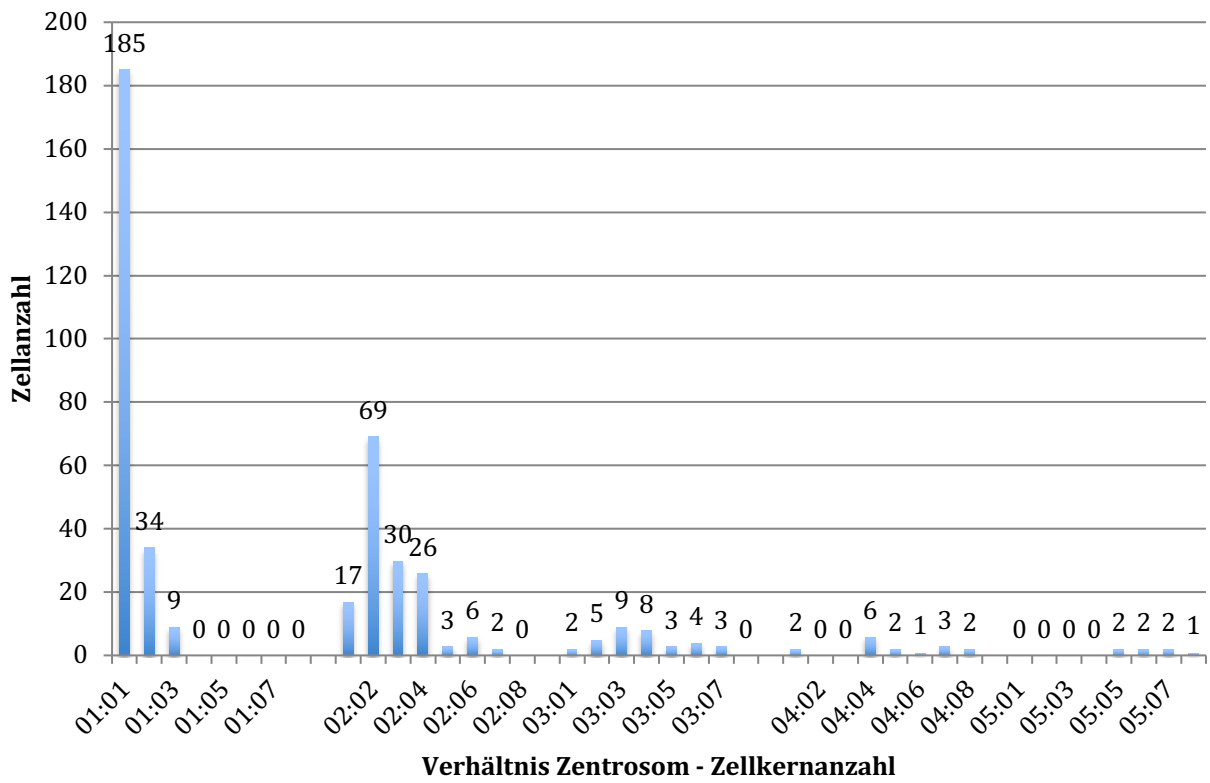
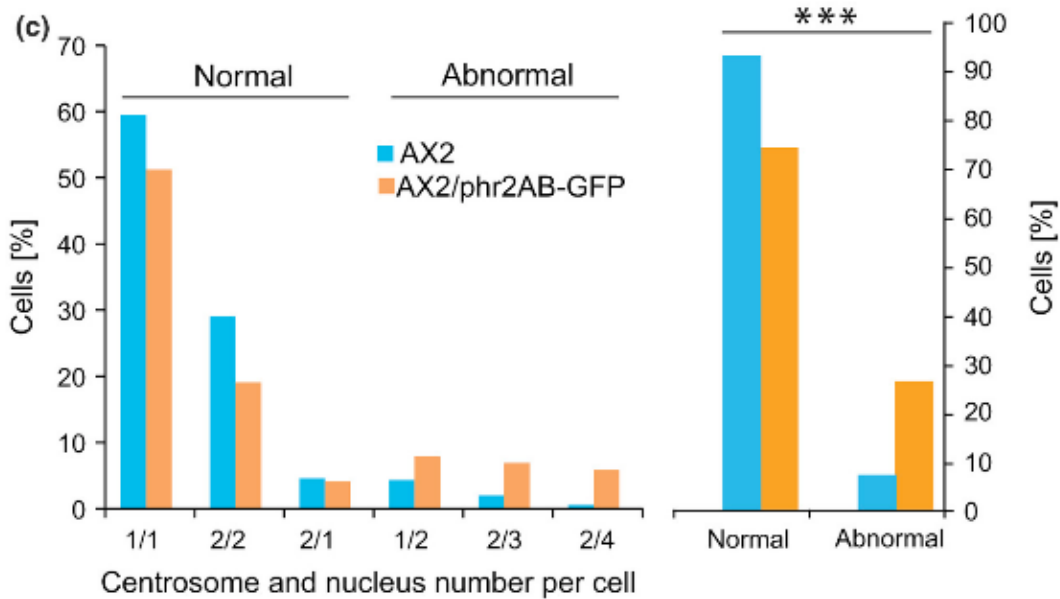
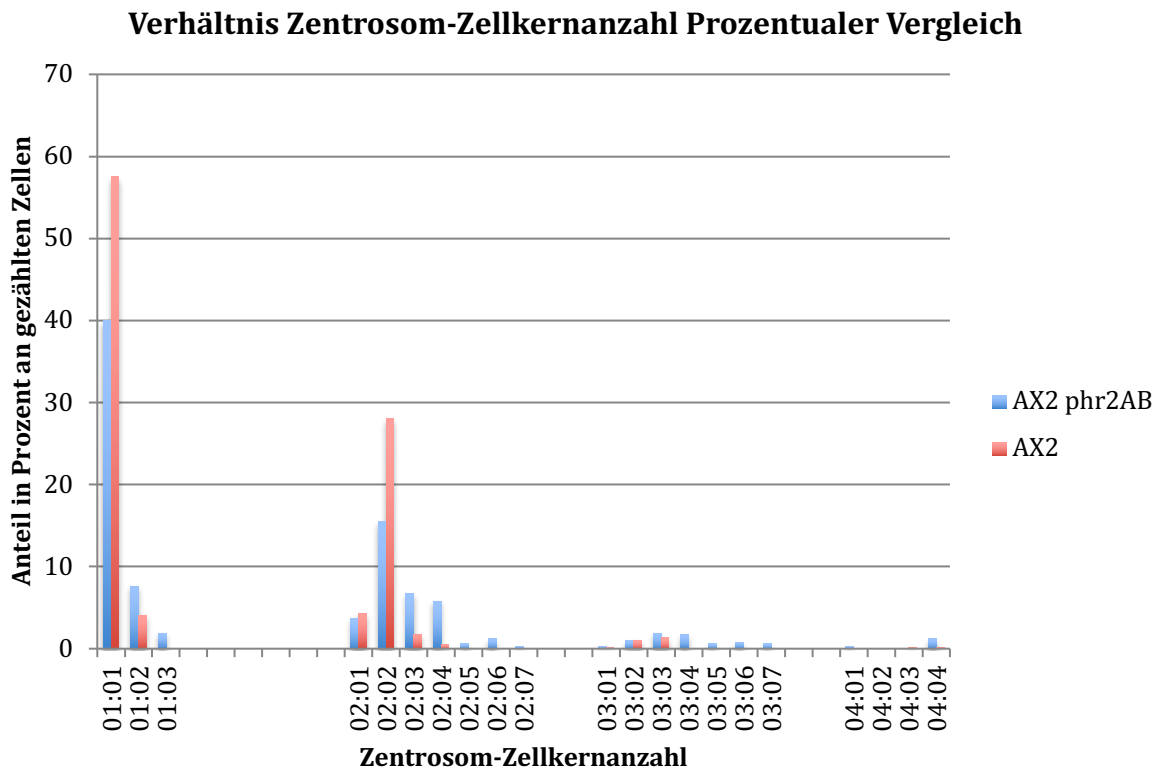


Abbildung 23: Verhältnis der Zellkern- und Zentrosomenanzahl in AX2 phr2AB-GFP. Es wurden 444 Zellen analysiert.

A)



B)



Abbildungen 24 A) und B): Vergleich des Verhältnisses Zentrosom-Zellkernanzahl in AX2 und AX2 phr2AB-GFP. Für AX2 wurden 360 und für AX2 phr2AB-GFP 444 Zellen analysiert. Die statistische Analyse zeigte einen signifikanten Unterschied von normalen zu abnormalen Zentrosom-Kernverhältnissen zwischen beiden Stämmen (A, rechter Teil). \*\*\*  $p < 0.001$ . A) entnommen aus (Müller et al., 2018)

Ein Vergleich der Daten zeigt, dass die Mehrzahl der Zellen der beiden Zelltypen ein Verhältnis von Zellkern zu Zentrosom von 1:1 und 2:2 aufweist. Jedoch hat AX2 phr2AB-GFP eine Vielzahl von Zellen mit sehr unausgeglichene und ungewöhnlichen Verteilungen, wie z. B. eine Zelle mit 7 Zellkernen und 12 Zentrosomen. Solche hohen Werte konnte man bei AX2 nicht beobachten, dessen höchste Zellkernanzahl 4 betrug und diese bei nur 2 Zellen beobachtet werden konnte (Abbildung 22, 24). Insgesamt war

somit bei AX2 phr2AB-GFP im Vergleich mit AX2 eine weit größere Spanne an unterschiedlichen Zellkern- und Zentrosomenanzahlen in den unterschiedlichsten Verhältnissen zu finden (Abbildung 24 A, normal – abnormal). Dieser Unterschied war statistisch hoch signifikant.

#### 4.9 Bestimmung der Zellgröße

Da eine erhöhte Zellkernanzahl auch die Zellgröße beeinflusst, wurde im nächsten Versuch die Zellgröße analysiert. Dazu wurden die Zellen in Suspension fotografiert und der Durchmesser mit dem Diskus-Programm gemessen.

Unter den Suspensionbedingungen sind die Zellen rund und die Messung des Durchmessers ein zuverlässiger Hinweis auf die Zellgröße.

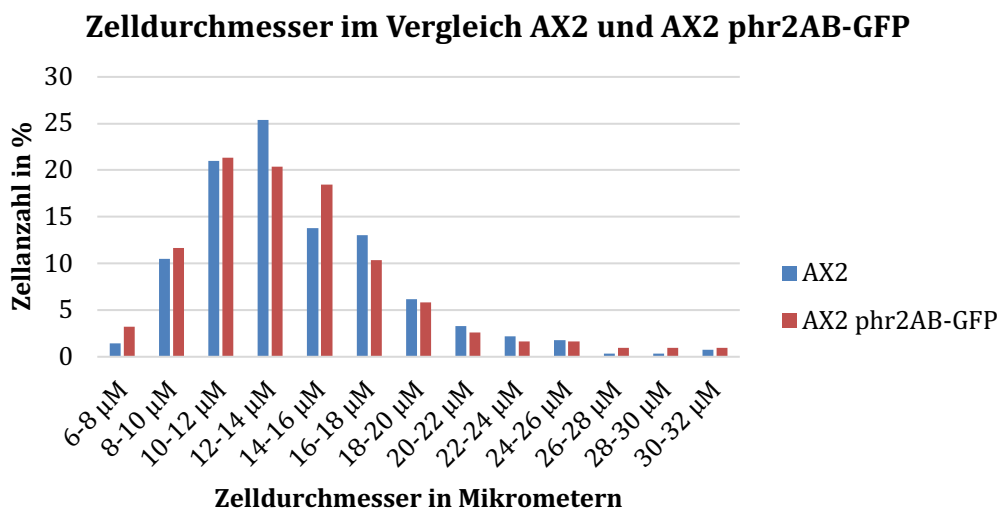


Abbildung 25: Vergleich der Zellgrößen von AX2 (blau) und AX2 phr2AB-GFP (rot) Zellen. Als Maß für die Zellgröße wurde der Durchmesser genommen, da davon ausgegangen werden kann, dass die Zellen unter den experimentellen Bedingungen vollständig abgerundet sind. Für AX2 wurden 276 Zellen analysiert, für AX2 phr2AB-GFP 309 Zellen.

Aus dem Vergleich der Zelldurchmesser von AX2 und AX2 phr2AB-GFP wird deutlich, dass die Mehrzahl der Zellen einen Durchmesser von 10 bis 14  $\mu\text{m}$  besitzen, wobei AX2 phr2AB-GFP zu einem etwas größeren Durchmesser (bis 16  $\mu\text{m}$ ) tendiert (Abbildung 25). Auffallend ist auch, dass bei den Mutanten Zellen zum Teil sehr große Durchmesser ( $>26 \mu\text{m}$ ) beobachtet wurden. Diese größeren Größen könnten durch die beobachtete erhöhte Zellkernanzahl bedingt sein.

#### 4.10 Wirkung des Phosphataseinhibitors Okadasäure auf Wildtyp und Mutante

Okadasäure ist ein Phosphataseinhibitor, der bevorzugt die Aktivität der PP2A hemmt. Da für *D. discoideum* kaum Daten zur Verwendung von Okadasäure vorliegen, wurden verschiedene Konzentrationen des Toxins verwendet. Die Inkubation wurde für drei Stunden durchgeführt. Die Auswirkungen des Toxins auf die Zellen war ebenfalls unklar. Möglicherweise könnten z.B. Veränderungen bei Prozessen, die mit dem Zentrosom in Verbindung stehen, auftreten. Die Zellen wurden deshalb für Immunfluoreszenzanalysen verwendet, mit Methanol fixiert und mit einem zentrosomalen Marker und mit DAPI gefärbt, um einen ersten Eindruck zu gewinnen. Das Zentrosom war in Bezug auf Lage und Anzahl nicht signifikant beeinträchtigt, im Vergleich zu unbehandelten Zellen (nicht gezeigt), es zeigte sich aber eine Veränderung der Zellkerngröße (Abbildung 26). Der Versuch wurde dreimal durchgeführt. Es wurden unterschiedliche Toxinkonzentrationen verwendet. Das Ergebnis eines der Experimente ist gezeigt. Pro Ansatz wurden jeweils 50 Zellkerndurchmesser bestimmt und die Daten prozentual ausgewertet.

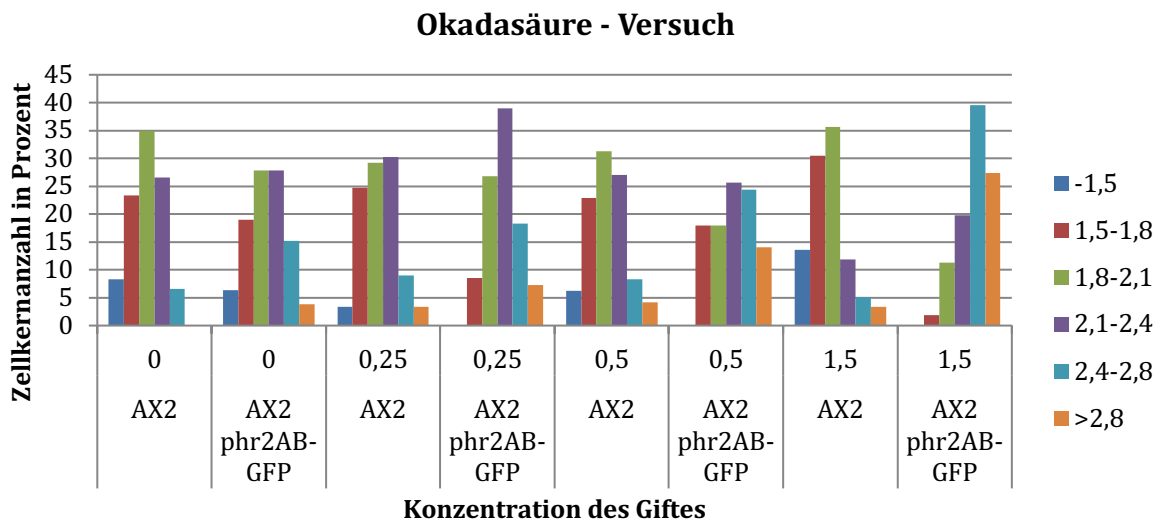
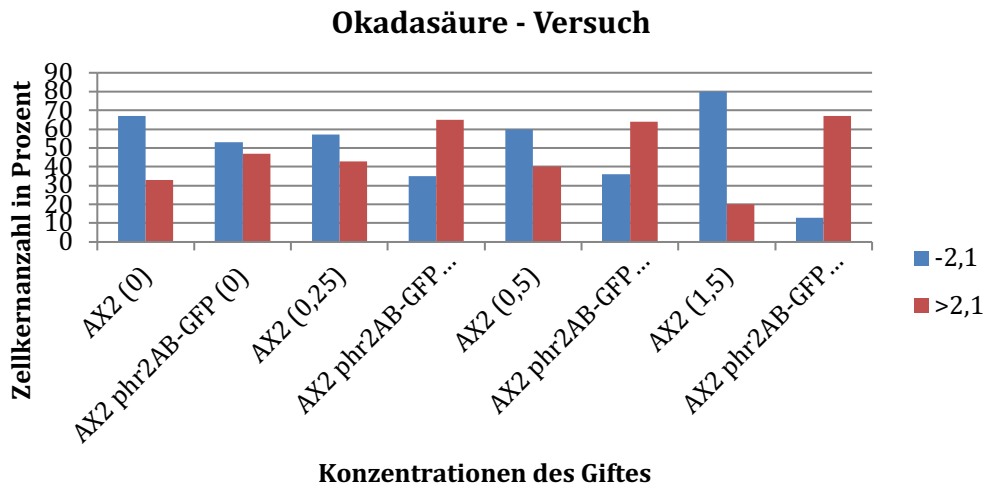


Abbildung 26: Wirkung von Okadasäure auf AX2 und AX2 phr2AB-GFP. Die verwendeten Toxinkonzentrationen (in  $\mu\text{M}$ ) sind angegeben. Die Inkubationszeit betrug drei Stunden. Der Kerndurchmesser wurde an Methanol-fixierten Zellen bestimmt. Rechts sind die Größenbereiche der Zellkerne (in  $\mu\text{m}$ ) angegeben.

Auffällig ist die Größenzunahme der Zellkerne in AX2 phr2AB-GFP mit steigender Toxinkonzentration, die so bei AX2 nicht beobachtet wurde. In Abbildung 27 A) wurden die Zellkerne in zwei Größenklassen eingeteilt, bis (-) 2,1  $\mu\text{m}$  und größer (>) 2,1  $\mu\text{m}$ , um den direkten Vergleich zwischen den beiden Zelllinien zu erleichtern.

A)



B)

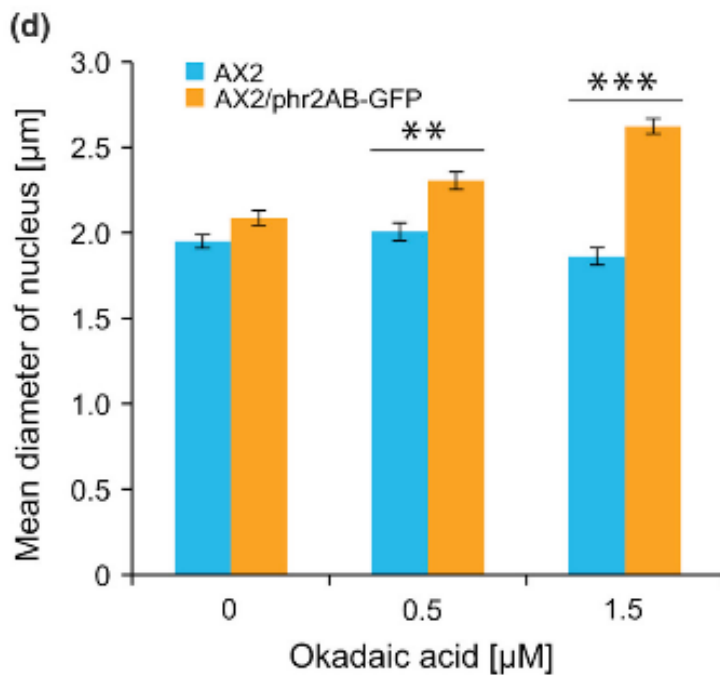


Abbildung 27 A): Wirkung von Okadasäure (Konzentration in µM) auf die Größe des Zellkerns. Die Zellkerne wurden in zwei Größenklassen (-2,1 µm, >2,1 µm) eingeteilt. Die bei AX2 eingetragene Giftkonzentration in µM (in Klammern) entspricht jeweils der Giftkonzentration für die nebenstehenden AX2 phr2AB-GFP Daten.

In B) ist der Effekt unterschiedlicher Okadasäurekonzentrationen auf den mittleren Kerndurchmesser dargestellt. Die Unterschiede zwischen AX2 und AX2 phr2AB-GFP sind statistisch signifikant (\*\* p < 0.01; \*\*\* p < 0.001). B) entnommen aus (Müller et al., 2018)

Die Zunahme des Durchmessers der Zellkerne bei AX2 phr2AB-GFP mit steigender Okadasäurekonzentration ist klar erkennbar. Bei hohen Konzentrationen liegt der Durchmesser von ca. dreiviertel der Zellkerne über 2,1  $\mu\text{m}$ . Bei AX2 nimmt hingegen der Zellkerndurchmesser bei höheren Toxinkonzentrationen ab. Eine Analyse der mittleren Durchmesser beider Zelllinien hat bei den Konzentrationen 0,5 und 1,5  $\mu\text{M}$  eine statistisch signifikante Zunahme für AX2 phr2AB-GFP ergeben (Abbildung 27 B).

Um zu untersuchen, ob der veränderte Durchmesser eventuell auf eine veränderte Höhe der Zellen und damit auch der Zellkerne zurückzuführen ist, wurde die Höhe der Kerne für Zellen, die mit 1,5  $\mu\text{M}$  Okadasäure behandelt waren, im Confokalmikroskop bestimmt. Dabei zeigte sich, dass die Kerne der Mutante flacher sind, das Volumen der Kerne also nicht notwendigerweise verändert ist. Die Kerne von AX2 hatten eine Höhe von  $2,31 \pm 0,287 \mu\text{M}$ , die Kerne von AX2 phr2AB-GFP eine Höhe von  $1,78 \pm 0,251 \mu\text{M}$ . Dafür wurden 38 Kerne pro Stamm vermessen. Der Unterschied war signifikant (\*\*\*) ( $p < 0,0001$ ). Das Ergebnis zeigt somit einen Effekt von Okadasäure auf die Morphologie des Kerns an. Die Höhe der Zellen konnte nicht bestimmt werden, da die Zellen nicht angefärbt waren.

#### 4.11 Interaktion des humanen CDK5RAP2 mit PP2A

CEP161 ist das Ortholog des Säugerproteins CDK5RAP2 (alternativer Name: CEP215). Um zu prüfen, ob die Interaktion mit PP2A auch im Säugersystem Gültigkeit hat, wurden Präzipitationsexperimente in HEK293 Zellen durchgeführt. Da gegen endogenes CEP215 keine Antikörper vorhanden waren, mit denen Immunpräzipitationsexperimente

durchgeführt werden konnten, wurden HEK293T Zellen mit einem Plasmid transfiziert, das die Expression von Myc-CEP215 ermöglichte (Sukumaran et al., 2017). Das Myc-Epitop, ein Bereich von zehn Aminosäuren, wird von mAb9E10 erkannt, der auch für Präzipitationsexperimente verwendet werden kann. Das Epitop, gegen das der Antikörper gerichtet ist, hat die Aminosäureabfolge EQKLISEEDL. Dies entspricht den Aminosäuren 410-419 des Myc-Proteins (Hilpert et al., 2001).

Das ektopisch exprimierte Protein Myc-CEP215 wurde mit Myc-Trap-Beads präzipitiert und das Präzipitat in einem 3-15% SDS-PA-Gradientengel aufgetrennt. Es wurde zunächst überprüft, ob Myc-CEP215 erfolgreich präzipitiert wurde, und der Pulldown anschließend mit einem Antikörper gegen die PP2A Untereinheit 55B, die das Ortholog von phr2AB ist, geprobt.

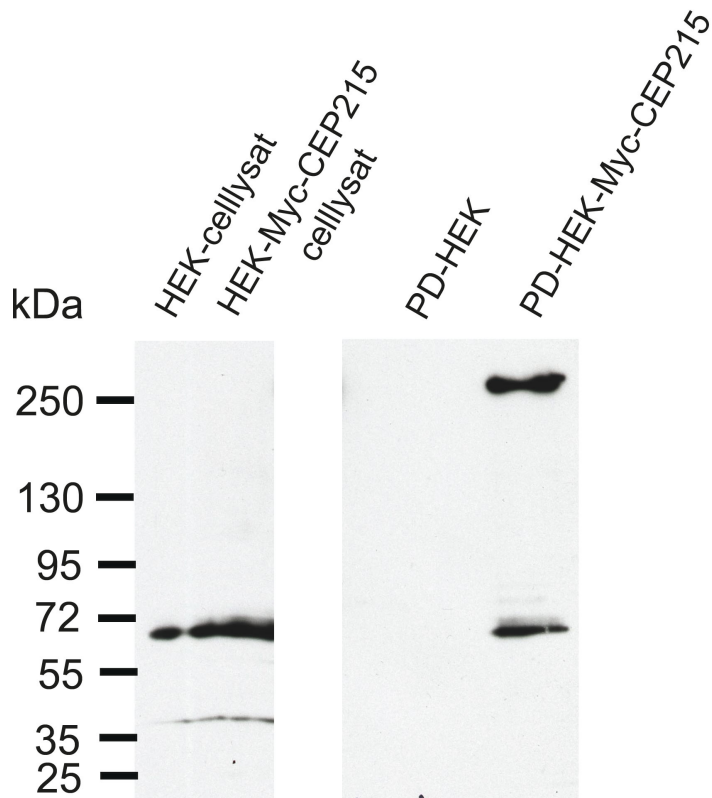


Abbildung 28: Nachweis des Myc-CEP215 im Myc-Pulldown mit mAb9E10. Die Auftrennung der Proteine erfolgte in einem Gradientengel (3-12% Acrylamid). HEK293T Zellen wurden mit einem Plasmid transfiziert, das die Expression von Myc-CEP215 erlaubte und das Protein mit Myc-Trap Beads präzipitiert (PD) und im Westernblot mit mAb9E10 nachgewiesen. Zur Kontrolle wurden Lysate von nicht-transfizierten HEK293T Zellen verwendet. Die Banden bei ~37 und 70 kDa stellen möglicherweise endogenes Myc dar.

Zum Nachweis der erfolgreichen Transfektion wurde die Membran mit dem Myc-Epitop spezifischen monoklonalen Antikörper mAb9E10 inkubiert. Im Zelllysate war in diesem Experiment Myc-CEP215 nicht nachweisbar. Dagegen war im Pulldown (PD), der mit den transfizierten Zellen durchgeführt wurde, eine Bande bei ~250 kDa zu erkennen (Abbildung 28). CEP215 hat im SDS-Gel ein Molekulargewicht von ~250 kDa. Die Fusion mit dem 10 Aminosäuren langen Myc-Epitop beeinflusst das Laufverhalten nur unwesentlich. Im Pulldown, der mit einem Lysat von HEK293T Kontrollzellen durchgeführt wurde, war kein Signal zu sehen.

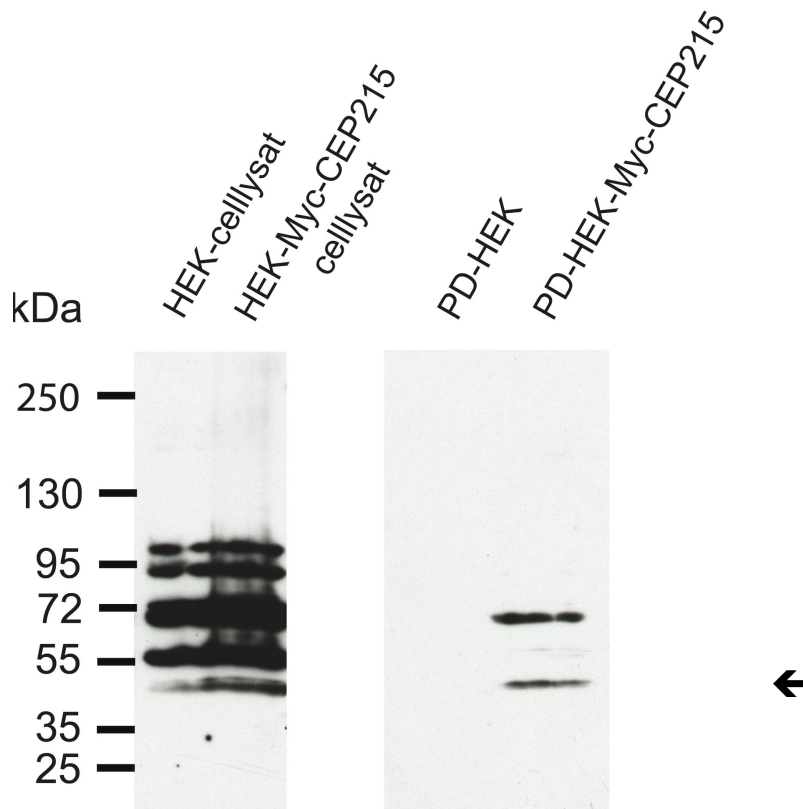


Abbildung 29: Kopräzipitation der 55B-Untereinheit der PP2A mit Myc-CEP215. Der in Abbildung 28 gezeigte Blot wurde mit einem kommerziellen Antikörper spezifisch für 55B geprobt. Der Pfeil weist auf die ~50 kDa 55B-Untereinheit hin. Die Identität des ~70 kDa Proteins ist unklar.

Der Blot wurde nach dem Stripping des Erstantikörpers mit einem 55B spezifischen Antikörper geprobt (Abbildung 29). In den Zelllysaten sind mehrere Banden zu erkennen. Den veröffentlichten Daten nach soll 55B im SDS-Gel ein Molekulargewicht von ~50 kDa besitzen, dies entspräche der untersten Bande. Im Pulldown der untransfizierten Zellen sieht man keine Bande. Im Pulldown der transfizierten Zellen sind ein ~50kDa Protein (Pfeil in Abbildung 29) und eine Bande bei ~72 kDa zu sehen. Ihre Identität ist unklar. Dieses Ergebnis ist somit ein erster Hinweis darauf, dass auch im Säugersystem eine Interaktion zwischen dem zentrosomalen CDK5RAP2 und der PP2A stattfinden kann.

## 5) Diskussion

In jeder Zelle gibt es ein komplexes Zusammenspiel verschiedener Komponenten, seien es nun Enzyme, DNA oder Zellorganellen. Ein kleiner Fehler in diesem System kann bereits weitreichende Folgen haben, die dann den ganzen Organismus betreffen.

In der Medizin sind viele Erkrankungen noch nicht ganz verstanden, je weiter man jedoch in der Erforschung des Zusammenspiels der Zellkomponenten kommt und je mehr man über die Auswirkungen von Fehlern in diesem System versteht, desto besser kann man auch zukünftig die Therapie von Erkrankungen zielgerichteter fokussieren.

*D. discoideum* bietet als Modellorganismus ein sehr gutes Beispiel anhand dessen man besagte Fehler studieren kann und damit auch Rückschlüsse auf mögliche Auswirkungen im menschlichen Organismus ziehen kann (Bozzaro, 2019; McLaren et al., 2019).

Basierend auf diesen neuen Erkenntnissen können in der Zukunft zielgerichtete Therapien entwickelt werden, die langfristige Heilung versprechen, so wie zum Beispiel die Therapie mittels Gene editing inklusive der Verwendung von CRISPR/Cas9 für die Korrektur des dysfunktionalen CFTR-Gens bei Mukoviszidose Patienten (Miah et al. 2019).

CEP161 ist das Ortholog von CDK5RAP2, welches als zentrosomales Protein in Säugetieren eine wichtige Funktion im Rahmen der Zellteilung und des Zellzyklus spielt und dessen Fehlfunktion mit primärer Mikrozephalie und Alzheimer in Verbindung steht.

Im Rahmen der primären Mikrozephalie bedingt die Mutation von CDK5RAP2 zudem hypothalamische, retinale und kochleäre Entwicklungsdefekte (Nasser et al. 2020). Dies

unterstreicht die Bedeutung dieses Proteins. Im Rahmen unserer Versuche konnte hier eine Interaktion von CEP161 und phr2AB nachgewiesen werden. Aufgrund der hohen Konservierung ist anzunehmen, dass auch in Säugetieren CDK5RAP2 und das Ortholog von phr2AB, die regulatorische Untereinheit B55 von PP2A, miteinander interagieren. Ein Hinweis darauf sind erste Ergebnisse aus einem Pulldown Experiment (Abb. 29). Dadurch erscheint es möglich, dass auch B55 durch Veränderungen an CDK5RAP2 beeinflusst werden kann. Die Rolle von B55 im Rahmen der primären Mikrozephalie ist jedoch unklar und es benötigt weitergehende Untersuchungen, um das Ausmaß der Interaktion und deren Auswirkungen zu erfassen.

Da hier gezeigt werden konnte, dass phr2AB vor allem mit dem Abschnitt von CEP161 interagiert der die  $\gamma$ TuRC Region enthält, bedeutet dies, dass phr2AB an den zentralen Prozessen am Zentrosom, welche durch CEP161 ausgeführt werden, sehr wahrscheinlich mit involviert ist. Inwieweit B55 in Säugetieren an den Prozessen von CDK5RAP2 involviert ist, bleibt unklar. Jedoch ist die Proteinphosphatase PP2A am Zentrosom vorhanden, wo sie wichtige regulatorische Funktionen besitzt, und für die B55 Untereinheit wurde eine Rolle bei der Regulation der Zentrosomentrennung in *Caenorhabditis elegans* beschrieben (Boudreau et al, 2019). CDK5RAP2, der wahrscheinliche Bindepartner von B55, ist ein Phosphoprotein der perizentriolären Matrix. Die Entfernung der Phosphatreste ist ein regulatorisches Ereignis bei der Auflösung dieser Matrix, an dem PP2A mit seiner regulatorischen Untereinheit beteiligt ist (Enos et al., 2018).

Durch unsere Untersuchungen kann darauf geschlossen werden, dass B55 an den Prozessen am Zentrosom durch CDK5RAP2 einen wichtigen Beitrag leistet und dass Veränderungen in einem der Proteine auch das andere Protein mitbeeinflussen könnte.

Es bleibt zu untersuchen, ob die Veränderung von CDK5RAP2 bei Mikrozephalie auch eine Veränderung oder Beeinflussung von B55 mit sich zieht und inwiefern dies eine Bedeutung im Krankheitsgeschehen mit sich bringt.

In weiteren Versuchen wurde hier die Folge der Überexpression von CEP161 und phr2AB untersucht und die Lokalisation beider Proteine in der zentrosomalen Region mittels Immunfluoreszenz dargestellt.

Die Überexpression beider Proteine bedingte multiple Veränderungen in den Zellen, was sich in einem reduzierten Wachstumsverhalten, veränderten Zellkernanzahl pro Zelle und einem veränderten Verhältnis der Zellkern- zur Zentrosomenanzahl äußert.

Im menschlichen Organismus führen die Veränderungen an CDK5RAP2 auch zu verringertem Zellwachstum, was in die Mikrozephalie mündet. Somit kann als Rückschluss gefolgert werden, dass auch Veränderungen in B55 zum Krankheitsgeschehen beitragen könnten. Das Ausmaß dieses Beitrages bleibt durch die Versuche unklar und es benötigt weitergehende Untersuchungen, inwieweit B55 eine Rolle bei diesen Prozessen einnimmt. Jedoch wird durch die Ergebnisse deutlich, dass vor allem die zentrosomalen Prozesse durch Veränderungen an CEP161 und phr2AB beeinträchtigt werden, was zu weitreichenden Folgen vor allem in der Zellteilung und -struktur führt, welche wiederum, bezogen auf die Orthologe B55 und CDK5RAP2, die Relevanz der zentrosomalen Prozesse für eine geregelte Zellfunktion zeigen.

Störungen und Dysbalancen in diesen Prozessen bedingen für den betroffenen Organismus weitreichende Folgen. Inwieweit dieses Wissen für therapeutische Zwecke in der Zukunft genutzt werden kann, bleibt abzuwarten.

Vielversprechende Vorstöße in der Gentherapie, wie am Anfang in dem genannten Beispiel zur Mukoviszidose, versprechen aber eine Vielfalt an neuen Therapieansätzen

in der Zukunft. Vor allem der Ersatz dysfunktionaler Proteine durch Gentherapie erscheint vielversprechend.

Auch die Inhibition der Phosphataseaktivität mittels dem Phosphataseinhibitor Okadasäure, der bevorzugt die Aktivität der PP2A hemmt, zeigte einen Unterschied im Verhalten der Mutante zur Wildtyp-Zellreihe. Dies unterstreicht erneut die veränderte Zellfunktion durch die Überexpression von phr2AB. Dadurch kann darauf geschlossen werden, dass auch ein verändertes B55 Protein im Säugetier-Organismus anders auf äußere Einflüsse reagieren könnte als ein nicht verändertes B55. Die Zellen zeigen somit nicht nur ein insgesamt verändertes Verhalten durch das veränderte Protein und damit auch die veränderte Funktion an den zentrosomalen Prozessen, sondern auch ein verändertes Verhalten auf äußere Einflüsse. Die weitreichenden Auswirkungen dieser veränderten Reaktionsbereitschaft und was dies konkret für Erkrankungen wie die Mikrozephalie bedeutet, auch im Bezug auf Therapieansätze, bleibt jedoch noch unklar.

## **6) Literaturverzeichnis**

Annesley SJ, Fisher PR. Dictyostelium discoideum--a model for many reasons. *Mol Cell Biochem.* 2009 Sep;329(1-2):73-91. doi: 10.1007/s11010-009-0111-8. Epub 2009 Apr 22. PMID: 19387798.

Beutner EH. IMMUNOFLUORESCENT STAINING: THE FLUORESCENT ANTIBODY METHOD. *Bacteriol Rev.* 1961 Mar;25(1):49-76. doi: 10.1128/br.25.1.49-76.1961. PMID: 16350169

Bhattacharya K, Swaminathan K, Peche VS, Clemen CS, Knyphausen P, Lammers M, Noegel AA, Rastetter RH. Novel Coronin7 interactions with Cdc42 and N-WASP regulate actin organization and Golgi morphology. *Sci Rep.* 2016 May 4;6:25411. doi: 10.1038/srep25411. PMID: 27143109

Blau-Wasser R, Euteneuer U, Xiong H, Gassen B, Schleicher M, Noegel AA. CP250, a novel acidic coiled-coil protein of the Dictyostelium centrosome, affects growth, chemotaxis, and the nuclear envelope. *Mol Biol Cell.* 2009 Oct;20(20):4348-61. doi: 10.1091/mbc.e09-03-0180. Epub 2009 Aug 19. PMID: 19692569

Boudreau V, Chen R, Edwards A, Sulaimain M, Maddox PS. PP2A-B55/SUR-6 collaborates with the nuclear lamina for centrosome separation during mitotic entry. *Mol Biol Cell.* 2019 Mar 21;30(7):876-886. doi: 10.1091/mbc.E18-10-0631. Epub 2019 Mar 6. PMID: 30840554

Bozzaro S. The past, present and future of Dictyostelium as a model system. *Int J Dev Biol.* 2019;63(8-9-10):321-331. doi: 10.1387/ijdb.190128sb. PMID: 31840772.

Choi YK, Liu P, Sze SK, Dai C, Qi RZ. CDK5RAP2 stimulates microtubule nucleation by the gamma-tubulin ring complex. *J Cell Biol.* 2010 Dec 13;191(6):1089-95. doi: 10.1083/jcb.201007030. Epub 2010 Dec 6. PMID: 21135143

Conduit PT, Wainman A, Raff JW. Centrosome function and assembly in animal cells. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2015 Oct;16(10):611-24. doi: 10.1038/nrm4062. Epub 2015 Sep 16. PMID: 26373263.

Cundell MJ, Hutter LH, Nunes Bastos R, Poser E, Holder J, Mohammed S, Novak B, Barr FA. A PP2A-B55 recognition signal controls substrate dephosphorylation kinetics during mitotic exit. *J Cell Biol.* 2016 Aug 29;214(5):539-54. doi: 10.1083/jcb.201606033. Epub 2016 Aug 22. PMID: 27551054

Dormann D, Vasiev B, Weijer CJ. Becoming Multicellular by Aggregation; The Morphogenesis of the Social Amoebae Dictyostelium discoideum. *J Biol Phys.* 2002 Dec;28(4):765-80. doi: 10.1023/A:1021259326918. PMID: 23345812

Eichinger L, Pachebat JA, Glöckner G, Rajandream MA, Sugang R, Berriman M, Song J, Olsen R, Szafranski K, Xu Q, Tunggal B, Kummerfeld S, Madera M, Konfortov BA, Rivero F,

Bankier AT, Lehmann R, Hamlin N, Davies R, Gaudet P, Fey P, Pilcher K, Chen G, Saunders D, Sodergren E, Davis P, Kerhornou A, Nie X, Hall N, Anjard C, Hemphill L, Bason N, Farbrother P, Desany B, Just E, Morio T, Rost R, Churcher C, Cooper J, Haydock S, van Driessche N, Cronin A, Goodhead I, Muzny D, Mourier T, Pain A, Lu M, Harper D, Lindsay R, Hauser H, James K, Quiles M, Madan Babu M, Saito T, Buchrieser C, Wardroper A, Felder M, Thangavelu M, Johnson D, Knights A, Loulseged H, Mungall K, Oliver K, Price C, Quail MA, Urushihara H, Hernandez J, Rabbinowitsch E, Steffen D, Sanders M, Ma J, Kohara Y, Sharp S, Simmonds M, Spiegler S, Tivey A, Sugano S, White B, Walker D, Woodward J, Winckler T, Tanaka Y, Shaulsky G, Schleicher M, Weinstock G, Rosenthal A, Cox EC, Chisholm RL, Gibbs R, Loomis WF, Platzer M, Kay RR, Williams J, Dear PH, Noegel AA, Barrell B, Kuspa A. The genome of the social amoeba *Dictyostelium discoideum*. *Nature*. 2005 May 5;435(7038):43-57. doi: 10.1038/nature03481. PMID: 15875012

Enos SJ, Dressler M, Gomes BF, Hyman AA, Woodruff JB. Phosphatase PP2A and microtubule-mediated pulling forces disassemble centrosomes during mitotic exit. *Biol Open*. 2018 Jan 12;7(1):bio029777. doi: 10.1242/bio.029777. PMID: 29222174

Fogeron ML, Müller H, Schade S, Dreher F, Lehmann V, Kühnel A, Scholz AK, Kashofer K, Zerck A, Fauler B, Lurz R, Herwig R, Zatloukal K, Lehrach H, Gobom J, Nordhoff E, Lange BM. LGALS3BP regulates centriole biogenesis and centrosome hypertrophy in cancer cells. *Nat Commun*. 2013;4:1531. doi: 10.1038/ncomms2517. PMID: 23443559.

Gutiérrez-Caballero C, Cebollero LR, Pendás AM. Shugoshins: from protectors of cohesion to versatile adaptors at the centromere. *Trends Genet*. 2012 Jul;28(7):351-60. doi: 10.1016/j.tig.2012.03.003. Epub 2012 Apr 27. PMID: 22542109.

Hilpert K, Hansen G, Wessner H, Küttner G, Welfle K, Seifert M, Höhne W. Anti-c-myc antibody 9E10: epitope key positions and variability characterized using peptide spot synthesis on cellulose. *Protein Eng*. 2001 Oct;14(10):803-6. doi: 10.1093/protein/14.10.803. PMID: 11739900.

Humphrey SJ, James DE, Mann M. Protein Phosphorylation: A Major Switch Mechanism for Metabolic Regulation. *Trends Endocrinol Metab*. 2015 Dec;26(12):676-687. doi: 10.1016/j.tem.2015.09.013. Epub 2015 Oct 20. PMID: 26498855.

Kawabe Y, Du Q, Schilde C, Schaap P. Evolution of multicellularity in *Dictyostelia*. *Int J Dev Biol*. 2019;63(8-9-10):359-369. doi: 10.1387/ijdb.190108ps. PMID: 31840775

Kilmartin JV, Wright B, Milstein C. Rat monoclonal antitubulin antibodies derived by using a new nonsecreting rat cell line. *J Cell Biol*. 1982 Jun;93(3):576-82. doi: 10.1083/jcb.93.3.576. PMID: 6811596

Heinrich/Müller/Graeve; Löffler/Petrides. (2014) *Biochemie und Pathobiochemie*. 9.Auflage. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. Kapitel 13 , Seite 177 - 178, Kapitel 6 , Abschnitt 6.3 , Seite 93, ISBN 978-3-642-17972-3, doi 10.1007/978-3-642-17972-3

Kim HS, Baek KH, Ha GH, Lee JC, Kim YN, Lee J, Park HY, Lee NR, Lee H, Cho Y, Lee CW. The hsSsu72 phosphatase is a cohesin-binding protein that regulates the resolution of sister chromatid arm cohesion. *EMBO J.* 2010 Oct 20;29(20):3544-57. doi: 10.1038/emboj.2010.217. Epub 2010 Sep 3. PMID: 20818333

Kim HS, Kim SH, Park HY, Lee J, Yoon JH, Choi S, Ryu SH, Lee H, Cho HS, Lee CW. Functional interplay between Aurora B kinase and Ssu72 phosphatase regulates sister chromatid cohesion. *Nat Commun.* 2013;4:2631. doi: 10.1038/ncomms3631. PMID: 24149858.

Kim HS, Fernandes G, Lee CW. Protein Phosphatases Involved in Regulating Mitosis: Facts and Hypotheses. *Mol Cells.* 2016 Sep;39(9):654-62. doi: 10.14348/molcells.2016.0214. Epub 2016 Sep 27. PMID: 27669825

Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970 Aug 15;227(5259):680-5. doi: 10.1038/227680a0. PMID: 5432063.

Li Z, Zhang X. Kinases Involved in Both Autophagy and Mitosis. *Int J Mol Sci.* 2017 Aug 31;18(9):1884. doi: 10.3390/ijms18091884. PMID: 28858266

Lindqvist A, Källström H, Lundgren A, Barsoum E, Rosenthal CK. Cdc25B cooperates with Cdc25A to induce mitosis but has a unique role in activating cyclin B1-Cdk1 at the centrosome. *J Cell Biol.* 2005 Oct 10;171(1):35-45. doi: 10.1083/jcb.200503066. PMID: 16216921

Loomis WF. The *Dictyostelium* genome. *Curr Issues Mol Biol.* 2006 Jul;8(2):63-73. PMID: 16875414.

Mahmood S, Ahmad W, Hassan MJ. Autosomal Recessive Primary Microcephaly (MCPH): clinical manifestations, genetic heterogeneity and mutation continuum. *Orphanet J Rare Dis.* 2011 Jun 13;6:39. doi: 10.1186/1750-1172-6-39. PMID: 21668957

Mahmood T, Yang PC. Western blot: technique, theory, and trouble shooting. *N Am J Med Sci.* 2012 Sep;4(9):429-34. doi: 10.4103/1947-2714.100998. PMID: 23050259

Masud Rana AY, Tsujioka M, Miyagishima S, Ueda M, Yumura S. Dynamin contributes to cytokinesis by stabilizing actin filaments in the contractile ring. *Genes Cells.* 2013 Aug;18(8):621-35. doi: 10.1111/gtc.12060. Epub 2013 May 17. PMID: 23679940.

McLaren MD, Mathavarajah S, Huber RJ. Recent Insights into NCL Protein Function Using the Model Organism *Dictyostelium discoideum*. *Cells.* 2019 Feb 2;8(2):115. doi: 10.3390/cells8020115. PMID: 30717401.

Megraw TL, Sharkey JT, Nowakowski RS. Cdk5rap2 exposes the centrosomal root of microcephaly syndromes. *Trends Cell Biol.* 2011 Aug;21(8):470-80. doi: 10.1016/j.tcb.2011.04.007. Epub 2011 May 31. PMID: 21632253

Merigliano C, Marzio A, Renda F, Somma MP, Gatti M, Verni F. A Role for the Twins Protein Phosphatase (PP2A-B55) in the Maintenance of *Drosophila* Genome Integrity. *Genetics*. 2017 Mar;205(3):1151-1167. doi: 10.1534/genetics.116.192781. Epub 2016 Dec 30. PMID: 28040742

Miah KM, Hyde SC, Gill DR. Emerging gene therapies for cystic fibrosis. *Expert Rev Respir Med*. 2019 Aug;13(8):709-725. doi: 10.1080/17476348.2019.1634547. Epub 2019 Jun 27. PMID: 31215818.

Mishra M, Tiwari S, Gomes AV. Protein purification and analysis: next generation Western blotting techniques. *Expert Rev Proteomics*. 2017 Nov;14(11):1037-1053. doi: 10.1080/14789450.2017.1388167. Epub 2017 Oct 13. PMID: 28974114.

Müller H, Fogeron ML, Lehmann V, Lehrach H, Lange BM. A centrosome-independent role for gamma-TuRC proteins in the spindle assembly checkpoint. *Science*. 2006 Oct 27;314(5799):654-7. doi: 10.1126/science.1132834. PMID: 17068266.

Müller-Esterl Werner (2011 Edition (15. Oktober 2010)), *Biochemie- Eine Einführung für Mediziner und Naturwissenschaftler*, Unter Mitarbeit von Ulrich Brandt, Oliver Anderka, Stefan Kerscher, Stefan Kieß und Katrin Ridinger, 2.Auflage. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg 2010- ein Imprint von Springer. Kapitel 6; Abschnitt 6.9; Seite 94-95, ISBN-13: 978-3827420039

Müller R, Stumpf M, Wehrstedt R, Sukumaran SK, Karow MA, Marko M, Noegel AA, Eichinger L. The regulatory subunit phr2AB of Dictyostelium discoideum phosphatase PP2A interacts with the centrosomal protein CEP161, a CDK5RAP2 ortholog. *Genes Cells*. 2018 Oct;23(10):923-931. doi: 10.1111/gtc.12637. Epub 2018 Sep 21. PMID: 30133996.

Murphy MB, Egelhoff TT. Biochemical characterization of a Dictyostelium myosin II heavy-chain phosphatase that promotes filament assembly. *Eur J Biochem*. 1999 Sep;264(2):582-90. doi: 10.1046/j.1432-1327.1999.00670.x. PMID: 10491107.

Nasser H, Vera L, Elmaleh-Bergès M, Steindl K, Letard P, Teissier N, Ernault A, Guimiot F, Afenjar A, Moutard ML, Héron D, Alembik Y, Momtchilova M, Milani P, Kubis N, Pouvreau N, Zollino M, Guilmin Crepon S, Kaguelidou F, Gressens P, Verloes A, Rauch A, El Ghouzzi V, Drunat S, Passemard S. *CDK5RAP2* primary microcephaly is associated with hypothalamic, retinal and cochlear developmental defects. *J Med Genet*. 2020 Jun;57(6):389-399. doi: 10.1136/jmedgenet-2019-106474. Epub 2020 Feb 3. PMID: 32015000.

Nigg EA. Centrosome aberrations: cause or consequence of cancer progression? *Nat Rev Cancer*. 2002 Nov;2(11):815-25. doi: 10.1038/nrc924. PMID: 12415252.

Noegel AA, Blau-Wasser R, Sultana H, Müller R, Israel L, Schleicher M, Patel H, Weijer CJ. The cyclase-associated protein CAP as regulator of cell polarity and cAMP signaling in

Dictyostelium. *Mol Biol Cell*. 2004 Feb;15(2):934-45. doi: 10.1091/mbc.e03-05-0269. Epub 2003 Oct 31. PMID: 14595119

Otto GP, Kessin RH. The intriguing biology of *Dictyostelium discoideum*. Meeting report: International Dictyostelium Conference 2001. *Protist*. 2001 Dec;152(4):243-8. doi: 10.1078/1434-4610-00064. PMID: 11822655..

Rai V, Egelhoff TT. Role of B regulatory subunits of protein phosphatase type 2A in myosin II assembly control in *Dictyostelium discoideum*. *Eukaryot Cell*. 2011 Apr;10(4):604-10. doi: 10.1128/EC.00296-10. Epub 2011 Feb 25. PMID: 21357476

Masud Rana AY, Tsujioka M, Miyagishima S, Ueda M, Yumura S. Dynamin contributes to cytokinesis by stabilizing actin filaments in the contractile ring. *Genes Cells*. 2013 Aug;18(8):621-35. doi: 10.1111/gtc.12060. Epub 2013 May 17. PMID: 23679940.

Sangodkar J, Farrington CC, McClinch K, Galsky MD, Kastrinsky DB, Narla G. All roads lead to PP2A: exploiting the therapeutic potential of this phosphatase. *FEBS J*. 2016 Mar;283(6):1004-24. doi: 10.1111/febs.13573. Epub 2015 Nov 14. PMID: 26507691

Schlaitz AL, Srayko M, Dammermann A, Quintin S, Wielsch N, MacLeod I, de Robillard Q, Zinke A, Yates JR 3rd, Müller-Reichert T, Shevchenko A, Oegema K, Hyman AA. The *C. elegans* RSA complex localizes protein phosphatase 2A to centrosomes and regulates mitotic spindle assembly. *Cell*. 2007 Jan 12;128(1):115-27. doi: 10.1016/j.cell.2006.10.050. PMID: 17218259

Smart Programm: <http://smart.embl-heidelberg.de> (zuletzt abgerufen am 16.08.2022)  
Ivica Letunic, Supriya Khedkar, Peer Bork, SMART: recent updates, new developments and status in 2020, *Nucleic Acids Research*, Volume 49, Issue D1, 8 January 2021, Pages D458–D460, <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa937>

Speckmann/Hescheler/Köhling (2013). *Physiologie*. 6.Auflage . Urban und Fischer Verlag - Imprint der Elsevier GmbH München. Kapitel 5; Abschnitt 5.2.3; Seiten 195-196, ISBN13: 9783437413193

Sukumaran SK, Blau-Wasser R, Rohlf M, Gallinger C, Schleicher M, Noegel AA. The centrosomal component CEP161 of *Dictyostelium discoideum* interacts with the Hippo signaling pathway. *Cell Cycle*. 2015;14(7):1024-35. doi: 10.1080/15384101.2015.1007015. PMID: 25607232

Sukumaran SK, Stumpf M, Salamon S, Ahmad I, Bhattacharya K, Fischer S, Müller R, Altmüller J, Budde B, Thiele H, Tariq M, Malik NA, Nürnberg P, Baig SM, Hussain MS, Noegel AA. CDK5RAP2 interaction with components of the Hippo signaling pathway may play a role in primary microcephaly. *Mol Genet Genomics*. 2017 Apr;292(2):365-383. doi: 10.1007/s00438-016-1277-x. Epub 2016 Dec 21. PMID: 28004182

Swaminathan K, Müller-Taubenberger A, Faix J, Rivero F, Noegel AA. A Cdc42- and Rac-interactive binding (CRIB) domain mediates functions of coronin. *Proc Natl Acad Sci U S*

A. 2014 Jan 7;111(1):E25-33. doi: 10.1073/pnas.1315368111. Epub 2013 Dec 17. PMID: 24347642

Thomas P, Smart TG. HEK293 cell line: a vehicle for the expression of recombinant proteins. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 2005 May-Jun;51(3):187-200. doi: 10.1016/j.vascn.2004.08.014. PMID: 15862464.

Vuotto C, Longo F, Pascolini C, Donelli G, Balice MP, Libori MF, Tiracchia V, Salvia A, Varaldo PE. Biofilm formation and antibiotic resistance in *Klebsiella pneumoniae* urinary strains. *J Appl Microbiol*. 2017 Oct;123(4):1003-1018. doi: 10.1111/jam.13533. Epub 2017 Aug 25. PMID: 28731269.

Welsch/Kummer/Deller (2014). *Histologie*. 4.Auflage. Urban und Fischer Verlag - Imprint der Elsevier GmbH München, Kapitel 2; Abschnitt 2.6.1; Seite 61-63, ISBN-13: 978-3-437-44433-3 / 9783437444333

Wilson D. A Troubled Past? Reassessing Ethics in the History of Tissue Culture. *Health Care Anal*. 2016 Sep;24(3):246-59. doi: 10.1007/s10728-015-0304-0. PMID: 26240021

Woods CG, Bond J, Enard W. Autosomal recessive primary microcephaly (MCPH): a review of clinical, molecular, and evolutionary findings. *Am J Hum Genet*. 2005 May;76(5):717-28. doi: 10.1086/429930. Epub 2005 Mar 31. PMID: 15806441

Xing H, Vanderford NL, Sarge KD. The TBP-PP2A mitotic complex bookmarks genes by preventing condensin action. *Nat Cell Biol*. 2008 Nov;10(11):1318-23. doi: 10.1038/ncb1790. Epub 2008 Oct 19. PMID: 18931662

Xiong H, Rivero F, Euteneuer U, Mondal S, Mana-Capelli S, Laroche D, Vogel A, Gassen B, Noegel AA. Dictyostelium Sun-1 connects the centrosome to chromatin and ensures genome stability. *Traffic*. 2008 May;9(5):708-24. doi: 10.1111/j.1600-0854.2008.00721.x. Epub 2008 Feb 11. PMID: 18266910.

Xu C, Min J. Structure and function of WD40 domain proteins. *Protein Cell*. 2011 Mar;2(3):202-14. doi: 10.1007/s13238-011-1018-1. Epub 2011 Apr 6. PMID: 21468892

## **7) Abbildungsverzeichnis**

1) Fruchtkörper von <i>D. discoideum</i> mit basaler Platte, Stiel und Sporenköpfchen	11
2) Die Phosphatase PP2A	14
3) Zentrosomale Veränderungen während des Teilungszyklus	17
4) Agarplatte mit <i>Klebsiella</i> -Wachstum	32
5) Darstellung der Abläufe während eines Western Blots	35
6) Beispiel eines Western Blots mit unterschiedlichen Zellhomogenaten	36
7) Vorhersage der Struktur von phr2AB mit dem Programm Smart	45
8) Vergleich der Proteinsequenz des <i>D. discoideum</i> phr2AB (Query) mit der menschlichen regulatorischen B Untereinheit Isoform alpha (Sbjct). +	46
9) Expression von phr2AB-GFP in AX2	48
10) Ko-Immünpräzipitation von CEP161	50
11) Übersicht über CEP161 und die GST-Fusionsproteine D2 und D3	51
12) Bindung von phr2AB-GFP an GST-CEP161-Fusionsproteine D2 und D3	51
13) Lokalisation von phr2AB-GFP in AX2 Zellen	52
14) Kolokalisation von GFP-CEP161 mit CP250 (in rot) am Zentrosom	53
15) Analyse des Tubulinnetzwerks in phr2AB-GFP Zellen	54
16) Wachstum von AX2 und AX2 phr2AB-GFP in Schüttelkultur	55
17) Wachstum von AX2 und AX2 phr2AB-GFP auf einem Bakterienrasen	56
18) Anzahl der Zellkerne pro Zelle in AX2 und AX2 phr2AB-GFP	58
19) Zentrosom-Zellkernabstand bei AX2 Wildtyp	60
20) Zentrosom-Zellkernabstand bei AX2 phr2AB-GFP	61
21) Zellkern-Zentrosomenabstand im prozentualen Vergleich von AX2 und AX2 GFP-phr2AB	62
22) Verhältnis der Zellkern- und Zentrosomenanzahl im Wildtyp AX2	63

23) Verhältnis der Zellkern- und Zentrosomenanzahl in AX2 phr2AB-GFP	64
24) Vergleich des Verhältnisses Zentrosom-Zellkernanzahl in AX2 und AX2 phr2AB-GFP	64-65
25) Vergleich der Zellgrößen von AX2 (blau) und AX2 phr2AB-GFP (rot) Zellen	66
26) Wirkung von Okadasäure auf AX2 und AX2 phr2AB-GFP	68
27) Wirkung von Okadasäure (Konzentration in $\mu\text{M}$ ) auf die Größe des Zellkerns	69
28) Nachweis des Myc-CEP215 im Myc-Pulldown mit mAb9E10.	72
29) Kopräzipitation der 55B-Untereinheit der PP2A mit Myc-CEP215	73

### **8) Vorabveröffentlichung von Ergebnissen**

Müller R, Stumpf M, Wehrstedt R, Sukumaran SK, Karow MA, Marko M, Noegel AA, Eichinger L. The regulatory subunit phr2AB of Dictyostelium discoideum phosphatase PP2A interacts with the centrosomal protein CEP161, a CDK5RAP2 ortholog. Genes Cells. 2018 Oct;23(10):923-931. doi: 10.1111/gtc.12637. Epub 2018 Sep 21. PMID: 30133996.