

Aktivierung der Mikrotubuli – Nukleationsfunktion des γ -Tubulin-Ring Komplexes

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

Der Mathematischen-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Christoph Hanno Peter

aus

Bad Neuenahr-Ahrweiler, Deutschland

Bonn, 2021

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematischen-Naturwissenschaftlichen-Fakultät der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.

1. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Oliver Gruss
2. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Walter Witke

Tag der mündlichen Prüfung: 02.02.2022

Erscheinungsjahr: 2022

Quand tu regarderas le ciel, la nuit, puisque j'habiterai dans l'une d'elles, puisque je rirai dans l'une d'elles, alors ce sera pour toi comme si riaient toutes les étoiles.
Tu auras, toi, des étoiles qui savent rire!

Wenn du in der Nacht den Himmel betrachtest, weil ich auf einem von ihnen wohne, dann wird es für dich so sein, als ob alle Sterne lachten, weil ich auf einem von ihnen lache.

Der kleine Prinz

Antoine de Saint-Exupéry

1 Zusammenfassung:

Mikrotubuli (MT) sind ein wesentlicher Bestandteil des Cytoskelettes und ihre Struktur und Funktion in allen Eukaryoten hoch konserviert. Bei der Zellteilung sind MT essentiell für die Segregation der Chromatiden auf die beiden Tochterzellen. Für die Segregation werden MT von den beiden Polen der Mitosespindel ausgehend polymerisiert. Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt für die Assemblierung von MT ist deren Nukleation. Der MT Nukleationsursprung wird aus der Matrize von 14 γ -Tubulinen mit verschiedenen assoziierenden Proteinen, dem γ -Tubulin Ring Komplex (γ -TuRC), gebildet. Gereinigt aus *Xenopus* Eiextrakt (XEE) zeigt der γ -TuRC in der Kryo-Elektronenmikroskopie die erwartete helikale Struktur einer Matrize, die aber Abweichungen zur modellierten Struktur eines optimalen Nukleators aufweist. Für eine effiziente Nukleation bedarf es einer Konformationsänderung, die wahrscheinlich über einen Aktivator induziert wird. Voraussetzung dafür ist, dass sowohl der γ -TuRC als auch der Aktivator in räumlicher Nähe zueinanderstehen bzw. kolokalisiert sind. Gleichzeitig müssen die beiden Komponenten zusammen eine messbare Erhöhung der Nukleationseffizienz leisten. In der Literatur werden Kandidaten für einen Aktivator bereits teilweise charakterisiert und diskutiert. Um weitere mögliche Kandidaten am γ -TuRC zu detektieren wurden verschiedene Tandem MS/MS durchgeführt.

Nach Auswertung aller Daten wurden in dieser Arbeit vier Kandidaten als mögliche Aktivatoren analysiert. Die zentrosomale Lokalisation der Nukleosid Diphosphat Kinase 7 (Nme7) war bekannt und bringt durch die Kinase bzw. Histidinkinaseaktivität einen möglichen Wirkmechanismus mit. Hier konnte gezeigt werden, dass das Protein als möglicher Aktivator des γ -TuRC in Frage kommt, jedoch in der eigentlichen Funktion zu schwach ist. Das maternal Effekt lethal Protein 28 (MEL-28) ist in der Interphase ein Bestandteil des Kernporenkomplexes (NPC) und bei der Zellteilung an den Kinetochoren lokalisiert. Gleichzeitig sind auch Proteine des NPC an den Spindelpolen lokalisiert. Eine Interaktion mit dem γ -TuRC ist vorstellbar, konnte im Funktionsversuch allerdings nicht hinreichend belegt werden. Erstmals sind die Transportproteine 23 und 24 (Sec23/Sec24) als Bestandteile der COPII Vesikel in der Interphase am γ -TuRC detektiert worden. Es kommt zwar zu einer Veränderung der Aktivität am γ -TuRC, diese ist aber nicht stark genug um ausreichend MT Nukleation für die Aufteilung der Chromatiden zu gewährleisten. Als bester Kandidat wird die Cyclin abhängige Kinase 5 regulatorische Untereinheit assoziierendes Protein 2 (Cdk5rap2) identifiziert. Bei den späteren *ex vivo* und *in vitro* Analysen zeigte sich in Anwesenheit des N-terminalen Endes von Cdk5rap2 eine erhöhte Ausbildung von MT. Das genannte Fragment beinhaltet eine funktionale Domäne, die in direktem Kontakt mit dem γ -TuRC steht. Gibt man in das XEE oder gereinigtes Tubulin ausschließlich die CM1 Domäne, so steigert die Anzahl an MT. Unter dem Einfluss einer mutierten CM1 Domäne reduziert sich die Anzahl der MT-Strukturen. Schlussendlich kann man daher sagen, dass Cdk5rap2 einen direkten Einfluss auf den γ -TuRC hat. Es bleibt die Frage offen, ob weitere Modulatoren die Reaktion sowohl aktiv wie auch passiv beeinflussen können.

2 Summary

Microtubules (MT) are an essential part of the cytoskeleton and their structure and function are highly conserved in all eukaryotes. During cell division, MT are essential for the segregation of the chromatids in the two daughter cells. For segregation, MT are polymerized starting from the two poles of the mitotic spindles. The limiting step in the assembly of MT is its nucleation. The MT origin of nucleation is formed from the template of 14 γ -tubulins with various associating proteins, the γ -tubulin ring complex (γ -TuRC). The γ -TuRC shows the expected helical structure of a template in cryo-electron microscopy when purified from *Xenopus* egg extract (XEE). However, the experimentally determined structure deviates from the modelled structure of an optimal nucleator. For efficient nucleation, a conformational change is required, which is thought to be induced by an activator. The requirement for this change is the close proximity of both the γ -TuRC and the activator or their co-localization. At the same time, the two components together must achieve a measurable increase in nucleation efficiency. In the literature, candidates for such an activator are already partially characterized and discussed. In order to detect further possible candidates at the γ -TuRC, tandem MS/MS was performed.

After evaluating all data, four candidates are analysed as possible activators in this thesis. The centrosomal localization of the nucleoside diphosphate kinase 7 (Nme7) is known and indicates a possible mechanism of action through the kinase and histidine kinase activity. It is shown here that NME7 is a possible activator of the γ -TuRC, but is too weak in its actual function. The maternal effect lethal protein 28 (Mel-28) is a component of the nuclear pore complex (NPC) in the interphase and is localized at the kinetochores during cell division. Proteins of the NPC are also located on the spindle poles simultaneously. An interaction with the γ -TuRC is conceivable, but could not be proven in the functional test. For the first time, the transport proteins 23 and 24 (Sec23/Sec24) were detected as components of the COPII vesicles in the interphase on the γ -TuRC. There is a change in the activity at the γ -TuRC indeed, but this is not strong enough to ensure sufficient MT nucleation for the division of the chromatids. The cyclin-dependent kinase 5 regulatory subunit associating protein 2 (Cdk5rap2) is identified as the best candidate. Later *ex vivo* and *in vitro* analyses show an increased formation of MT in the presence of the N-terminal end of Cdk5rap2. The Cdk5rap2 fragment mentioned above contains a functional domain that is in direct contact with the γ -TuRC. The number of MT increases, if only the CM1 domain is added to the XEE or purified tubulin. The number of MT structures is reduced under the influence of a mutated CM1 domain. Finally, we assumed that Cdk5rap2 has a direct influence on the γ -TuRC. Future experiments are needed to answer the question whether further modulators can influence the reaction both actively or passively.

3 Inhalt

1	Zusammenfassung:.....	3
2	Summary.....	4
4	Abbildungverzeichnis	8
5	Tabellenverzeichnis	9
6	Abkürzungsverzeichnis	10
7	Einleitung.....	15
7.1	Funktionelle MT gelten als Voraussetzung für die genomischen Stabilität	16
7.1.1	Der Nukleationsursprung und die dynamische Instabilität der MT	17
7.1.2	Der γ -TuRC als universeller Nukleator.....	20
7.1.3	Assoziierende Proteine sind der Ausgangspunkt neuer γ -TuRC und gewährleisten dessen Funktion	23
7.2	<i>Xenopus laevis</i> Ei-Extrakt als Modellsystem zur Identifizierung und Untersuchung assoziierender Proteine des γ -TuRC.....	26
7.2.1	Validierung und quantitative Analysen neuer Antikörper mittels Immunfluoreszenz in XL177	30
7.2.2	RanGTP abhängige Mikrotubuliassemblierung	31
7.2.3	Durch MT und assoziierende Proteine bedingte Erkrankungen	32
7.3	Fragestellung	35
8	Ergebnisse.....	36
8.1	Centrin und γ -Tubulin als zentraler Marker des Nukleationsursprung der MT am Zentrosom in der Mitose	36
8.2	Sec23 assoziiert mit γ -Tubulin und ist demzufolge ein möglicher Kandidat der γ -TuRC Aktivierung	39
8.3	Ist Nme7 als zentrosomales Protein verantwortlich für die γ -TuRC Aktivierung und MT Organisation?	44
8.4	Komponenten des NPC lokalisieren in der Mitose an den Spindelpolen.....	49
8.5	CDK5RAP2 als bekanntes assoziierendes Protein direkt am γ -TuRC und möglicher Aktivator der Nukleation.....	54
8.5.1	Synthese rekombinanter Proteine und Antikörper Produktion von Cdk5rap2.....	54
8.5.2	Validierung des <i>X. l.</i> Cdk5rap2 Antikörper durch spezifische Immunfluoreszenzfärbungen	58
8.5.3	Qualitative Analyse des CDK5RAP2 Antikörpers in humanen Zellen	59
8.5.4	Cdk5rap2 zeigt während der Zellteilung starke Veränderungen im Bereich der Zentrosomen	61
8.5.5	Immunfluoreszenzfärbungen identifizieren Cdk5rap2 als potenziellen Aktivator des γ -TuRC	61
8.5.1	Untersuchung des Cdk5rap2 Aktivators in <i>ex vivo</i> (XEE) Experimenten (Strategie 1) ..	63
8.6	Einfluss verschiedener Cdk5rap2 Aktivatorfragmente auf die Nukleation	69

8.6.1	Isolierung des γ -TuRC und zeitabhängige Nukleation durch unterschiedliche Cdk5rap2 Aktivatoren	69
8.6.2	Quantitative Analyse der durch den Cdk5rap2 Aktivator eingeleiteten Nukleation am γ -TuRC	72
9	Diskussion	76
9.1	Die Nukleation am γ -TuRC bedarf eines Aktivators	76
9.2	Assemblierungsfaktoren realisieren die korrekte Zusammensetzung des γ -TuRC	77
9.3	Targeting Faktoren organisieren den zielgerichteten Transport von Proteinen und γ -TuSC	78
9.4	Modulatoren und Aktivatoren interagieren mit dem γ -TuRC	79
9.5	COPII Vesikel Proteine Sec23A & Sec24A assoziieren am γ -TuRC und fungieren als mögliche Aktivatoren	81
9.6	NPC Mel-28 als unkonventionelles Protein in Assoziation mit dem γ -TuRC	82
9.7	NME7, ein Hotspot Kandidat als Aktivator des γ -TuRC	84
9.8	CDK5RAP2 als potentieller Aktivator des γ -TuRC	87
9.9	Bekannte und alternative Interaktionspartner von MT und des γ -TuRC	91
9.10	Fazit	93
10	Methoden	94
10.1	Haltung <i>Xenopus laevis</i>	94
10.2	Präparation <i>Xenopus</i> -Ei-Extrakt (XEE)	94
10.3	Funktionstest <i>Xenopus</i> -Ei-Extrakt	95
10.4	Markiertes Cy3-Tubulin	96
10.5	Analyse von Proteinfragmenten im XEE	97
10.6	Saccharose Gradient	97
10.7	Klonierung verschiedener Cdk5rap2 Fragmente in pGEX-6P1	98
10.8	Transformation freier DNA in Bakterien	99
10.8.1	Plasmidpräparation	99
10.9	Proteinexpression und Reinigung	100
10.9.1	Proteinexpression	100
10.9.2	Proteinreinigung	100
10.9.3	Bestimmung der Proteinkonzentration	101
10.10	Antikörpergewinnung	101
10.10.1	Aufreinigung von Antikörpern mittels Affinitätschromatographie	101
10.11	Immunpräzipitation	102
10.11.1	Injektion von Beads in das XEE	104
10.12	Vernetzung von IgGs	104
10.13	Reinigung von Gamma-Tubulin-Ring-Komplexe	104
10.14	<i>In Vitro</i> MT Funktionsversuch	106

10.15	Immunfluoreszenz.....	107
10.15.1	Zellimmunfluoreszenz	107
10.15.2	Zelllysate.....	107
10.16	Polyacrylamid-Gelelektrophorese	108
10.17	Coomassie Färbung	109
10.18	Silberfärbung	109
10.19	Western Blot.....	109
11	Materialien	111
11.1	Chemikalien/Reagenzien.....	111
11.2	Proteine	114
11.3	Verbrauchsmaterialien	114
11.4	Labor Kits	115
11.5	Geräte.....	116
11.6	Bakterien, Zellen und Versuchstiere	119
11.7	Antikörper	119
11.8	Vektoren, Oligonukleotide, und Enzyme.....	120
11.9	Puffer, Lösungen und Medien	122
11.10	Programme	129
11.11	Externe Firmen	130
12	Literaturverzeichnis	131
13	Anhang.....	138
13.1	Marker	138
13.2	Proteinkonzentrationen	138
13.3	Polymerase Kettenreaktion.....	139
13.4	Mess- und Analyseergebnisse	141
14	Danksagung	149

4 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Aufbau des γ -TuRC und dessen Regung.....	22
Abbildung 2: Schematische Darstellung der Experimente zur Identifikation eines möglichen Aktivators des γ -TuRC.....	30
Abbildung 3: Lokalisation des Nukleationsursprung durch Centrin und quantitative Bestimmung des Signals.....	37
Abbildung 4: Sec23/Sec24 und γ -Tubulin Depletion aus XEE.....	40
Abbildung 5: Sec23 und γ -Tubulin in Kolokalisation, Lokalisierung und Quantitative Bestimmung	43
Abbildung 6: Expression, Konzentrationsbestimmung und Depletionskontrolle des selbst synthetisierten Nme7 Proteins und späteren Antikörpers	45
Abbildung 7: Immunfluoreszenz und quantitative Auswertung von NME7 und γ -Tub	47
Abbildung 8: Funktionstest Δ Nme7/ Δ IgG in XEE.....	48
Abbildung 9: Antigenexpression, Konzentrationsbestimmung, Antikörperreinigung und Depletionstest in XEE von Mel-28	50
Abbildung 10: Immunfluoreszenz und quantitative Auswertung von γ -Tub und Mel-28 über die Mitose.....	52
Abbildung 11: Funktionstest in Mel-28 Immundepletierten XEE.....	53
Abbildung 12: schematische Darstellung der rekombinante Proteinfragmente +/- Mutationen von CDK5RAP2 aus H. s. und X. l.	55
Abbildung 13 Antikörpersequenz, Proteinexpression und Antikörpertest im WB von Cdk5rap2.....	57
Abbildung 14: Validierung des neuen Cdk5rap2-Antikörper in der Immunfluoreszenzfärbung	58
Abbildung 15: Lokalisierung von CDK5RAP2 mit dem X. l. spezifischen Cdk5rap2 Antikörper in unterschiedlichen Phasen der IMR-Zellen.....	60
Abbildung 16: Quantifizierung und Identifikation von Cdk5rap2 als Aktivator in den Zellzyklusphasen	62
Abbildung 17: Funktionstest in γ -Tubulin immundepletion XEE.....	66
Abbildung 18: Gesteigerte Aktivierung des XEE durch verschieden Cdk5rap2 Aktivatorfragmente	68
Abbildung 19 Reinigung des γ -TuRC und Nukleationsfunktionsversuch.....	71
Abbildung 20: In vitro MT Nukleationsversuch mit unterschiedlichen CDK5RAP2 Fragmenten als Aktivatoren des γ -TuRC	75
Abbildung 21 Aktivierung des γ -TuRC durch CDK5RAP2 und einen weiteren unbekanntem Modulator	90
Abbildung 22: NEB Protein Marker	138
Abbildung 23: Graphische Darstellung der aus Abbildung 20 ermittelten Daten.....	142

5 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Massenspektrometrische Analyse der assoziierten Proteine der γ -Tubulin Präzipitation...	25
Tabelle 2: Tandem MS/MS Analyse der assoziierten Proteine einer Sec24A Präzipitation.....	41
Tabelle 3: Biochemische Analyse NME7 assoziierender Proteine	46
Tabelle 4: Probenvorbereitung SDS-Page Immunpräzipitation	103
Tabelle 5: Zusammensetzung von Sammel- und Trenngel	108
Tabelle 6: Proteinkonzentration durch BSA-Vergleich.....	138
Tabelle 7: Komponenten und Ablauf der Polymerase Kettenreaktion (PCR)	139
Tabelle 8: Übersicht der Quantitativen Auswertungen von Sec23, NME7, Mel-28 und CDK5RAP2 ..	141
Tabelle 9: Tandem MS/MS Daten der Immunpräzipitation mit γ -Tubulin Antikörper (niedrige Salzkonzentration).....	143
Tabelle 10: Tandem MS/MS Daten der Immunpräzipitation mit γ -Tubulin Antikörper (hohe Salzkonzentration).....	145
Tabelle 11: Tandem MS/MS Daten der Immunpräzipitation mit NME7 Antikörper	146
Tabelle 12: Tandem MS/MS Daten der Immunpräzipitation mit SEC24A Antikörper	147
Tabelle 13: Froschfutter Aquatic 3 Elementenanalyse	148

6 Abkürzungsverzeichnis

μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
A	Ampere
AcOH/CH ₃ COOH	Essigsäure
AG	Arbeitsgruppe
AgNO ₃	Silbernitrat
APS	Adenosinphosphosulfat
BSA	Bovines Serumalbumin
C	Celsius
CaCl ₂	Calciumchlorid
CDK5RAP2	Cyclin abhängige Kinase 5 regulatorische Untereinheit assoziiierendes Protein 2
CEP	Zentrosomale Proteine
CSF/CSF-XB	Zytostatisch Faktor Extrakt Puffer
Cy3	Cyanin-Farbstoff 3
Da	Dalton
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
ddH ₂ O	Doppelt Deionisiertes Wasser
dH ₂ O/VE-H ₂ O	Deionisiertes Wasser/vollentsalztes Wasser
DMP	Dimethyl pimelimidate
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS/DNA	Desoxyribonukleinsäure(n)/deoxyribonucleic acid(s)
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate (Nukleotide)
DTT	Dithiothreitol

<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
ER	endoplasmatischen Retikulum
EtOH	Ethanol
FCS	Fetales Kälberserum
FtsZ	Filamenting temperature-sensitive mutant Z
gammaTuRC; γ -TuRC	Gamma-Tubulin-Ring-Complex
GCP	Gamma Tubulin Komplex Protein
GMPCPP	Guanosine-5'-(α,β)-methylenotriphosphat
GST	Glutathion-S-Transferase
GTP	Guanosintriphosphat
<i>H. s.</i>	<i>Homo sapiens</i> , human
H ₂ O	Wasser
HCl	Salzsäure
HCOH	Formaldehyd
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HPK	Histidinproteinkinase
I. E.	Internationale Einheiten
IgG	Immunglobulin G
IMR	Neuroblastom Zelllinie
IP	Immunpräzipitation
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid

k	Kilo
KATNA	Katanin
KCl	Kaliumchlorid
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
KIP	Ko-Immunpräzipitation
KOH	Kaliumhydroxid
LB	Lysogeny broth
LB ⁰	LB-Medium ohne den Zusatz von Antibiotikum
MAPs	Mikrotubuli assoziierte Proteine
Mel-28	Maternal effect lethal protein 28
MetOH	Methanol
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minuten
ml	Milliliter
MreB	Zellformbestimmendes Protein MreB
ms	Maus (mouse)
MTOC	Mikrotubuli-organisierende Zentrum
MW	Molekülmasse/Molekulargewicht
Mzt1	Mozart 1
Na ₂ CO ₃	Natriumkarbonat
Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O	Dinatriumphosphat Dihydrat
Na ₂ S ₂ O ₃	Natriumthiosulfat
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid

NEDD1	Neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 1
ng	Nanogramm
NLS	Nuclear Localization Signal
nm	Nanometer
NME7	Nukleosid Diphosphat Kinase 7
NPC	Zell- Kernpore(n) (nuclear pore complex)
Nup (107)	Nuklear Kernkomplex Protein (107)
OD	Optische Dichte
ParM	Plasmid-Segregationsprotein
PCM	Pericentriolar material
PCR	Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction)
PIPES	Piperazine-N,N'-bis(2-Ethansulfonsäure)
pr.	primär
Ran	Ras- related nuclear protein
rb	Kaninchen (rabbit)
RCC1	Regulator der Chromosomenkondensation 1
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumlaurylsulfat
SEC23A	Transport Protein 23A
SEC23B	Transport Protein 23B
sek.	Sekundär
SPB	Spindel-Pol-Körpern

SPC110	Spindle pole body component 110
TLA	Rotor für Tischzentrifugen der L-Serie mit feststehendem Winkel
TPX2	Targeting-Protein für Xklp2
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TUBG	Tubulin gamma chain
TUBGCP	Tubulin Gamma Complex Associated Protein
TUBZ	Tubulin-ähnliches Protein Z
u.v.m.	und vieles mehr
üN	über Nacht
vgl.	vergleiche/vergleichend
XEE	<i>Xenopus</i> -Ei-Extrakt
<i>XL/X. l.</i>	<i>Xenopus laevis</i>
XMAP215	Cytoskelett-assoziierte Protein 5-A
γ -TuCR	Gamma-Tubulin Komplex Rezeptor
γ -TuNA	γ -Tubulin Nukleations Aktivator
γ -TuSC	Gamma-Tubulin Small Komplexe
Δ	Depletion

7 Einleitung

Präambel

Die Aufrechterhaltung der genomischen Stabilität ist die Grundvoraussetzung für die Entwicklung und Vitalität aller Individuen und die wesentliche Funktion der Zellteilung. Ein komplexer Mechanismus in der Zelle steuert die Weitergabe der gesamten genomischen Information an die beiden Tochterzellen. Genomische Variabilität oder Variation ist der erste Schritt zur Evolution. Für die Zellteilung sind dynamische Elemente des Cytoskelettes essentiell. Für die korrekte Verteilung des Erbgutes (Mitose) sind Mikrotubuli (MT) verantwortlich für die eigentliche Trennung der Zelle das Aktin-Cytoskelett. Fehlfunktionen des Cytoskelettes können Auswirkungen auf die genomische Stabilität haben und somit einen pathologischen Phänotyp herbeiführen.

Der Nukleationsursprung von MT ist in der Mitose in den Polen der bipolaren Spindel gebündelt. Der universelle Nukleator von MT ist der Gamma-Tubulin Ring Komplex (γ -TuRC). Der γ -TuRC setzt sich aus 14 γ -Tubulin Untereinheiten zusammen und assoziiert mit weiteren Proteinen zu einen 2,2 MDa großen Komplex. Seit kurzem geht die Wissenschaft davon aus, dass für die Nukleation eine Konformationsänderung des Nukleators notwendig ist, die möglicherweise über einen zusätzlichen Aktivator vermittelt wird. Nur durch diese Aktivierung bietet die γ -TuRC Matrize die geeignete Plattform für die wachsenden MT. Die Assemblierung von MT gehört zu den wichtigsten Vorgängen bei der Segregation des Erbgutes. Folglich muss die Entstehung wie auch der Abbau der MT streng reglementiert werden.

In dieser Arbeit liegt der Fokus auf dem Aktivierungsmechanismus am Nukleator des γ -TuRC. Um den Aktivator am γ -TuRC genauer zu untersuchen werden biochemische und funktionelle Experimente in intakten Zellen, im zellfreien System und mit gereinigtem Tubulin durchgeführt.

7.1 Funktionelle MT gelten als Voraussetzung für die genomischen Stabilität

Die genomische Stabilität ist die Voraussetzung für das Leben. Dabei besitzt jede Zelle des Organismus dieselbe DNA, die bei der Zellteilung von der Mutterzelle an die beiden Tochterzellen weitergegeben wird. Dazu muss zunächst das Zentrosom als Ursprungsort der MT, sowie die DNA dupliziert werden (T. Kufer 2004). Das Zentrosom besteht aus Zentriolen, die aus neun Mikrotubulitriplets bestehen, die radial angeordnet und von Pericentriolärem Material (PCM) umgeben sind (Alberts, et al. 2015). In der Interphase bilden die Zentrosomen den Ursprung der monopolen MT Anordnung. Für die Bipolarität der mitotischen MT-Anordnung (Spindel) in eukaryotischen Zellen ist die Verdopplung des Zentrosoms unerlässlich. Im späteren Verlauf sind dann die bipolaren Spindeln verantwortlich für die gleichmäßige Chromosomensegregation.

Für die gleichmäßige Verteilung des genomischen Materials kondensieren die Chromosomen. Ein Chromosom besteht aus zwei Schwester-Chromatiden, die im zentralen Bereich am Centromer über Kohesin-Komplexe zusammengehalten werden. Gleichzeitig wandern die Zentrosomen zu den Zellpolen (Prophase). Die Zentrosomen beinhalten MT-organisierende Zentren (MTOC), welche den Ankerpunkt und den Nukleationsursprung der MT bilden. Den Nukleationsursprung der polymerisierenden MT bildet der γ -TuRC. Nachdem die zu Beginn der Mitose noch bestehende Kernhülle zerfallen ist, bilden die MT beidseitig eine stabile Verbindung zwischen den bipolaren Spindeln und den Kinetochoren der Chromosomen, auch Kinetochore MT (K-Fibers) genannt. Die Assemblierung des Spindelapparates und der K-Fibers ist die Voraussetzung für die korrekte Ausrichtung und Anordnung der Chromosomen (Prometaphase). Sobald alle Chromosomen richtig in der Äquatorialebene angeordnet sind, ist die Zelle bereit für die Aufteilung des genomischen Materials (Metaphase).

Der Spindelapparat verkürzt dann durch Depolymerisation seine K-Fibres. Dies ist die treibende Kraft damit die Schwesterchromatiden in Richtung des Nukleationsursprung zu den Spindelpolen gezogen werden (Anaphase). Das Ziel ist eine Verteilung des Erbgutes in zwei identischen Hälften zu beiden MT Ursprungsorten. Es bildet sich eine neue Kernhülle und die Schwesterchromatiden decondensieren (Telophase). Erst nach der Verteilung des genomischen Materials trennt sich das Zytoplasma in der Zytokinese. Aktinfilamente bilden einen Ring, der im Anschluss an die Telophase das Zellplasma in zwei Tochterzellen aufteilt. Die Zellmembran wird durch Aktin/Myosin nach innen gezogen, bis die Zellmembranen fusionieren und zwei physikalische Einheiten entstehen (Alberts, et al. 2015; Campbell und Reece 2011). Folglich spielen sowohl Aktin, als auch MT in der Mitose eine wesentliche Rolle bei der Segregation des genomischen Materials und der Zellteilung.

7.1.1 Der Nukleationsursprung und die dynamische Instabilität der MT

Zwischen den Phasen der eigentlichen Zellteilung (Interphase) sind MT für die mechanische Stabilität der Zelle und den Transport von Vesikeln zuständig.

Im polymerisierten Zustand bilden MT einen röhrenförmigen Hohlzylinder. Der äußere Durchmesser des Zylinders beträgt dabei 25 nm. Die Einheit des Hohlzylinders werden aus repetitiven α - und β -Tubulin Dimeren gebildet, die im Schwanz-Kopf Mechanismus eingebaut werden. Dabei sitzt das α -Tubulin des Dimers immer unten, in Richtung Nukleationsursprung und das β -Tubulin immer oben, in Richtung des Wachstums. In den MT ist somit die Orientierung der Dimere und die damit verbundenen unterschiedlichen strukturellen Enden gegeben, es bildet sich eine Asymmetrie aus. Das Wachstum der asymmetrischen MT, beginnend vom Minus-Ende, geht zunächst von einer gemeinsamen Organisationsplattform räumlich nah den Zentriolen aus. Der Aufbau der MT orientiert sich in Kooperation mit Motorproteinen der Transport von Vesikeln, Granula und Zellbestandteilen. Motorproteine transportieren unter Energieverbrauch Cargo entlang der MT. Dyneine transportieren ihre Fracht in Richtung des Nukleationsursprungs, während die meisten Kinesine sich in Richtung der wachsenden MT bewegen. Eine weitere Funktion übernehmen die Zentriolen im Rahmen der Zilien. Bei Zilien werden die Zentriolen umgewidmet. Aus ihrer ursprünglichen Aufgabe im Zellzyklus werden die Zentriolen heraus umfunktioniert und dienen als Basalkörper der Zilien. Ausgehend von den Basalkörpern kommt es zur Nukleation und Assemblierung von MT-Duplets. Diese bilden den Fortsatz der Zilie (Alberts, et al. 2015).

Zentrosomen sind Organellen, die jedoch keine Kompartimentierung über eine Membran besitzen. Die Zentrosomen sind umgeben von einer hoch strukturellen, organisierten Masse von Proteinen, die sogenannte perizentriolären Matrix/Material (PCM) (Pihan 2013). Bestandteile der PCM sind unter anderem: Pericentrin, verschiedene zentrosomale Proteine (CEP), Cyclin abhängige Kinase 5 regulatorische Untereinheit assoziierendes Protein 2 (CDK5RAP2), neuronale Vorläuferzelle exprimiert entwicklungsbedingt herunterreguliertes Protein 1 (NEDD1) und γ -Tubulin. Anhand der beispielhaften Aufzählung wird klar, dass die Nukleationsfunktion eine ganz wichtige lokale Aufgabe des PCM ist. Die γ -Tubuline können zu einer Ringstruktur angeordnet sein, dem γ -Tubulin-Ring-Komplex (γ -TuRC). Der γ -TuRC ist der universelle Nukleationsursprung/Matrize jedes wachsenden MT. Durch den Nukleator wird die Reaktionsbarriere zur Ausbildung von MT gesenkt, sodass die Nukleation der MT unterstützt wird. Entsprechend liegt die Aktivierungsenergie ohne Nukleationsursprung zur Ausbildung von MT höher. Die Polymerisation der MT startet am Nukleationsursprung, mit α -Tubulin. Strukturell ergeben sich somit zwei asymmetrischen Enden mit unterschiedlicher Dynamik im Wachstum. Die MT polymerisieren vom Minus-Ende mit einer geringen Dynamik, im Gegensatz zum Plus-Ende mit einer hohen Dynamik. Bei wachsenden MT beobachtet man am Polymerisationsende eine GTP-Kappe aus den bindenden Tubulin der β -Untereinheit, dessen GTP in der Assemblierung nicht schnell genug

hydrolysieren kann. Die darunterliegenden β -Tubulin Untereinheiten hydrolysieren zu gebundenen Nukleotid GDP. Die Ausbildung der MT besteht so lang wie die Bindung schneller verläuft als die Hydrolyse des GTP in β -Tubulin zu GDP. Bindet kein neues Tubulin-GTP, ist die Wahrscheinlichkeit der Hydrolyse der GTP-Kappe und somit der Depolymerisation höher. Diese Reaktion ist abhängig von der Verfügbarkeit von freiem Tubulin, sowie der Geschwindigkeit, in der die GTP-Tubuline an das Plus-Ende gebunden werden. Dabei unterscheidet sich die Tubulin GTP-Konformation von der GDP-Konformation. Die GTP-Konformation ist eine glatte, elongierte Konformation die nicht unter Spannung steht und optimal ins Polymer passt. Bei der Hydrolysierung von GTP zu GDP kommt es zu einer Konformationsänderung die eine Spannung im Polymer verursacht.

Im polymerisierten Zustand ist das β -GDP-Tubulin in den Hohlzylinder hineingezwängt. Bildet sich an der GTP-Kappe β -GDP-Tubulin, so beginnt die Springbrunnen ähnliche Depolymerisation, auch als Katastrophe bezeichnet. Eine Depolymerisation verkürzt die MT dabei also immer beginnend vom Plus-Ende. Dabei werden die α - und β -Tubulin Dimere freigesetzt. Ein Stopp der Depolymerisation setzt erst ein, wenn erneut ein GTP-Tubulin an die MT bindet (Äquilibrium **Abbildung 1 a**) (Honore, Pasquier und Braguer 2005; Alberts, et al. 2015; Campbell und Reece 2011).

Bei der Untersuchung der Nukleationsaktivität ist zu beachten, dass eine Differenzierung zwischen einer gesteigerten Aktivität des Nukleator und einer gesteigerten Stabilisierung der MT schwer zu unterscheiden ist. So ist das Cytoskelett-assoziierte Protein 5-A (XMAP215) z.B. für die Stabilität der MT verantwortlich und das Targeting Protein für Xklp2 (TPX2) für eine reduzierte Depolymerisation (Neumayer, et al. 2014; Consolati, et al. 2020). Werden die beiden Proteine in MT Polymerisationsversuchen mit der Absicht einer möglichen Aktivatoraktivität untersucht, so zeigen sich vermutlich zum einen stabilisierte MT und zum anderen auf Grund der reduzierten Depolymerisation mehr Strukturen als im Vergleich zur Kontrolle. Mögliche Rückschlüsse auf die Aktivatoreigenschaft am γ -TuRC sind in diesem Fall schwierig zu bewerten. Die Stabilisierungseigenschaft der MT muss daher bei jedem untersuchten Protein mitberücksichtigt werden.

7.1.1.1 Aktin und Intermediärfilamente

Wie bereits beschrieben ist eine wesentliche Funktion des Cytoskelett in der Mitose die korrekte Verteilung des genomischen Materials auf die beiden Tochterzellen sowie die Teilung des Zellplasmas in zwei Tochterzellen durch Abschnüren der Zellmembran (Alberts, et al. 2015; Campbell und Reece 2011, Fletcher und Mullins 2010). Je nach Funktions- und Aufgabenbereich der Zelle ist das Cytoskelett in weitere Prozessen involviert. Weitere Funktion des Cytoskelettes sind die mechanische Stabilität in der Interphase, die Zellbewegung und der Transport, sowie je nach Zelltyp spezialisierte Aufgaben (Alberts, et al. 2015). So hat der Mensch homologe Varianten des Aktinproteins, die auf Grund der spezialisierten Aufgaben unterschiedlich lokalisiert und angeordnet sind. Neben der Stabilisierung der

Zelle und dem Transport von Vesikeln über kurze Distanzen ist Aktin mit verantwortlich für das Koordinieren membranständiger Proteine (Fletcher und Mullins 2010; Alberts, et al. 2015). Aktinfilamente zeigen genau wie MT einen dynamischen Prozess aus Auf- und Abbau. Das F-Aktinfilament setzt sich aus zwei Protofilamenten zusammen, die aus einzelnen G-Aktin-Monomeren aufgebaut sind. Im Gegensatz zu MT können die Aktinfilamente keine Zylinderhohlkörper bilden, sondern sind ineinander helixförmig verdreht. Der Durchmesser beträgt in dieser Struktur 8 nm. Aktin nukleiert im definierten Winkel von 70° am Arp2/3 Komplex an bereits vorhandenen Filamenten neu und bildet so Verzweigungen. Eine ähnliche Querausbildung ist bei MT bekannt. Hier ist der strukturell komplexere und universelle γ -TuRC unter der Beteiligung weiterer Faktoren der zentrale Nukleator an den bereits existierenden MT (Alberts, et al. 2015).

Der dritte Hauptbestandteil des Cytoskelettes, die stark mechanisch belastbaren Intermediärfilamente, dienen der Stabilität der Zelle. So ist der Zellkern von innen mit der Zellkernlamina aus Intermediärfilamenten ausgekleidet. Eine andere Kategorie an Intermediärfilamenten ist für die Vernetzungen im Cytoplasma verantwortlich, wiederum andere bilden Zellkontakte aus. Die individuelle Funktion ist auf Proteinebene unterschiedlich. So ist zum Beispiel Desmin für die strukturelle Organisation der Zelle verantwortlich und Synemin für die strukturelle Integrität. (Michalczyk und Ziman 2005; Paulin und Li 2004). Der Durchmesser eines Intermediärfilaments ist in etwa 10 nm.

Zusammenfassend kann daher gesagt werden, dass die Komponenten des Cytoskelettes je nach Zellzyklusphase, Lokalisation und Funktion einer gewissen Aufgabendynamik folgen.

Auch andere Organismen weisen Komponenten des Cytoskelettes auf, die jedoch andere Aufgaben erfüllen. Durch die in der Pflanzenzelle vorhandene Zellwand ist die Morphologie starr und vorgegeben. Die mechanischen Anforderungen des Cytoskelettes wie in tierischen Zellen ist hier nicht gegeben. So ist hier das Cytoskelett nicht für die Zellmorphologie und das Verhalten der Plasmamembran verantwortlich. Pflanzenzellen weisen das Cytoskelett in einer ähnlichen Form, aber mit anderer Anforderung auf, so gibt es bestimmte Funktionsbereiche die vergleichbar sind.

Aktinfilamente sind in erster Linie für die intrazelluläre Organisation sowie den Membrantransport verantwortlich, während Tubulin sich vom Nucleus aus im Cytoplasma verteilt (Kost und Chua 2002). Die Segregation des genomischen Materials wird auch in Pflanzenzellen über die MT durchgeführt. Dies verdeutlicht die konservierte Funktion der MT über verschiedene Spezies hinweg. In Zahlen ist die Sequenzidentität auf Aminosäurebasis der Tubuline über Pflanzen, Tiere und Pilze mit bis zu 90-95 % konserviert (Sahu, et al. 2014). Die hohe Konservierung deutet auf eine hohe Funktionsübereinstimmung der Proteine hin.

Auch in Prokaryonten ist man der Meinung, dass es Elemente des dynamische Cytoskelettes gibt. So gilt das Filamenting temperature-sensitive mutant Z (FtsZ) und andere Zellteilungsproteine mit einer Aminosäuresequenzübereinstimmung von 40 % als homolog zum eukaryotischen Tubulin (Pereira 2015). Übereinstimmend mit den eukaryotischen MT ist die Polymerisierung bei FtsZ GTP abhängig. Der durch die FtsZ Filamente gebildet Z-Ring bildet bei Bakterien den Ort der Teilung, FtsZ ist nicht direkt an der Plasmid Aufteilung beteiligt (Gasper und Löwe 2011).

Analoge Eigenschaften und Funktionen vom Aktin hat das MreB (MreB-Filamente). Dabei ist das MreB Protofilament nahezu identisch mit dem polymerisierenden Aktinfilament. Das Zellformbestimmende Protein MreB kleidet die Membraninnenseite aus und ist verantwortlich für die Zellgestalt. (Gasper und Löwe 2011). Die Funktionen der einzelnen Bestandteile Cytoskelettes in Prokaryonten unterscheiden sich somit von denen der Eukaryoten.

7.1.2 Der γ -TuRC als universeller Nukleator

Bestreben des universellen und konservierten MT-Nukleator ist es, die geringe Wahrscheinlichkeit der Assemblierung der einzelnen α/β -Tubulin-Dimere zu MT in Richtung einer gezielten, kontrollierbaren und funktionierenden Reaktion zu lenken. Ohne den Nukleator geht die Wahrscheinlichkeit der Ausbildung von MT gegen null und ist somit kinetisch inhibiert. Daher ergibt sich die Frage, wie ein solcher Katalysator aussehen könnte? Der universelle Nukleationsursprung der MT ist die helikale Ringstruktur des γ -TuRC. Dieser besteht aus 14 spiralförmig angeordneten γ -Tubulinen die die fast perfekte Grundlage für weitere Tubuline bilden (Liu, et al. 2019). Jedes γ -Tubulin ist mit einem γ Tubulin Komplex Protein (GCP) verbunden. Die Interaktionen der GCPs werden über sogenannte GRIP Domänen (GRIP1 und GRIP2) ermöglicht. Während GRIP1 für die lateralen Kontakte der GCPs verantwortlich ist, bildet die GRIP2 Domäne die Bindung mit dem γ -Tubulin aus (Farache, et al. 2018). Kommt es zur Assemblierung der GCPs bilden diese zusammen mit γ -Tubulin eine trichterförmige Grundstruktur. Zentral in der Struktur befindet sich in einzelnes Aktinprotein, dass direkt mit einem GCP3 und GCP6 interagiert. Zusammen wird dieser Komplex als Gamma-Tubulin Ring Komplex (γ -TuRC) bezeichnet und ist 2,2 MDa groß (**Abbildung 1 b**) (Liu, et al. 2019; Consolati, et al. 2020).

In *Saccharomyces cerevisiae* konnte gezeigt werden, dass es durch die Bindung des N-terminalen Endes der Spindle pole body component 110 (Spc110) an die Teilstruktur bzw. Substruktur, den γ -Tubulin Small Komplex (γ -TuSC), zur Assemblierung des Gamma-Tubulin Komplex Rezeptor an den Spindel-Pol-Körpern (SPB) kommt (Lin, Neuner und Flemming, et al. 2016; Lyon, et al. 2016). Vergleichend mit den Zentrosomen MTOC in Säugetieren bilden die SPB das Organisationszentrum der Mikrotubuli in Hefen. Ein wesentlicher Unterschied ist, dass das SPB keine Zentriole besitzt (Schiebel und Pereira 2001). Durch die Bindung von Spc110 erfolgt eine Rekrutierung der einzelnen γ -Tubulin Komplex Rezeptoren

zu den SPB (analog MTOC in Säugetieren). Hier erfolgt die Oligomerisierung mehrerer γ -TuSCs sowie die Assoziierung weiterer Untereinheiten (Lin, Neuner und Flemming, et al. 2016).

Aktuelle Forschungen haben die dreidimensionale Anordnung des γ -TuRC identifiziert und gelöst. Allerdings weicht die Struktur vom reinen Modell einer optimalen Matrize des γ -TuRC aufgrund der bekannten α -Tubulin Enden der MT ab (**Abbildung 1 c**) (Liu, et al. 2019; Wieczorek, et al. 2019). Die größten Unterschiede kommen am Ende der spiralförmigen Struktur vor (**Abbildung 1 c**). Es muss also einen Aktivator geben, der eine Strukturänderung des γ -TuRC in einen aktiven Zustand ermöglicht und dadurch den Nukleator aktiviert (Liu, et al. 2019; Wieczorek, et al. 2019). Die grundsätzliche Auswirkung eines aktiven Nukleators in Abhängigkeit von der Zeit auf die Tubulinpolymerisation zeigt die **Abbildung 1 a**. In Anwesenheit eines aktiven Nukleators wird nach Erreichen der Aktivierungsenergie (Tubulin ca. 18 °C) direkt die Polymerisation gestartet und es folgt die logarithmische Phase (blaue Kurve). Ohne aktiven Nukleator entsteht zunächst eine lag-Phase, aus der nach einiger Zeit die Polymerisation startet (rote Kurve) (Roostalu und Surrey 2017). Die daraus resultierende zeitliche Differenz beider Kurven wird als katalytische-Effizienz bezeichnet. Bei beiden Bedingungen stellt sich nach einiger Zeit ein Gleichgewicht (Äquilibrium) zwischen polymerisierenden und depolymerisierenden MT ein. Das bedeutet jedoch auch gleichzeitig, dass in der stationären Phase immer noch ein Anteil von α - und β -Dimeren vorhanden sein muss.

Neben der strukturellen Analyse (Liu, et al. 2019) des γ -TuRC wird die These eines Aktivators durch die zellphysiologischen Funktionen und Prozesse unterstützt. In der Mitose werden wesentlich mehr MT für die perfekte Segregation des Erbgutes auf beide Tochterzellen benötigt. Eine effiziente Ausbildung der MT und somit auch der jeweiligen Mikrotubuliursprungsorte ist ein essentieller Bestandteil für eine gesteigerte MT Anzahl. Die Frage stellt sich, welche Kandidaten als Aktivatoren des Nukleators in Frage kommen und wie dieser mechanistisch funktionieren könnte. Als Voraussetzung muss ein möglicher Aktivator mindestens drei zu testende Eigenschaften mitbringen und am besten auch erfüllen. Als erstes muss die Lokalisation mit der von γ TuRC zumindest partiell übereinstimmen, d.h. zum Zeitpunkt der Aktivierung muss dieser in unmittelbarer Umgebung des γ -TuRC sein. Zusätzlich zu der Aktivatorfunktion muss die Rolle eines möglichen Modulators berücksichtigt werden. Ferner soll die Biochemie in einem Aktivitätstest (Assay) messbar sein. Die biomolekularen Mechanismen müssen übereinstimmen, und in Analysen verifiziert werden können. Eine Aktivierung des γ -TuRC, Erhöhung der Aktivität, kann so rückschließend Aufschluss über den Aktivator geben.

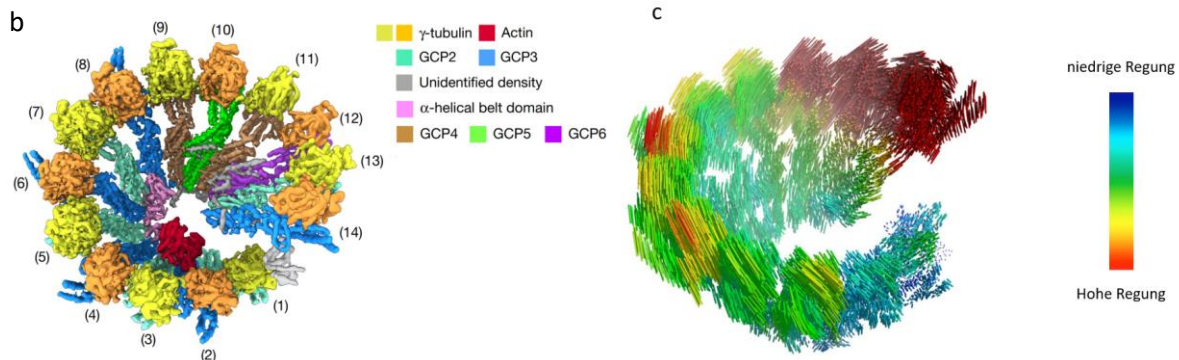
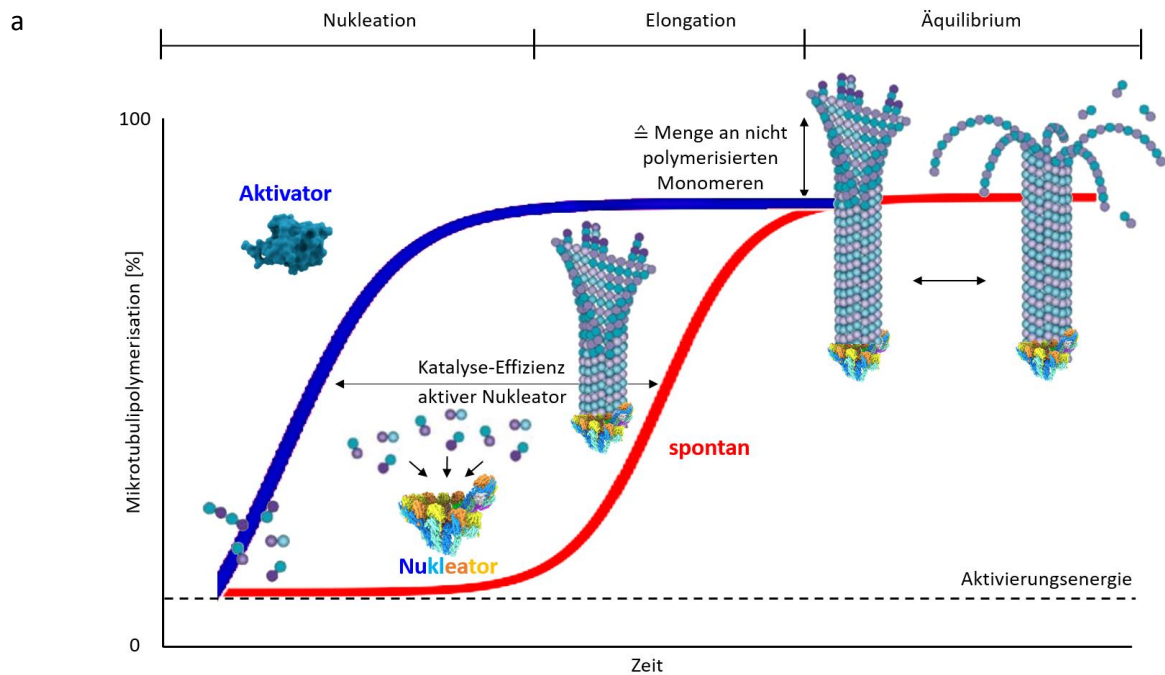


Abbildung 1: Aufbau des γ -TuRC und dessen Regung

a Mikrotubulipolymerisation in Abhängigkeit der Zeit mit (blau) und ohne einen möglichen Nukleator (rot) **b** Gezeigt ist der symmetrische γ -TuRC mit seinen einzelnen Proteinuntereinheiten. Hauptstruktur bilden die GCPs die an ihrem C-terminalen Ende jeweils ein γ -Tubulin tragen (Liu, et al. 2019) **c** Strukturelle Abweichung des Nukleator (γ -TuRC) mit hoher und niedriger Aktivität. (Liu, et al. 2019); (veränderte Abbildung (Liu, et al. 2019; Alberts, et al. 2015; Conde und Caceres 2009; Roostalu und Surrey 2017))

Eine mögliche Aktivierung könnte sich aus der Bindung der α - und β -Untereinheiten ergeben. Bereits die Bindung der ersten Untereinheiten könnte eine Konformationsänderung auslösen und so die perfekte γ -TuRC Matrize für die weitere Polymerisierung bilden. Jedoch ist unter permanenter Präsenz von α - und β -GTP-Dimeren in MT reduzierter Umgebung keine gesteigerten MT Assemblierung zu beobachten. Erst aufgrund eines zusätzlichen Aktivators kann die katalytische Effizienz gesteigert werden (**Abbildung 1**). Aus diesem Grund wird die Rolle eines zusätzlichen Aktivators in Betracht gezogen, der mit dem γ -TuRC interagiert und im gereinigten Komplex nicht in ausreichender Menge vorhanden ist. In den Fokus als Aktivatoren geraten somit auch in der Tandem MS/MS identifizierte,

assoziiierende Proteine des γ -TuRC oder in der PCM lokalisierte Proteine mit passenden Domänen zum γ -TuRC wie CDK5RAP2. Im Humanen System ist das CDK5RAP2 auf dem Chromosom 9q33.2 lokalisiert, im Xenopus System auf dem Chromosom 8 (Graser, Stierhof und Nigg 2007). CDK5RAP2 ist ein Protein, dessen direkten Interaktionen zum γ -TuRC über die CM1 Domäne bekannt ist. Es konnte gezeigt werden, dass die CM1 Domäne im CDK5RAP2 in Kooperation mit anderen Proteinen für die Rekrutierung von γ -Tubulin zum Zentrosom verantwortlich ist. Die CM1 Domäne ist eine konservierte Domäne die ca. 60 Aminosäuren lang ist und mit Bestandteilen und assoziierenden Proteinen des γ -TuRC interagiert sowie für die Rekrutierung von Proteinen zum γ -TuRC verantwortlich ist (Farache, et al. 2018). Einzelne Bereiche der Konsensussequenz zeigen N-terminal konservierte Sequenzen aus 3-4 Aminosäuren (Lin, et al. 2014). In der Mitose ist die CM1 Stelle essentiell für die Zentrosomale Lokalisation des γ -TuRC (Kim und Kunsoo 2014). Im Menschen sind zwei Isoformen gelistet (NM_018249 & NM_001011649), deren N-terminalen Enden sich einschließlich der CM1 Domäne nicht unterscheidet (AS 1-1396). C-terminal ist das Protein im MTOC der Zentrosomen verankert (Graser, Stierhof und Nigg 2007; Farache, et al. 2018).

7.1.3 Assoziierende Proteine sind der Ausgangspunkt neuer γ -TuRC und gewährleisten dessen Funktion

Als Nukleationsursprung setzt der γ -TuRC den Startpunkt für wachsende MT. Dabei können unterschiedliche Zellorganellen Ankerpunkte für den universellen γ -TuRC sein. Das Zentrosom ist die prominenteste Lokalisation des γ -TuRC. Ein weiterer Startpunkt für wachsende MT ist der Golgi-Apparat. Der Nukleationsursprung liegt auch hier im γ -TuRC (Farache, et al. 2018; Alberts, et al. 2015). Neue Nukleationsursprungsorte können aber auch bereits vorhandene MT sein. Der Augmin-Komplex ist eine Assemblierung aus dem γ -TuRC und weiteren assoziierten Proteinen, der als neuer Nukleationsursprung an existierende MT andockt. Man sollte allerdings betonen, dass sich der Augmin Komplex von der Grundlage des MTOC am Zentrosom unterscheidet. So konnte das CDK5RAP2 bis jetzt nur am Zentrosom und Golgi nicht jedoch am Augmin-Komplex nachgewiesen werden (Wang, et al. 2010). Ein assoziierendes Protein am Augmin Komplex ist NEDD1 (Gomez-Ferreria, et al. 2012). NEDD1 ist an allen Nukleationsursprungsorten präsent und fungiert als ein essentielles Protein in der Mitose durch die Rekrutierung des γ -TuRC zum Zentrosom (Farache, et al. 2018). Das N-terminale Ende des Proteins besteht aus WD-repeats und lokalisiert am Zentrosom und Augmin-Komplex. Das C-terminale Ende interagiert direkt mit dem γ -TuRC (Haren, et al. 2013; Petry, et al. 2011). *In vitro* Studien in HeLa Zellen haben gezeigt, dass eine Depletion von NEDD1 die Rekrutierung des γ -TuRC zu den Zentrosomen in der Mitose verhindert (Haren, et al. 2013). Interessanterweise zeigt jedoch der Verlust/knockdown von NEDD1 in bereits postmitotischen, differenzierten Nervenzellen keine Veränderung in der

Erscheinung der Zelle (Tann und Moore 2019). Einige Aufgaben bzw. Funktionen des Proteins werden dabei bis heute kontrovers diskutiert. Während NEDD1 in menschlichen Krebszelllinien für die Lokalisation am Zentrosom verantwortlich ist, ist es in *X. l.* und *Drosophila melanogaster* nicht für die Rekrutierung des zentrosomalen γ -Tubulin verantwortlich (Muroyama, Seldin und Lechler 2016). Um resultierend die Funktionsweisen und einzelne Aufgaben von Proteinen am γ -TuRC zu verstehen muss die Gesamtheit aller assoziierenden Proteine beurteilt werden. Ein möglicher Nachweis von biochemisch interagierenden Proteinen in einem gesamten Komplex bildet z.B. die Tandem Massenspektrometrie (MS/MS), der Protein-Chip, der Förster-Resonanzenergietransfer u.v.m. Je nach Experiment können dann die Proteine, die sich in einem Komplex befinden, qualitativ und quantitativ nachgewiesen werden. Im weiteren experimentellen Verlauf kann dann die Aufgabe eines jeden Proteins untersucht werden. Das Bild eines Aktivators ergibt sich somit aus der Reflexion der biochemischen Analyse und den funktionalen Tests.

Um direkt eine Vielzahl an möglichen Kandidaten für Aktivatoren zu erhalten wird aus dem einfach zu manipulierenden und zellfreien *Xenopus* Ei-Extrakt System mittels Immunpräzipitation der γ -TuRC isoliert. Bei der dabei verwendeten Tandem MS/MS werden die Proteine zunächst ihrer Größe nach in einer Polyacrylamid Gelelektrophorese aufgetrennt. Anschließend können die interagierenden Proteine als Peptidfragmente in der Massenspektrometrie analysiert werden. Dazu wird die Probe im ersten Schritt ionisiert und anhand der substratspezifischen Ionen (Masse des Peptides) ausgewählt. In der Stoßkammer werden dann die Ionen zerkleinert und die Zerfallsprodukte werden weiter aufgetrennt. Am Detektor werden die einzelnen, fragmentierten Peptidfragmente detektiert (Lohninger, et al. 2003). Mit der Tandem MS/MS werden die interagierenden Proteine des γ -TuRC identifiziert. Eine Übersicht der Summe der einzelnen detektierten Peptide ist in **Tabelle 1** aufgelistet. Auf diese Weise werden die direkt mit dem γ -TuRC zugehörigen GCP Protein identifiziert (Nakamura, et al. 2012). Zu ergänzen ist diese Liste durch Proteine, deren Assoziation am γ -TuRC bereits bekannt sind, jedoch nicht mit detektiert werden. Das präzipitierte, interessierte Protein ist über Antikörper (AK) gekoppelt an Protein A-Beads. Ausschlaggebend für fehlende Proteine können Faktoren wie das resuspendieren mit verschiedenen Puffern oder Unterschiede in Salz oder pH Gehalt sein. Vorstellbar ist aber auch, dass es sich nur um schwache Interaktionspartner handelt, die nicht aus dem Gesamtlysat herausgezogen werden.

Tabelle 1: Massenspektrometrische Analyse der assoziierten Proteine der γ -Tubulin Präzipitation

Summe der einzelnen Peptidanzahl aus der massenspektrometrischen Analyse der γ -TuRC Präzipitation. Replikate γ -Tubulin und IgG – Kontrolle n = 3. In Rot geschriebene Proteine stehen in noch keinem genauer untersuchten Zusammenhang mit γ -Tubulin und sind somit als Kandidaten möglicher Aktivatoren (eigene Auswertung, Experiment durch Peng Liu Zentrum für Molekulare Biologie (Heidelberg)). Gezeigt ist eine Auswahl an immunpräzipitierten Proteinen absteigend der Anzahl der Häufigkeit der einzelnen Proteinfragmente, vollständige Auflistung vgl. **Tabelle 10** und **Tabelle 11** im Anhang.

Protein	Σ Fragmente Immunpräzipitat mit γ -Tubulin Antikörper (n = 3)	Σ Fragmente Immunpräzipitat mit IgG Antikörper (Kontrolle) (n = 3)	
Tubgcp6	68	3	Hohe Salzkonzentration
Tubgcp3	86	1	
Sec24A	39	0	
Tubgcp2	54	2	
Tubgcp4	35	0	
Sec23B	32	1	
Nme7	19	0	
Nup107	4	0	
Sec23A	4	0	
Tubg1	4	0	
Mzt 2B	4	0	
Mzt 1	3	0	
Mel-28	17	4	
Cep192	51	0	
Nup160	16	0	
Nup98	9	0	
Sec16A	10	0	
Sec23B	69	2	
Sec24A	38	3	
Sec24B	13	0	
Sec31B	5	0	
Gcp2	18	2	
Gcp3	101	0	
Gcp4	39	1	
Gamma Tub	124	29	

7.2 *Xenopus laevis* Ei-Extrakt als Modellsystem zur Identifizierung und Untersuchung assoziierender Proteine des γ -TuRC

Versuche zur Aktivierung des γ -TuRC erfordern ausreichend biologisches Material. Voraussetzung hierfür ist ein einfach zu manipulierendes System. Das zellfreie System aus Eizellen von *Xenopus laevis* (*X. l.*) bietet hierfür die wohl besten Möglichkeiten aus Rohmaterial Komponenten zu reinigen und biochemisch zu analysieren, aber auch um funktionale Tests durchzuführen. Die durch die *X. l.* abgelegten Oozyten können durch Zentrifugation aufgebrochen werden. Das so freiwerdende Zelllysate kann gesammelt werden (10.2). Das gewonnene *ex vivo* Extrakt, auch *Xenopus*-Ei-Extrakt (XEE) genannt bietet vielseitige Möglichkeiten einer kontrollierten Versuchsdurchführung. Eine übliche Untersuchung der durch Immunpräzipitation gewonnenen Proteine aus dem XEE ist die Identifikation der Assoziationspartnerproteine mittels Massenspektrometrie. So wird der γ -TuRC aus dem XEE Rohmaterial isoliert, gereinigt, aufgetrennt und im Anschluss werden interagierende Proteine mittels Tandem MS/MS detektiert und analysiert (10.11).

Weiter eignet sich das XEE zur Untersuchung der Spindelassemblierung und der Strukturanalyse von MT. Im XEE kann der Einfluss von rekombinant synthetisierten Proteinen, Peptiden, Chemikalien, RNAs u.v.m. direkt untersucht werden. Auf diese Weise kann die genaue Funktion einzelner Proteine im gesamten Extrakt analysiert werden. Die aus dem Extrakt spezifisch gewonnenen Proteine können interagierende Proteine als Interaktionspartner mit präzipitieren. So bieten sich zum Beispiel weitere Funktionsversuche (*in vivo/ex vivo*) wie aber auch analytische *in vitro* Versuche wie der Western Blot oder die Massenspektrometrie an.

In einer Tandem MS/MS einer γ -Tubulin Immunpräzipitation aus dem XEE zeigen sich zum Beispiel die zu erwartenden, interagierenden Proteine des γ -TuRC: γ -Tubulin, gcp6, gcp2 und gcp3. In drei unabhängigen massenspektrometrischen Experimenten sind auch Proteine wie das Nme7, Sec23A, Sec23B, Sec24A, Mel-28 und Nup107 identifiziert worden. Selbstverständlich ist, dass die so detektierten Kandidaten zunächst nur Interaktionspartner sind. Der eigentliche funktionale Test der identifizierten Proteine bleibt offen. Gleichzeitig muss aber auch die Stellung der hier gefundenen und bereits bekannten Proteine als Modulatoren berücksichtigt werden. Auf einige der Proteine aus der Tandem MS/MS wird im Folgenden kurz eingegangen (**Tabelle 1**).

Nme7 besitzt als einziges abundant detektiertes Protein eine Kinaseaktivität. Nme7 zählt mit seinen zwei Kinasedomänen zu den Nukleosiddiphosphatkinasen bzw. den Histidinkinasen, wobei die Kinasedomäne B keine katalytische Aktivität aufweist (Liu, Choi und Qi 2014). Die bekannte katalytische Reaktion von Nme7 ist die von zwei Dinukleotiden zu einem Trinukleotid und einem Mononukleotid (Adam, et al. 2020). Als einziges Protein dieser Familie hat Nme7 eine Lokalisation am Zentrosom, die in der Tandem MS/MS nachgewiesen werden. Bei regrowth Versuchen in Nme7 Knock-down Zellen (hTERT-RPE1) konnte bei der MT Assemblierung eine reduzierte Polymerisierung

registriert werden. Es kommt zu einem verlangsamten Wachstum der Zellen in der Zellkultur (Liu, Choi und Qi 2014). Obwohl Nme7 in der **Tabelle 1** detektiert wird, liegt der γ -TuRC in einer inaktiven Struktur vor. Eventuell reicht die Menge an Nme7 aber nicht aus, um den γ -TuRC in eine aktive Struktur zu überführen oder die katalytischen Domänen sind nicht mehr aktiv. Alternativ kann es weitere Mechanismen geben, die die dreidimensionale Anordnung der Struktur des γ -TuRC weiter beeinflussen. Die Eigenschaften von Nme7, als einen möglichen Aktivator des γ -TuRC, passen jedoch in der Hinsicht der Lokalisation, Biochemie und bekannten Funktion mit den Hypothesen überein und stellen das Protein als einen guten Kandidaten dar.

Die Interaktion vom γ -TuRC mit Vesikelproteinen scheint auf den ersten Blick nicht offensichtlich. Betrachtet man jedoch die Funktionen und Aufgabe beider Proteine so ergibt sich ein möglicher Zusammenhang. Sec23A und Sec23B bilden zusammen mit weiteren Sec-Proteinen die COPII-Vesikel. Diese Vesikel sind Transportkomponenten zwischen dem endoplasmatischen Retikulum (ER) und dem Golgi-Apparat. Sec23 und Sec24A sind an der Vesikelaußenseite lokalisiert (Jensen und Schekman 2010). In der Interphase lässt sich am Golgi-Apparat γ -TuRC lokalisieren und des Weiteren sind Assemblierungen von MT zu beobachten (Alberts, et al. 2015). In der Mitose wird eine große Anzahl an aktiven γ -TuRC gebraucht. Ein mögliches Modell für Sec23/Sec24 ist, dass die Proteine des in der Mitose fragmentierten Golgi-Apparat dissoziieren und an der Aktivierung des γ -TuRC beteiligt sind. Somit kommt es zu einer plausiblen Interaktion von Sec23A und Sec24A mit dem γ -TuRC. Die eigentliche Funktion und Biochemie müssen in diesem Zusammenhang noch genau geklärt werden.

Neben zunächst nicht erwartenden Vesikelproteinen Sec23A und Sec24 zeigt die massenspektrometrische Analyse auch Komponenten der Zellkernporen (NPC) (**Tabelle 1**).

Bei Beginn der Mitose stellen zelluläre Mechanismen sicher, dass die Kernhülle sowie die NPCs disassemblieren. Der NPC besteht aus ca. 30 Proteinen, den sogenannten Nukleoporinen (Nup). Diese liegen in mehreren Kopien vor und können so eine NPC Masse von 125 mio Da pro NPC in Vertebraten ausmachen. Die einzelnen Nukleoporine sind dabei in verschiedenen Komplexen organisiert und bilden in Kombination die eigentliche Kernpore durch die Doppelmembran der Kernhülle. Die Größe einer Kernpore beträgt ca. 120 nm (Alberts, et al. 2015; Winey, et al. 1997). Bei der Zellteilung kommt es am Anfang der Mitose zum Zusammenbruch der Zellkernmembran (nuclear envelope breakdown; NEB) und zur Disassemblierung mit Neustrukturierung der NPCs. Einzelne Nukleoporine des NPCs lokalisiert an den Kinetochoren. Kinetochore befinden sich in der Mitose seitlich der Zentromere und bilden den Angelpunkt des Spindelapparates. Jedoch haben Experimente in mitotische HeLa Zellen gezeigt, dass es zu einer Lokalisation NPC Subkomplexen nicht nur an den Kinetochoren, sondern auch an den Spindelpolen kommt. Ein Subkomplex des NPC bildet der Nup 107-160 Komplex (Tamura, et al. 2010).

In der Interphase zählt zum Nup 107-160 Komplex das Nukleare Porenkomplex Protein 107 (Nup107) (Yokoyama, et al. 2014). Eine genaue Zuordnung des Nup107 Komplexes zu den Spindelpolen konnte bis dato nicht getroffen werden (Orjalo, et al. 2006). Ein knockdown des NUP107 Proteins in HeLa verhindert am Ende der Mitose das Assemblieren des NPC (Boehmer, et al. 2003). Im *Xenopus* System wird gezeigt, dass der Nup107-160 Komplex mit verantwortlich für eine robuste Spindelassamblierung ist (Orjalo, et al. 2006). Mel-28 und das Protein Nup107 sitzen in der Interphase im nukleoplastischen Ring an der Innenseite des NPCs (Weberruss und Antonin 2016). Bekannt ist, dass Mel-28 im Rahmen der Mitose wie Nup107 an den Kinetochoren der Chromosomen assembliert (Rasala, et al. 2006). Im Verlauf der Mitose wird zusätzlich Mel-28 an den Spindelpolen im MTOC als MAP lokalisiert (**Tabelle 1**). Mel-28 fördert die RanGTP abhängige γ -Tubulin Rekrutierung und die MT Nukleation (Yokoyama, et al. 2014). Die Rekrutierung der zusätzlichen Komponente von Mel-28 in der Mitose an den γ -TuRC könnte erklären, warum zu Beginn der Mitose mehr aktiver γ -TuRC zur Verfügung steht. Somit sind die Proteine des Nup107-160 Komplexes insbesondere mit dem interagierenden Mel-28 Protein angesichts der schon bekannten Lokalisation ein interessanter Kandidat für einen Aktivator des γ -TuRC. Die genaue Funktion gilt es in weiteren Versuchen zu klären.

In der Tandem MS/MS wird auch das direkt mit dem γ -TuRC interagierende Protein Mozart 1 (Mzt1) identifiziert (Nakamura, et al. 2012). Mzt1 ist mit verantwortlich für die Rekrutierung und Oligomerisierung der einzelnen γ -TuSC zum finalen γ -TuRC (Lin, et al. 2016). Wird Mzt1 durch einen knockdown in HeLa-Zellen reduziert, entsteht eine geringere Rekrutierung der Komponenten des γ -TuRC zu den Zentrosomen. Die Mitose zeichnet sich in diesem Fall durch eine monopolare Spindel aus (Hutchins, et al. 2010). Wird die Menge an Mzt1 reduziert, so bilden sich wie bei einer γ -Tubulin Reduzierung oder einer CDK5RAP2-CM1 Mutation weniger MT-Aster aus. Die Oligomerisierung und die Assemblierung des γ -TuRC ist reduziert (Lin, et al. 2016). Interessant ist, dass Mzt1 an dieselbe Region (CM1) vom γ -Tubulin Komplex Rezeptoren wie CDK5AP2 bindet. In der Folge wachsen die MT (Choi, et al. 2010).

In der hier durchgeführten Tandem MS/MS liegt der γ -TuRC inaktiv vor und Cdk5rap2 kann nicht detektiert werden. Auch andere massenspektrometrische Untersuchungen zeigen, dass CDK5RAP2 als ein bekannter und direkter Interaktionspartner des γ -TuRC unter allen anderen zu erwartenden Proteinen nicht detektiert werden kann. (Muroyama, Seldin und Lechler 2016). Diese fehlende Detektion ist konsistent mit der Hypothese, dass der Aktivator während der Reinigung und den stringenten des γ -TuRC verloren geht. Bekannte Interaktionen am γ -TuRC sprechen für CDK5RAP2 als Aktivator. CDK5RAP2 kann für eine Aktivierung mit dem γ -TuRC interagieren, wird aber im inaktiven Zustand nicht detektiert.

Koimmunpräzipitationen in Lysaten aus humanen HEK293T Zellen haben gezeigt, dass es eine Interaktion zwischen dem N-terminus von CDK5RAP2 und dem C-terminus von MZT1 gibt (Lin et al. 2016). Die Interaktionen lassen sich bestimmten Protein-Domänen zuordnen. So hat CDK5RAP2 zwei Proteindomänen, die in Wechselwirkung mit anderen Proteinen oder Strukturen treten können. Während die C-terminale CM2 Domäne für die zentrosomale und Golgi-Lokalisation verantwortlich ist, befindet sich N-terminal die CM1 Region (Wang, et al. 2010). Diese ist für die direkten Interaktionen zum γ -TuRC und zu MZT1 verantwortlich. Verschiedene Mutanten die sich auf den Bereich der CM1 Domäne von CDK5RAP2 konzentrieren, haben gezeigt, dass diese CM1-Region ausschlaggebend für assoziierende Proteine ist. Ein kurzes Stück N-terminus von CDK5RAP2, welches vollends die CM1 besitzt, zeigt die gewöhnliche Interaktion mit MZT1. Ein Teilverlust der CM1 Region in CDK5RAP2 resultiert in einer fehlenden Interaktion mit MZT1 (Lin, et al. 2016). Setzt man eine Mutation in die CDK5RAP2 CM1 Region (F75A), wird die Bindung zu MZT1 geschwächt (**Abbildung 12**) (Lin, et al. 2016). Es bleibt die Fragestellung offen, welchen Einfluss CDK5RAP2 und die genannte Mutation der CM1 Region genau auf die Assoziation mit γ -TuRC hat.

In der Mitose werden mehr aktive γ -TuRC gebraucht. Die in der Massenspektrometrie ermittelten assoziierten Proteine von γ -Tubulin erweitern das Feld möglicher Aktivatoren des γ -TuRC. Neben CDK5RAP2 erweitert sich somit die Liste mindestens um die am häufigsten gemessenen Kandidaten NME7, SEC23/SEC24A und MEL-28. Ziel ist es, die Kandidaten in Hinsicht ihrer Effektivität als Aktivator des γ -TuRC im XEE zu testen. Voraussetzung für die meisten Experimente ist, dass die verwendeten Antikörper in ihrem Epitop spezifisch im *X. l.* System bzw. in Aminosäuresequenzen über entsprechende Spezies hinweg konserviert sind. Die Antikörper müssen dann je nach Verfügbarkeit entsprechend zunächst produziert, validiert und getestet werden.

Mögliche Antikörper sollen zunächst mittels Immunfluoreszenz in XL177 Zellen getestet werden. Im weiteren Verlauf wird dann in *in vivo* Versuchen ein besonderer Fokus auf die quantitativen Veränderungen möglicher Aktivatoren während der Mitose in XL177 Zellen gelegt (**Abbildung 2**).

7.2.1 Validierung und quantitative Analysen neuer Antikörper mittels Immunfluoreszenz in XL177

Untersucht wird ein Aktivator des γ -TuRC zunächst im XEE. Die zur Immunisierung der Kaninchen verwendete Peptidsequenz basiert auf der von *Xenopus laevis*. Auch der später gereinigte γ -TuRC wird aus dem XEE gewonnen. Daher werden Validierungsversuche der Antikörper zunächst im *Xenopus* Zellen vorgenommen. Die XL177 Zellen sind eine etablierte *Xenopus laevis* Zelllinie aus Kaulquappen Epithel. Eine Möglichkeit der Validierung neuer Antikörper ergibt sich aus der Koimmunfluoreszenzfärbung mit bereits bekannten Antikörpern. Die Auflösung ist dabei so detailliert, dass Lokalisationen bzw. Koloalationen in bestimmten Regionen von Zellorganellen darstellbar sind. So bieten sich zum Beispiel Centrin oder γ -Tubulin Antikörper für eine eindeutige und zentrosomale Lokalisation an. Centrin zählt mit in die Klasse der Kalzium-bindenden Phosphoproteine und ist in den Zentriolen und in unmittelbarer Umgebung dieser vorhanden (Salisbury, et al. 2002; Baron, et al. 1992). Bei einer späteren Quantifizierung kann dann das Signal in jeder Zelle einzeln analysiert werden (**Abbildung 2**). Ziel ist vorab die Validierung der neuen Antikörper und quantitative Untersuchung möglicher Aktivatoren des γ -TuRC in der Mitose.

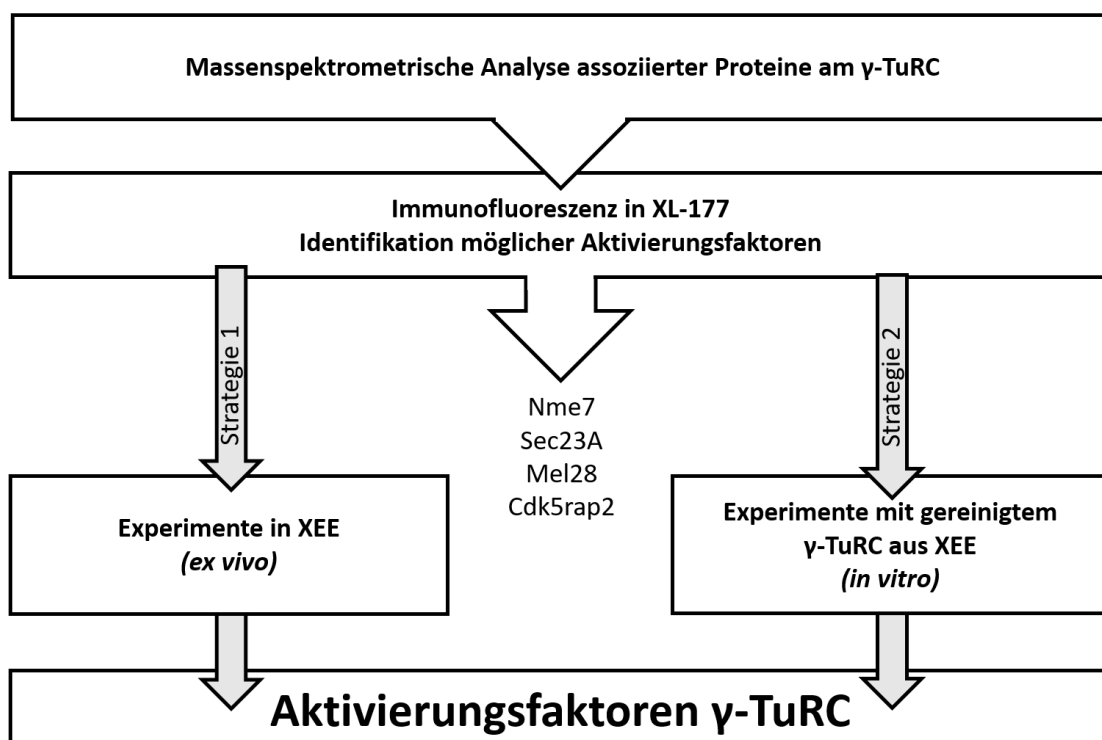


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Experimente zur Identifikation eines möglichen Aktivators des γ -TuRC
Darstellung des schematischen Ablaufes zur Identifikation eines möglichen Aktivators des γ -TuRC. Mögliche Kandidaten aus massenspektrometrischen Analysen (Nme7, Sec23A, Mel-28 und Cdk5Rap2) sollen zunächst in der Immunfluoreszenz in XL177 Zellen in verschiedenen Mitosestadien spezifiziert werden. Im Anschluss werden die verbleibenden Kandidaten in zwei unterschiedlichen Strategien genauer analysiert. Die Grundlage hierbei bilden *ex vivo* und *in vitro* Experimente mit Hilfe des XEE.

Zeigt die Immunofluoreszenz in XL177 *Xenopus* Zellen signalvermittelte, signifikante Veränderungen in der Mitose, werden die möglichen Aktivator Kandidaten dann in *ex vivo* Versuchen (Strategie 1) und *in vitro* Versuchen (Strategie 2) untersucht (**Abbildung 2**). *Ex vivo* Experimente werden direkt im XEE (10.5) durchgeführt. Ein wesentlicher Vorteil der *ex vivo* Experimente stellt die RanGTP induzierte γ -TuRC abhängige Mikrotubuliassemblierung im homogenen Eiextrakt ohne Zentrosomen dar. In Bezug auf mögliche Aktivatoren kann so das XEE-System gezielt untersucht werden. Experimente am isolierten γ -TuRC mit gereinigtem α - und β -Dimer Tubulin werden als *in vitro* bezeichnet. (10.14). Die beiden Strategien sollen mögliche Kandidaten, die als Aktivierungsfaktor des γ -TuRC in Frage kommen, weiter fokussieren und identifizieren (**Abbildung 2**).

7.2.2 RanGTP abhängige Mikrotubuliassemblierung

Bekannt ist Ran in der Interphase für den Transport von Cargo zwischen Cytoplasma und Nukleus. Im Rahmen der Vorbereitung und Ausführung der Mitose zerfällt der Zellkern und die Proteine des NPC werden umstrukturiert. Die Konzentration an RanGTP wird *in vivo* durch den Regulator der Chromosomenkondensation 1 (RCC1) justiert. RCC1 assoziiert mit den Chromosomen und ist der Guaninnukleotid-Austauschfaktor (GEF) für Ran. RanGTP ist dafür verantwortlich, dass gebundenes Importin und Kargo dissoziieren (Gruss und Vernos, 2004). In der Mitose regulieren die Importine in Komplexen den Transport von Proteinen vom Cytoplasma in den Zellkern (Alberts, et al. 2015). Durch die Aktivierung von RanGTP wird das normalerweise an Importin α gebundene Targeting Protein für Xklp2 (TPX2) frei (Gruss, et al. 2001). RanGTP bindet an Importin β und an den Importin α CAS (Export Rezeptor) Komplex (Gruss, et al. 2001; Li und Zheng 2004). Zeitgleich kommt es durch die Aktivierung von Tpx2 im XEE zur Assemblierung und der Stabilisierung von Spindeln (Zhang, et al. 2017; Petry, et al. 2013). Abhängig von RanGTP bzw. Tpx2 kann wie ein Schalter die MT Assemblierung in der M-Phase beeinflusst werden (Gruss und Vernos, 2004). Es ist wichtig an dieser Stelle festzuhalten, dass nur polymerisierte MT gemessen werden. Eine Unterscheidung zwischen Nukleation und Stabilisierung ist in diesem Versuchsaufbau nicht möglich. Genauer gesagt kann das Ereignis einer Nukleation in den *ex vivo* Versuchen zufällig sein und die MT werden z.B. durch Xmap215 oder Tpx2 stabilisiert. Im Umgekehrten Fall können sich in *X. l.* Tpx2 depletierten XEE keine MT-Aster generieren (Wittmann, Wilm und Vernos 2000). Vergleichbare Ergebnisse sind auch in einer Δ Xmap215 in XEE zu erkennen. Auch hier kommt es zu keiner Ausbildung von MT-Aster im XEE obwohl in beiden Fällen Nukleationsereignisse sehr wahrscheinlich stattgefunden haben (Thawani, Kadzik und Petry, 2018).

Die für Nukleation am γ -TuRC im XEE vorhandenen Mechanismen weisen nicht die vorgefertigten MTOC in der hier zuvor dargestellten Art und Weise auf. Vielmehr handelt es sich im XEE um große Komplexe der Selbstorganisation. Im MTOC liegen im Proteinkomplex die phosphorylierten Formen

von Aurora A und Neural precursor cell expressed developmentally down-regulated 1 (Nedd1), sowie Tpx2, der γ -TuRC und weitere Proteine vor. Dieser Komplex ist mitverantwortlich für die Assemblierung von MT (Kufer, et al. 2002; Fu, et al. 2007; Garrido und Vernos 2016; Gruss und Vernos, 2004). Resultierend aus der Reaktionskaskade ausgelöst durch RanGTP wird Tpx2 auch als MT-Nukleationsfaktor bezeichnet (Gruss, et al. 2001). Wichtig zu erwähnen ist, dass Tpx2 unabhängig von Aurora A in der Nukleation funktioniert. Aurora A hat auf die eigentliche Nukleation keinen Einfluss (Gruss und Vernos, 2004; Wittmann, Wilm und Vernos 2000; Gruss, et al. 2001).

Die durch RanGTP ausgelösten Interaktionen können im Eiextrakt-System gezielt beeinflussen werden. Eine Aktivierung der Kaskade ist durch die Zugabe von hydrolysedefizientem RanGTP (RanGTP Q69L) möglich. Hierbei stabilisiert die Mutation Q69L das GTP an Ran (Hutchins, Moore und Clarke 2009). Alternativ weist Ran T24N eine reduzierte Affinität zum GTP/GDP auf und bildet vielmehr einen stabilen Komplex mit RCC1 (Hutchins, Moore und Clarke, 2009). Resultierend kann Ran als Effektor der MT Assemblierung verwendet werden. Die Einflüsse der unterschiedlichen Ran-Varianten auf die Nukleation von MT bzw. deren Stabilisierung können idealerweise im *ex vivo* System getestet werden (7.2.). Fügt man zum Beispiel rekombinantes RanGTP Q69L im Versuch in XEE hinzu (*ex vivo*), so verlagert sich die Reaktionskaskade zu Gunsten von Tpx2 und Aurora A und es formieren sich nach kurzer Zeit Aster aus MT. Dagegen bilden sich keine Mikrotubuli-Aster durch die Zugabe von Ran T24N aus.

Darüber hinaus werden durch die Stimulation mit RanGTP auch Ausbildungen von MT am Augmin-Komplex initiiert (Petry, et al. 2013; Petry, et al. 2011). Voraussetzung hierfür ist die Existenz eines Augmin-Komplexes an assemblierten MT. Das Wachstum von MT wird auch hier durch dissoziiertes TPX2 von Importin α ausgelöst. Durch die Phosphorylierung wird die Aktivierung von assoziierten Proteinen wie NEDD1 gesteigert. Es folgt die MT Polymerisation am γ -TuRC an zuvor existierenden MT (Alfaro-Aco, Thawani und Petry 2017; Tann und Moore 2019).

7.2.3 Durch MT und assoziierende Proteine bedingte Erkrankungen

Neben der Grundlagenforschung spielen die hier eingeführten und untersuchten Proteine eine wichtige Rolle zur Erklärung molekularer Ursachen verschiedener pathologischer Zustände. Die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse können für die Erkennung und Behandlung klinisch relevanter Erkrankungen und Therapien ein wichtiger Baustein sein. Einige genetisch bedingte Fehlfunktionen, die auf zellulärer Basis greifbar sind und die im Organismus einen pathologischen Phänotyp auslösen sind auf das Cytoskelett, insbesondere auf MT, den γ -TuRC und auf Fehlfunktionen assoziierender Proteine zurückzuführen. Diese werden im Folgenden kurz vorgestellt.

Eine Vielzahl der heute identifizierten genetisch bedingten Erkrankungen zellulärer Funktionen ist auf die Möglichkeit der verbesserten Methodik der DNA-Sequenzierung zurückzuführen. Die Korrelationen erlauben oft Rückschlüsse von molekularen Veränderungen auf Zellfunktionen und somit auch auf die Auswirkungen im gesamten Organismus. So können auch sehr seltene, offensichtliche Mutationen bzw. Genvarianten erkannt und diagnostiziert werden.

Zu unterscheiden sind die mono- und multigenetische Erkrankungen. Monogenetische Erkrankungen sind auf die Läsion eines einzelnen Gens zurückzuführen (Sauer, Roy-Chowdhury und Roy-Chowdhury 2014). Ein bekanntes Beispiel sind Mutationen des *CFTR*-Gens, welche zum klinischen Bild der Mukoviszidose führen können. So kann z. B. die Aminosäuredeletion $\Delta F508$, der Aminosäureaustausch N1303K, Stoppmutation W1282X u.v.m. zur monogenetischen Erkrankung führen (Dechecchi, Tamanini und Cabrini 2018).

Im Gegensatz dazu sind multigenetische bzw. polygenetische Erkrankungen auf multiple Mutationen im Genom zurückzuführen (Bell 1993). Eine Vielzahl der Herz-Kreislaufkrankungen zählt zu dieser Kategorie.

Anhand der genannten Beispiele wird deutlich, wie wichtig die molekulare Gendiagnostik ist. Die zukünftige Entwicklung der nächsten Jahre wird weitere Erkenntnisse über Erkrankungen bringen, deren Ursache in den molekular genetischen Fehlregulationen liegt.

Demzufolge ergibt sich auch für die Komponenten der MT und des γ -TuRC eine immer weiterführende Auflistung von identifizierten, genetischen Variationen, die sich u. a. in veränderten Phänotypen zeigen können.

Wie bereits beschrieben nehmen MT über die Mitose hinaus weitere Aufgaben wahr. So wurde bereits auf den Transport von Vesikeln, Zilien oder stabilisierende Effekte eingegangen. Wie sich gezeigt hat ist die erfolgreiche Funktion der MT unter anderem abhängig von den assoziierenden Proteinen. Im Folgenden wird auf die bekanntesten Erkrankungen der bereits beschriebenen Proteine eingegangen.

Eine Exondeletion entsprechend einer kodierenden Sequenz von 34 Aminosäuren in der zweiten inaktiven Kinasedomäne von NME7 wird nach heutigen Kenntnissen mit einem *Situs Inversus Totalis* in Verbindung gebracht (Reish, et al. 2016). Das klinische Bild eines *Situs Inversus Totalis* äußert sich durch eine spiegelbildliche Anordnung aller Organe der Patienten. Im Bereich der deletierten 34 Aminosäuren liegt Arginin 322. Prognosen sagen voraus, dass es im Kontext mit dieser Deletion zu einem negativen Effekt von NME7 am γ -TuRC kommt (Reish, et al. 2016). Zusätzlich gibt es im Zusammenhang mit NME7 erste Hinweise über die Mitose hinaus im Rahmen von möglichen Ziliopathien, die noch weiter untersucht werden müssen. Hierbei kann NME7 eine mögliche Komponente sein, die im Gesamtergebnis zur Ziliopathie führt. In RNAi funktionalen Tests wird NME7

als Signal- und Transportprotein an primären Zilien detektiert. Auffallend ist, dass hier nur ein Zusammenhang zum Basalkörper und nicht zu den MT gefunden wurde (Liu, Choi und Qi 2014).

Eine beschriebene Punktmutation im *CDK5RAP2* Gen bewirkt, dass es zu einem Aminosäureaustausch kommt (E1352G). Aufgrund dessen entwickelt sich bei den Patienten das Symptombild einer Mikrozephalie (Woods, Bond und Enard 2005; Alfares, et al. 2017). Phänotypisch gesehen haben erkrankte Personen einen verhältnismäßig kleinen Kopf. Molekularbiologisch ist *CDK5RAP2* ein direkter Interaktionspartner des γ -TuRC. Weiter nimmt *CDK5RAP2* eine essentielle Rolle am Anfang der Mitose ein und erfüllt eine Schlüsselposition bei der Zentrosomenexpansion (Rale, Kadzik und Petry 2018). Zu beachten ist, dass die Entwicklung einer Mikrozephalie nicht nur einzig auf die bereits beschriebene *CDK5RAP2* E1352G Mutation zurückzuführen ist, sondern auch viele verschiedene Ursachen haben kann. In *Cdk5rap2* mutierten Zellen (Mausembryo – Fibroblasten) konnte durch den Funktionsverlust von *Cdk5rap2* beobachtet werden, dass die normale Zentriolen Konfiguration verloren geht (Barrera, et al. 2010). Eine weitere Entdeckung ist die Ausbildung von multiplen Zilien in *Cdk5rap2* Mutanten. In mutierten *Cdk5rap2* Zellen kam es zur einer siebenfach stärkeren Ausbildung von Zilien im Vergleich zur Kontrollgruppe (Barrera, et al. 2010). Auch hier ist zu betonen, dass *Cdk5rap2* nur eine mögliche Komponente für die Ursache von Ziliopathien sein kann.

Es stellt sich nun die Frage, ob die hier analysierten möglichen Kandidaten (Aktivatoren) aus der Tandem MS/MS Massenspektrometrie bei Veränderungen auch Erkrankungen zeigen die zurückzuführen sind auf die Assoziierung bzw. Aktivierung des γ -TuRC.

Patienten mit Mutationen im *SEC23B* bzw. *SEC23A*-Gen zeigen eine dyserythropoetische Anämie oder eine kranio-lentikulo-suturale Dysplasie (Russo, et al. 2010; Boyadjiev, et al. 2006). Es bleibt die Frage offen, ob es sich bei den Erkrankungen um eine Mono- oder Multigenetische Erkrankung handelt. Eine dyserythropoetische Anämie zeigt sich klinisch in einer verringerten Produktion von Erythrozyten. Die kranio-lentikulo-suturale Dysplasie (Boyadjiev-Jabs-Syndrom) ist eine seltene Erkrankung, die sich durch eine große, spät schließende Fontanelle auszeichnet (Boyadjiev, et al. 2002). Bis vor kurzem war eine Beziehung von MT, γ -TuRC und *SEC23* unbekannt. Die Frage ist, ob sich Erkrankungen mit *SEC23/SEC24* auf eine mögliche Änderung der Nukleation zurückführen lassen.

Aus den hier genannten Beispielen wird klar, dass assoziierende Proteine des γ -TuRC und der MT einen enormen Einfluss auf die Zelle und somit auf den ganzen Organismus haben können.

7.3 Fragestellung

Neuste Forschungsergebnisse zeigen den γ -TuRC in einer noch nie zuvor dargestellten Auflösung. Dabei bildet der γ -TuRC die Matrize für die Assemblierungen der α - und β -Tubulin Dimer Untereinheiten. Auffällig ist, dass gereinigter γ -TuRC nicht wie der richtige Puzzlestein optimal auf die wachsenden MT passt, durch plausible Konformationsänderung aber zu solch einem passender Puzzleteil werden kann. Proteine, die direkt am γ -TuRC assoziieren gelten als die wichtigsten und potentiellen Aktivatoren um diese strukturelle Modifikation zu ermöglichen. Durch massenspektrometrische Analysen werden mögliche Aktivatoren identifiziert. Diese werden neben den schon bekannten Aufgaben auf mögliche Aktivatoreigenschaften untersucht. Zur Identifikation des Aktivators werden sowohl *ex vivo* Versuche im XEE wie auch *in vitro* Versuche im gereinigten Tubulin durchgeführt. Zusammenfassend dienen beide Versuchsansätze dazu, unabhängig voneinander einen möglichen Aktivator des γ -TuRC bzw. die Reaktionskaskade zu entdecken. Insbesondere wird der Fokus auf die strukturellen Änderungen des γ -TuRC während der Mitose gelegt. Die Bestimmung eines möglichen Aktivators bildet im weiteren Verlauf die Grundlage, genetisch bedingte Erkrankungen des Cytoskelettes/Organismus besser zu verstehen.

8 Ergebnisse

8.1 Centrin und γ -Tubulin als zentraler Marker des Nukleationsursprung der MT am Zentrosom in der Mitose

Die aus der γ -TuRC Immunpräzipitation und in der Tandem MS/MS (**Tabelle 1**) identifizierten Kandidaten eines möglichen Aktivators sollen zunächst in der Immunfluoreszenz validiert werden (**Abbildung 2**). Da der Nukleator gerade in der Aufteilung des genomischen Materials eine hohe Aktivität zeigt, liegt der Fokus auf den Spindelpolen, dem mitotischen Nukleationsursprung. Prognostisch sollte an dieser Stelle eine hohe Funktionalität des Aktivators zu erwarten sein. Um die Lokalisation einzugrenzen werden γ -Tubulin oder Centrin Antikörper später als Kontrolle eingesetzt und zunächst getestet. Die Position beider Proteine ist über die gesamte Mitose hinweg bekannt und in anderen Zelllinien bereits publiziert (Aziz, et al. 2018; Piehl, et al. 2004). Gemessen mit Hilfe eines spezifischen Centrin-Antikörpers nimmt die Menge an Centrin von der Interphase bis zur Metaphase zu (Aziz, et al. 2018).

Abbildung 3 a zeigt eine Centrinfärbung innerhalb der Mitose in XL177 Zellen. Über alle Stadien hinweg ist zu erkennen, dass Centrin in den Zellen ein eindeutig zu lokalisierendes Signal mit geringem Hintergrund aufweist. Am Anfang der Mitose zeigen sich zwei Signale im Bereich des Zellkerns. Im weiteren Verlauf dezentralisieren sich die Signale und ordnen sich an den beiden Spindelpolen an. Während der Anaphase ist eine Lokalisierung des Centrinsignals mit der DAPI markierten DNA zu erkennen. In der anschließenden Telophase ist in jeder der beiden Tochterzellen ein einzelnes Centrinsignal zu erkennen.

Die quantitative Auswertung des Centrinsignals ist in **Abbildung 3 b** dargestellt. Die Daten der unterschiedlichen Mitosestadien sind auf die Interphase normiert. Ausschließlich die Signalintensität in der Metaphase ist im Vergleich zur Interphase signifikant erhöht. Alle anderen Mitosestadien entsprechen von der Signalstärke der Interphase. Diese Beobachtung ist bereits in Aziz, et al. 2018 beschrieben und konnte hier in *X. l.* Zellen reproduziert werden.

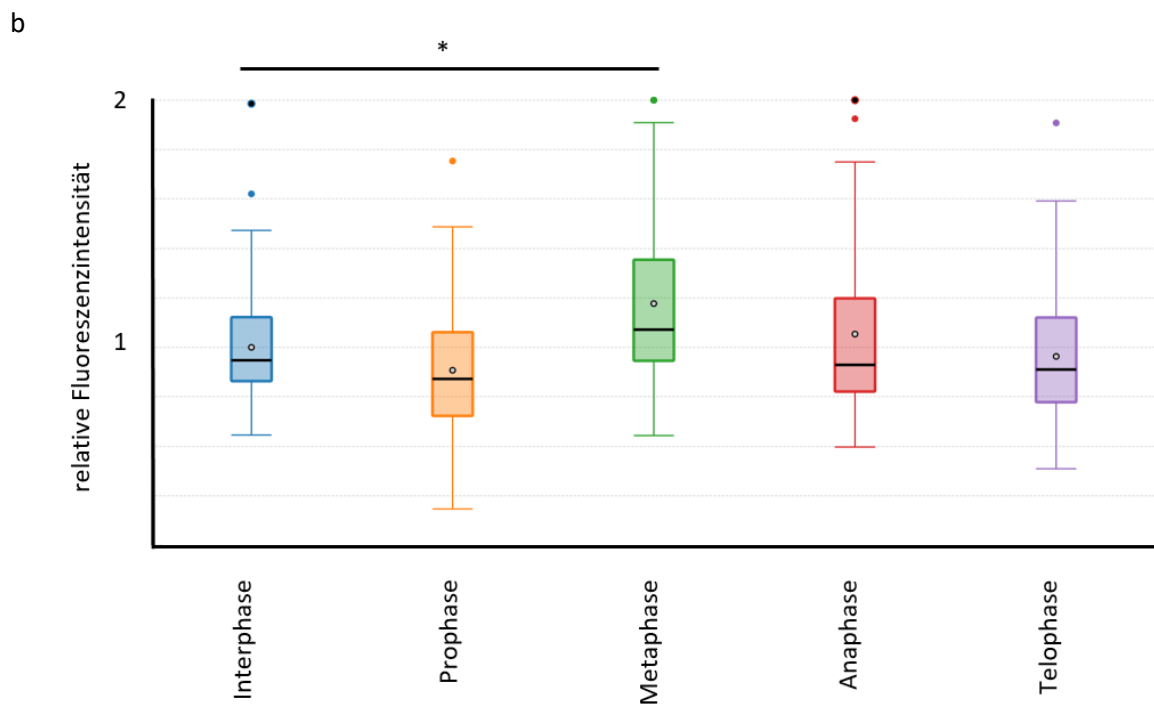
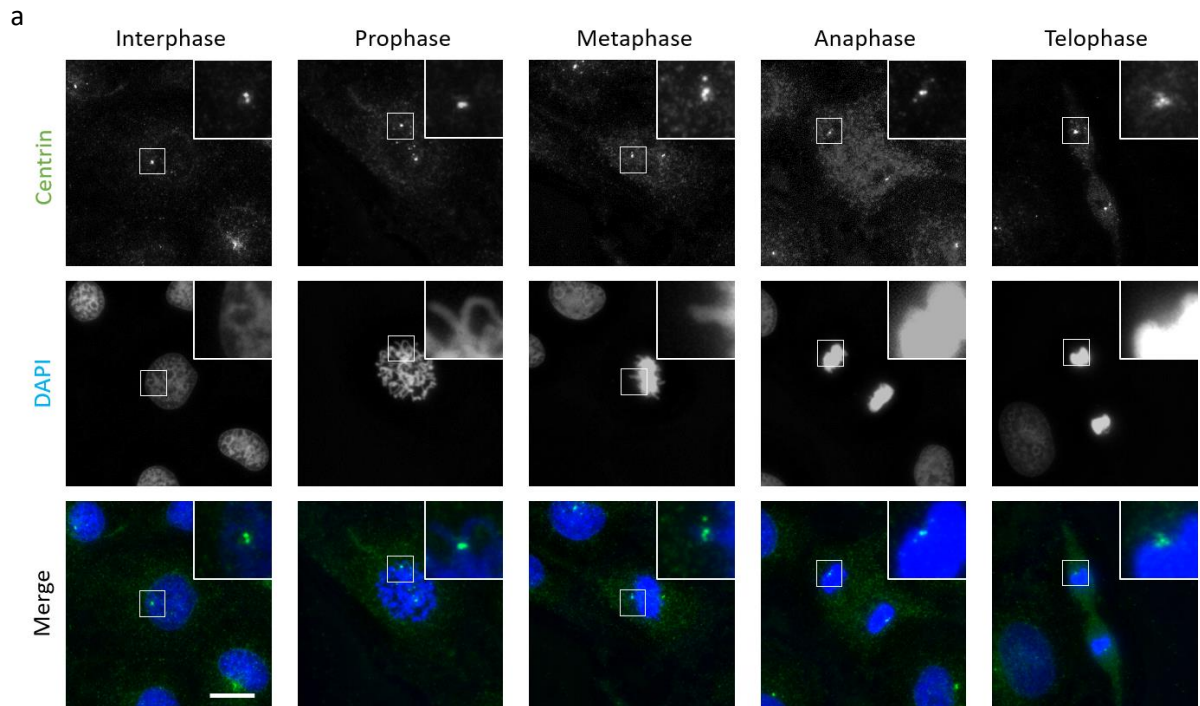


Abbildung 3: Lokalisation des Nukleationsursprung durch Centrin und quantitative Bestimmung des Signals
a Exemplarische Immunfluoreszenzen (XL177 Xenopus Zellen Methanol fixiert) durch Centrin (grün 488 ms) in verschiedenen Phasen der Mitose, DAPI Färbung zur Identifizierung des Mitosestadiums. **b** Quantitative Auswertung des Centrinsignals unterschiedlicher Mitosestadien. Die Signalstärke wird auf die Interphase normalisiert. Die Signalintensitäten von Metaphase und Interphase unterscheiden sich signifikant (Keyence BZ-X800, 60 x Vergrößerung, Maßstab 10 μ m; Student's t-Test, two tailed, $p^* < 0,00625$; Anzahl der Proben vgl. **Tabelle 8**)

Die Analyse von Centrin soll zeigen, dass eine quantitative Auswertung der Antikörpersignale in der Mitose durchgeführt werden kann.

Es wird gezeigt, dass das Centrin in der Mitose an Spindelpolen/Zentrosomen lokalisiert. Eine Quantifizierung der einzelnen Mitosestadien ist möglich. Im Gegensatz zum Centrin Antikörper ist der γ -Tubulin Antikörper ein im AG-Gruss Labor bereits etablierter Antikörper und wird regelmäßig in verschiedenen *X. l.* Versuchen erfolgreich benutzt. Die Signalintensität von γ -Tubulin in der Mitose ist bekannt (Piehl, et al. 2004).

Somit können im weiteren Versuchsablauf neue Antikörper im direkten Vergleich zu Centrin oder γ -Tubulin getestet und verifiziert werden. In Folge dessen ist eine mögliche qualitative und quantitative Auswertung der neuen Antikörper dann in der Koimmunfluoreszenz möglich. Die aus der **Tabelle 1** und Literatur identifizierten Kandidaten werden nun im weiteren Verlauf auf ihre Eigenschaft untersucht, mögliche Aktivator Kandidaten des Nukleators zu sein.

8.2 Sec23 assoziiert mit γ -Tubulin und ist demzufolge ein möglicher Kandidat der γ -TuRC Aktivierung

SEC23A und SEC24A sind Bestandteile von COPII Vesikeln und am Transport vom ER zum Golgi-Apparat beteiligt. Somit sind die Proteine in der Interphase einer klaren Funktion zugeordnet. Ungeklärt ist, welche Rolle die Proteine in Verbindung mit γ -Tubulin einnehmen. Gerade in der Mitose und Meiose muss daher die Funktion abschließend geklärt werden.

Die Spezifität der kommerziellen Sec23A (Antigensequenz Ratte) und Sec24A (Antigensequenz Mensch) Antikörper wird mit der spezifischen Antigensequenz von *X. l.* abgeglichen. Beide Antikörper werden vorab in anderen Experimenten im *X. l.* System im Labor überprüft und verifiziert.

Zur weiteren Untersuchung wird aus dem XEE mittels Immunpräzipitation γ -Tubulin immunpräzipitiert. Wird ein Protein vollständig aus einem Lysat (hier XEE) immunpräzipitiert, so spricht man von einer Depletion (10.11). Für die Präzipitation von Proteinen werden magnetische Protein A Beads verwendet. Die schweren Ketten, des jeweils spezifisch verwendeten Antikörpers werden mit hoher Affinität an das an die Beads gekoppelte Protein A immobilisiert (Gruss 2019). Mit Antikörper gekoppelte Protein A Beads werden auch als Beads bezeichnet. Mit den Beads kann dann das entsprechende Antigen aus einer komplexen zellulären Mischung spezifisch gebunden werden (XEE Fraktion) (Gruss 2019). Um die Depletion aus dem Extrakt zu ermöglichen wird dieses mehrfach mit den jeweils neuen, gekoppelten Beads behandelt. Ziel ist es, γ -Tubulin aus dem XEE zu präzipitieren und eine Assoziation der Proteine Sec23A und Sec24A zum γ -Tubulin nachzuweisen.

Zunächst konnten die behandelten Extrakte untersucht, sowie an den Beads befindliches γ -Tubulin detektiert werden (**Abbildung 4 a**). Das Migrationsverhalten im SDS-Gel beträgt 48 kDa. Das γ -Tubulin konnte erfolgreich an den Beads nachgewiesen werden. Im Extrakt ist das γ -Tubulin nach der zweiten Präzipitation stark reduziert. Die IgG Kontrolle zeigt jeweils nur eine schwache, unspezifische Bande in der Bead Fraktion. Zu erkennen ist, dass sich im Extrakt der IgG Kontrolle auch nach zweifacher Immunpräzipitation noch γ -Tubulin befindet. In beiden Ansätzen ist die schwere Kette des Antikörpers zu erkennen (> 50 kDa).

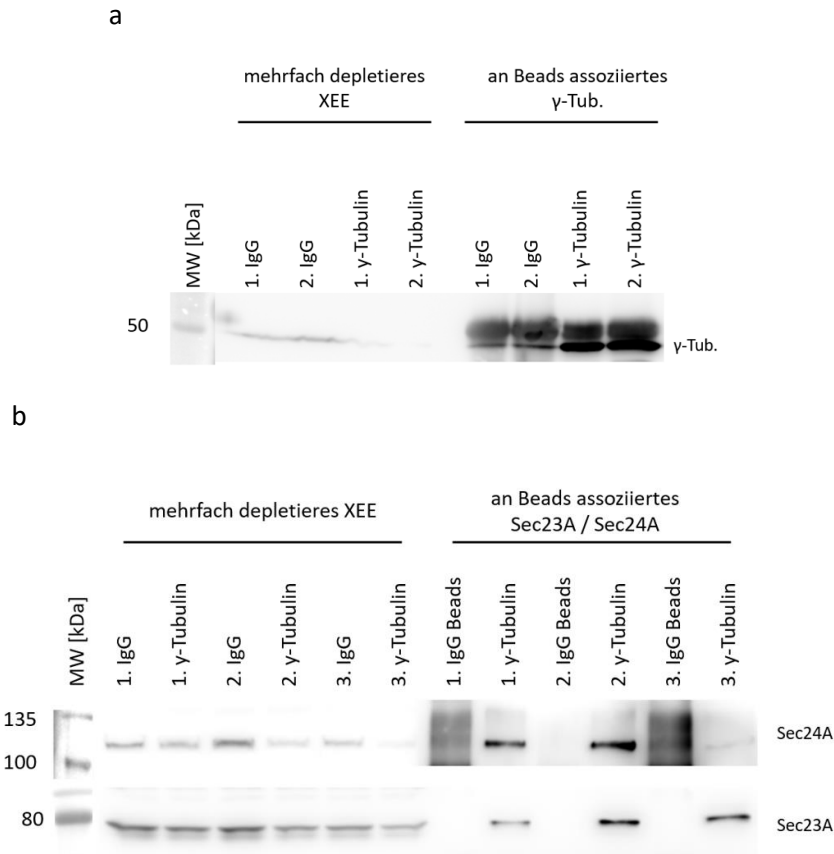


Abbildung 4: Sec23/Sec24 und γ -Tubulin Depletion aus XEE

a Zweifache γ -Tubulin Depletion aus XEE mit anschließender Kontrolle der Depletion (pr. AK γ -Tubulin), Kontrolle IgG Depletion. Zu erkennen ist in der ersten und zweiten Depletion eine Abnahme des γ -Tubulin Signals im XEE. In der anschließenden Untersuchung konnte das γ -Tubulin an den Beads nachgewiesen werden. Die Kontrolle zeigt keine Depletion des γ -Tubulin. **b** mehrfach γ -Tubulin depletierendes Extrakt mit anschließender Detektion der an den γ -Tubulin Beads assoziierten Proteine Sec23A und Sec24A. Sec23A konnte zu Teilen in drei γ -Tubulin Immunpräzipitationsschritten aus dem XEE depletiert werden, zeigt sich jedoch weiter im Extrakt. Ein analoges Analyseergebnis ergibt sich für Sec24A. Der IgG Kontrollvergleich zeigt wie erwartet keine Veränderung im Extrakt und keine Signale an den Beads.

Im weiteren Verlauf werden Sec23A und Sec24A Assoziationen mit γ -Tubulin analysiert und im Western Blot erfolgreich nachgewiesen. Zu diesem Zweck werden die Extrakte analog zu dem Versuch zu **Abbildung 4 a** γ -Tubulin depletiert. Anschließend werden sowohl die Beads wie auch die Extrakte separat untersucht und mit dem jeweiligen primären Antikörper (Sec23A/Sec24A) inkubiert (**Abbildung 4 b**). Das Sec24A wird als assoziiertes Protein an den γ -Tubulin Beads nachgewiesen. Das Sec24A Signal nimmt mit der Anzahl der γ -Tubulin Präzipitationen im Extrakt ab. Die IgG Kontrolle zeigt in den Extrakten weitestgehend keine Signalveränderungen an den Beads. Sec23A zeigt eine Assoziation mit den γ -Tubulin Beads. In allen präzipitierten γ -Tubulin Extrakten wird jedoch noch ein Sec23A Signal detektiert. Es ist kein Sec23A Signal an den IgG Kontroll-Beads zu erkennen. In der Kontrolle kann Sec23A in allen γ -Tubulin XEE-Präzipitationsfraktionen nachgewiesen werden (**Abbildung 4 b**, rechter Teil).

Tabelle 2: Tandem MS/MS Analyse der assoziierten Proteine einer Sec24A Präzipitation

Aufgeführt sind anteilig die Summen der Peptide aus der massenspektrometrischen Analyse einer Sec24 Präzipitation (Tandem MS/MS, Vergleichend ist die Summe der Peptide aufgelistet). Gezeigt sind zentrosomale (Cep), MT involvierte und COPII (Sec23A) assoziierte Proteine. Gezeigt ist eine Auswahl an immunpräzipitierten Proteinen absteigend der Anzahl der Häufigkeit der einzelnen Proteinfragmente, vollständige Auflistung vgl. **Tabelle 12** im Anhang.

Protein	Σ Fragmente Immunpräzipitat mit Sec24 Antikörper	Σ Fragmente Immunpräzipitat mit IgG (Kontrolle)
Cep152	34	0
Sec24A	20	0
Cep192	13	0
Sec16	9	0
Cep63	7	0
Sec23A	5	0

Eine durchgeführte Sec24A Immunpräzipitation in XEE, welches in der späten Meiose II arretiert ist, zeigt in der Tandem MS/MS eine Assoziation mit dem COPII Vesikelprotein Sec23. Wie erwartet werden hier auch andere Proteine der COPII Vesikel wie z. B. Sec16 detektiert. Bemerkenswert ist aber auch ein hoher Anteil zentrosomaler Proteine (Ceps), so wurden z. B. Protein wie Cep63, Cep1522 und Cep192 detektiert (**Tabelle 2**). Cep63, Cep152 und Cep192 übernehmen eine Schlüsselrolle in der Duplikation der Zentriolen (Sir, et al. 2011; Zhu, et al. 2008). Bekannt ist CEP192 zusätzlich für die Rekrutierung von perizentriolarem Material und die damit verbundene die Reifung der Zentrosomen (Zhu, et al. 2008). Resümierend lässt sich also festhalten, dass Sec23 und Sec24A nicht nur in den Vesikeltransport involviert sind, sondern auch noch unbekannte, zentrosomale Aufgaben erfüllen und mögliche Interaktionspartner des γ -TuRC sind.

Die Ergebnissen der Western Blot Analyse und den Massenspektrometriedaten führen zu derselben Schlussfolgerung (**Abbildung 4 & Tabelle 2**). Neben der Detektion der COPII Vesikelproteinen werden auch Proteine angezeigt, die am Zentrosom assoziieren. Beim Zerfall des Golgi-Apparates, in Vorbereitung der Mitose, scheint es auf Grund der später benötigten hohen Anzahl an MT zu einer Umstrukturierung der COPII Proteine zu kommen. Daher müssen auch die COPII Proteine wie Sec23 und Sec24 als Aktivator des γ -TuRC in Betracht gezogen werden.

Eine mögliche Rolle des Aktivators des γ -TuRC muss weiter untersucht werden. Dies lässt sich, wie bereits beschrieben, am besten quantitativ mit Hilfe der Immunfluoreszenz im Vergleich zu Centrin bzw. γ -Tubulin untersuchen. Untersucht wird auf Grund derselben Lokalisation beider Proteine und der Verfügbarkeit kommerzieller Antikörper die Kolo-kalisation von Sec23A mit γ -Tubulin in der Immunfluoreszenz. In der Interphase zeigt sich keine Lokalisation von Sec23A in direkter Nähe zu γ -

Tubulin in XL177 Zellen (**Abbildung 5 a**). Einzelne Sec23A Proteine sind als Hintergrundsignal im Cytoplasma zu sehen. Auch in der Prophase ist das Signal nur schwer mit γ -Tubulin in der Kollokalisierung zu erkennen. Erst in der Metaphase sind sichtbaren Änderungen der Lokalisation von Sec23A in der Immunfluoreszenz zu erkennen. Das Signal intensiviert sich in Kollokalisierung mit γ -Tubulin räumlich an den Spindelpolen. Im weiterem Mitoseverlauf nehmen die Intensitäten des Sec23A Signals weiter ab. In der Telophase scheint die Signalintensität sogar unterhalb der normalisierten Interphase zu sinken.

Die quantitative Bestimmung des γ -Tubulin Signals aus den Koimmunfluoreszenzdaten der Sec23A Messungen zeigt signifikante Änderungen über alle Mitosestadien im Vergleich zur normierten Interphase (**Abbildung 5 b**). Alle weiteren quantitativen Analysen möglicher Aktivatoren in XL177 können mit der Verteilung des γ -Tubulin Signals (Kontrolle) verglichen werden. Die γ -Tubulin-Kontrollen sollten in den einzelnen Experimenten untereinander vergleichbar sein. Quantitative Analysen mehrerer Sec23A Immunfluoreszenzsignale über die verschiedenen Stadien der Mitose zeigen nur signifikante Veränderungen in der Metaphase und Telophase im Vergleich zur Interphase (**Abbildung 5 c**). In der Metaphase nimmt die Signalintensität im Vergleich zur Interphase zu. Zum Ende der Mitose, in der Telophase, nimmt die Sec23A Intensität ab. Damit entspricht das Ergebnis dem ersten bereits vermittelten Eindruck aus den Koimmunfluoreszenzfärbungen (**Abbildung 5 a**). Biochemie und Lokalisation von Sec23A entsprechen zwar den Erwartungen, jedoch sind nach der Analyse der Funktion über die Segregation des genomischen Materials nur in zwei Mitosestadien signifikante Veränderungen zu beobachten. Die Medianwerte verändern sich kaum. Aufgrund der geringen quantitativen Veränderungen der Signalstärke über die Mitosestadien hinweg, wird Sec23A zunächst nicht als möglicher Aktivator des γ -TuRC in Betracht gezogen. Festzuhalten ist, dass in der Methanolfixierung eine Kollokalisierung mit MT zu sehen ist.

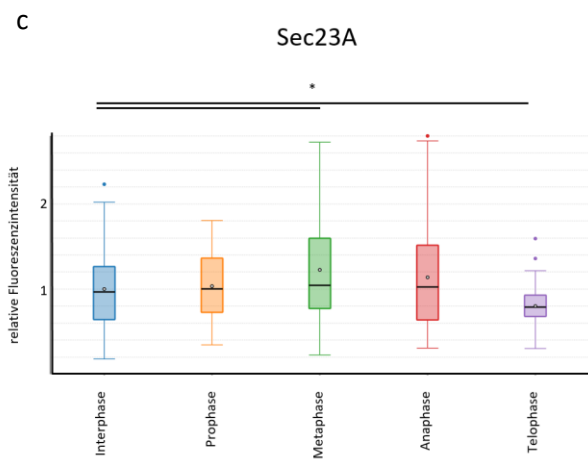
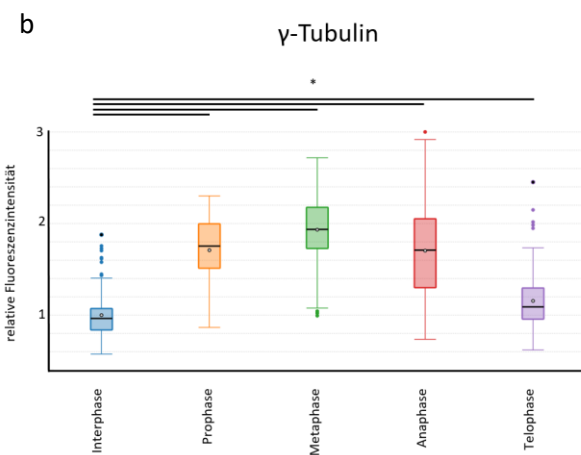
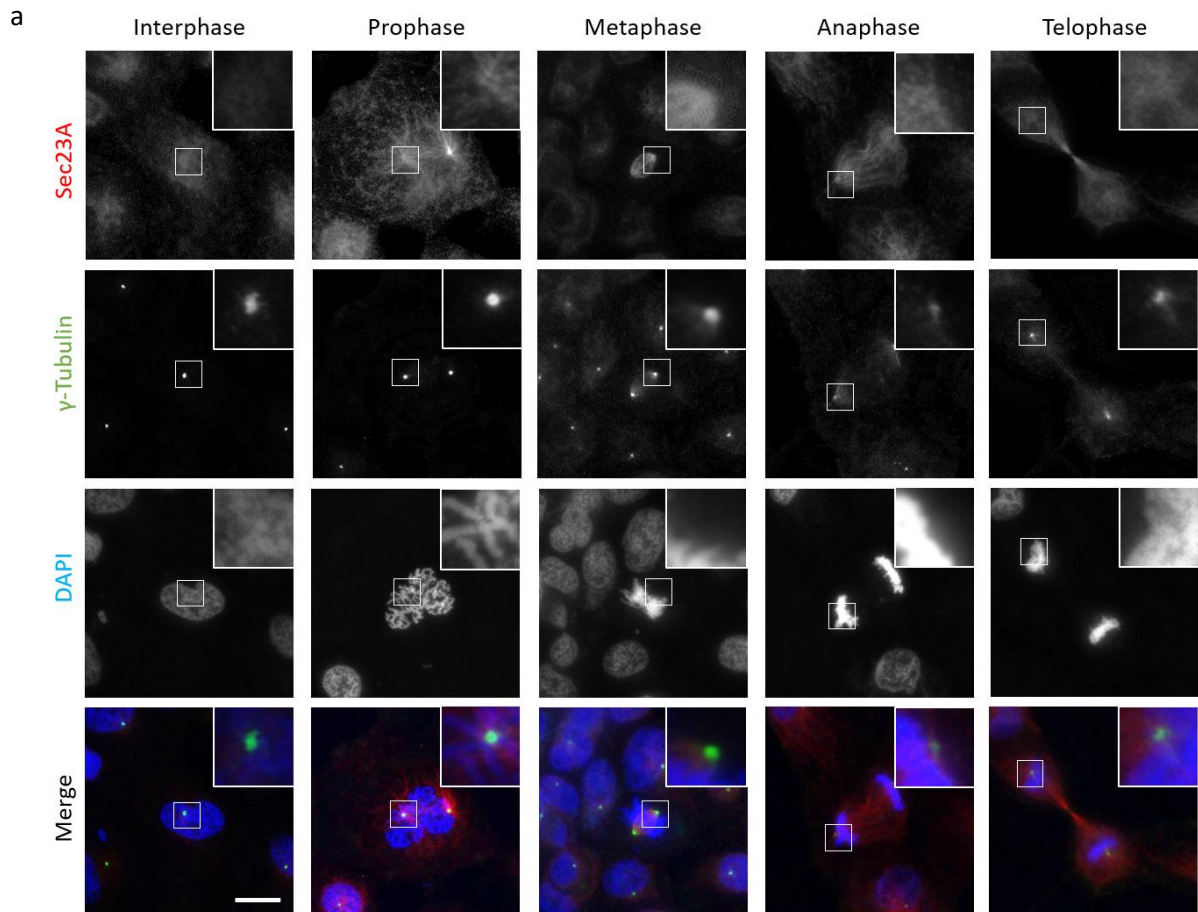


Abbildung 5: Sec23 und γ -Tubulin in Kolokalisation, Lokalisierung und Quantitative Bestimmung

a Exemplarische Immunfluoreszenzen (XL177 Xenopus Zellen Methanol fixiert) von Sec23A (rb) und γ -Tubulin (ms) der in **b** und **c** quantitativen Auswertung. **b** Quantifizierung des γ -Tubulin Signals in den verschiedenen Stadien des Zellzyklus. Die Signale der Mitosestadien sind normalisiert auf die der Interphase. Alle Mitosestadien sind im Vergleich zur Interphase signifikant erhöht. **c** Sec23A Signalquantifizierung der einzelnen Mitosestadien. Zur normierten Interphase sind die Metaphase und die Telophase signifikant erhöht. (Keyence BZ-X800, 60 x Vergrößerung, Maßstab 10 μ m; Student's t-Test, two tailed, $p^* < 0,00625$; Anzahl der Proben vgl. **Tabelle 8**)

8.3 Ist Nme7 als zentrosomales Protein verantwortlich für die γ -TuRC Aktivierung und MT Organisation?

Das am Zentrosom lokalisierte NME7 ist im Rahmen der Auswertung der γ -Tubulin Tandem MS/MS als ein möglicher Kandidat der Aktivierung des γ -TuRC identifiziert worden (**Tabelle 1**). In einer Kooperationsarbeit wird ein gegen das Volllängenprotein Nme7 spezifischer *X. l.* Antikörper hergestellt. Dafür wird das Nme7 Protein in BL21Rosetta exprimiert (**Abbildung 6 a**). Nach Induktion der Expression durch 1 mM IPTG zeigt sich das Syntheseprodukt im Coomassie-Gel bei ca. 40 kDa (**Abbildung 6 a**). Nach der Bakterienlyse mittels Ultraschall und anschließender Zentrifugation (10.9) befinden sich ca. ein Drittel des Nme7 im Überstand. Die Menge an synthetisiertem und löslichem, gereinigtem Protein reicht aus, um zwei Kaninchen (Kaninchen 33/20 und Kaninchen 34/20) zu immunisieren. Nach der Immunisierung werden die in dem Serum enthaltenen Antikörper gegen Nme7 als Antigen mittels Affinitätschromatographie gereinigt (10.10.1). Die stärksten Elutionsfraktionen werden gesammelt und deren Konzentration bestimmt. Als Referenz zur Konzentrationsbestimmung werden definierte Mengen von 1 bis 3,5 μ g BSA aufgetragen.

Die Konzentration der Elutionsfraktionen (Antikörper) wird mit 100 ng/ μ l für das Kaninchen 33/20 (Nme7 Antikörper 1) und 200 ng/ μ l für das Kaninchen 34/20 (Nme7 Antikörper 2) bestimmt. (**Abbildung 6 b**). Im weiteren Verlauf werden die Antikörper spezifiziert und validiert sowie deren Funktion getestet.

Um die Spezifität und Funktion der Antikörper zu testen wird versucht mittels Immunpräzipitation Nme7 aus dem XEE zu gewinnen und anschließend zu detektieren (**Abbildung 6 c**). Das Nme7 kann im weiteren Verlauf an den zur Präzipitation benutzen Beads nachgewiesen werden. Es zeigt sich im Vergleich zur Kontrolle (IgG), dass Nme7 nahezu vollständig aus dem Extrakt depletiert wird. Daraus ergibt sich, dass die beiden aus dem Serum gereinigten Nme7 Antikörper spezifisch sind und für die IP funktionieren.

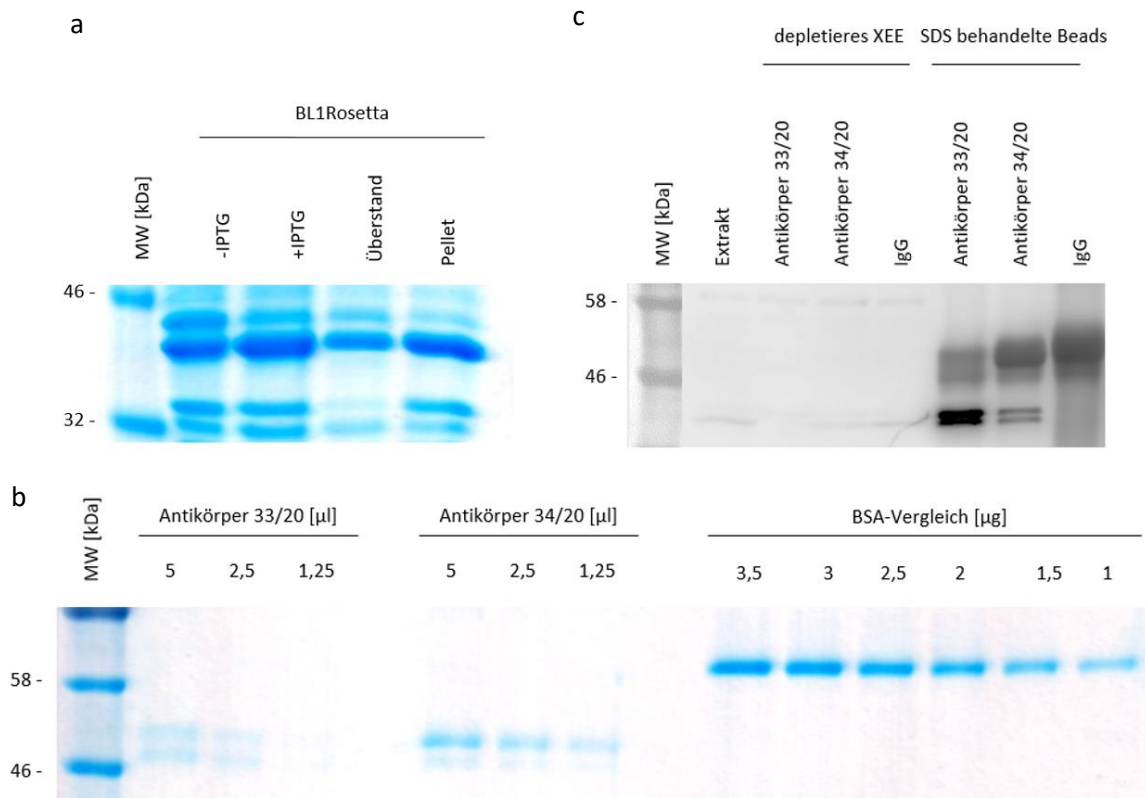


Abbildung 6: Expression, Konzentrationsbestimmung und Depletionskontrolle des selbst synthetisierten Nme7 Proteins und späteren Antikörpers

a Expression von Nme7 volllängigen Protein unter 1 mM IPTG in *E. coli*. Nach der Ultraschall-Lyse befinden sich ca. $\frac{1}{3}$ des exprimierten Proteins im Überstand. **b** Antikörperkonzentrationsbestimmung nach Reinigung mit dem aus **a** synthetisierten Antigen (33/20 = 100 ng/ μ l 34/20 = 200 ng/ μ l). **c** Depletionskontrolle mit beiden gereinigten Antikörpern im XEE. Das XEE wird vollständig depletiert. Das Nme7 konnte entsprechend für beide Antikörper an den Beads nachgewiesen werden.

Die aus dem XEE mittels Nme7 Antikörper immunpräzipitierten Proteine werden von den Beads gelöst und in einem 10 % SDS-Gel aufgetrennt. Im Anschluss erfolgt eine Tandem MS/MS Analyse und Auswertung. Im Vergleich zur IgG-Kontrolle wird eindeutig das Nme7 Protein identifiziert. Auch werden γ -Tubulin Peptide sowie Gcp3 und Gcp5 nachgewiesen. Dies lässt auf eine Interaktion mit dem γ -TuRC schließen. Als weiteres assoziierendes Protein von MT und zentrosomal lokalisiert, ist das Perizentriolar Material 1 Protein (Pcm1) detektiert. Schlussfolgernd kann gesagt werden, dass eine direkte biochemische Assoziation vom γ TuRC zu Nme7 besteht. Im weiteren Verlauf der Experimente gilt es daher die Funktion des Proteins als γ -TuRC Aktivator weiter zu untersuchen. Im Vergleich mit γ -Tubulin soll durch eine Koimmunfluoreszenz eine mögliche Funktion von Nme7 validiert werden. In der Immunfluoreszenz zeigt der Nme7 Antikörper in der Interphase eine klare Signalübereinstimmung mit dem γ -Tubulin Signal im Bereich des Zellkerns (**Abbildung 7 a**). Im Verlauf der Aufteilung des genomischen Materials ist keine abweichende Lokalisation vom Nme7 zum γ -Tubulin zu erkennen. Beide Signale bewegen sich von der aufgelösten Kernhülle zu den bipolaren Spindeln, bleiben also offensichtlich am Zentrosom lokalisiert.

Tabelle 3: Biochemische Analyse NME7 assoziierender Proteine

Aufgeführt sind anteilig die Summen der assoziierenden Peptide aus der Tandem MS/MS Analyse einer NME7/IgG Präzipitation. Neben der NME7 sind assoziierende Proteine wie verschiedene GCPs, γ -Tubulin und das PCM1 identifiziert. Gezeigt ist eine Auswahl an immunpräzipitierten Proteinen absteigend der Anzahl der Häufigkeit der einzelnen Proteinfragmente, vollständige Auflistung vgl. **Tabelle 11** im Anhang.

Protein	Σ Fragmente Immunpräzipitat mit Nme7 Antikörper	Σ Fragmente Immunpräzipitat mit IgG (Kontrolle)
γ -Tubulin	23	1
Nme7	12	1
Gcp Fragment	12	0
Gcp3	11	0
Gcp5	2	0
Gcp Fragment	2	0
Perizentriolar Material 1 Protein (Pcm1)	2	0

Die quantitative Analyse des γ -Tubulin Signals zeigt ein analoges Ergebnis zu den γ -Tubulin Messungen bei Sec23 und späteren Mel-28 und Cdk5rap2 Ergebnissen (**Abbildung 5 b**; **Abbildung 10 b**; **Abbildung 16 b**). In der Zellteilung zeigt sich in der Quantifizierung des Nme7 Signals nur eine signifikante Erhöhung in der Metaphase (**Abbildung 7 c**). Im weiteren Verlauf der Mitose nimmt die Signalintensität wieder ab (Ana- und Telophase) und entspricht am Ende der Intensität der Interphase. Der Kandidat Nme7 besitzt die Voraussetzungen der Lokalisation, biochemischen, nachweisbaren Interaktion sowie möglicher Funktion über die Kinasedomäne. Jedoch konnte die Funktion in der quantitativen Auswertung des durch Antikörper vermittelten Fluoreszenzsignals in XL177 nur in der Metaphase bestätigt werden. Die Signalintensität nimmt um ca. 50 % zu. Ein zunehmendes Signal entspricht den Erwartungen an einen Aktivator. Zurückzuführen ist dies auf die benötigten MT beginnend am γ -TuRC in der Mitose. Eine Signalzunahme sollte schon ab der Prophase zu erkennen sein. Um dennoch die Rolle von NME7 als ein möglicher Aktivator des γ -TuRC zu testen werden verschiedene Experimente im XEE durchgeführt (10.3). Hierfür wird das XEE zunächst Nme7 immundepletiert (10.11). Als Kontrolle wird eine Depletion mit unspezifischen IgG (rb) mitgeführt. Nach 30-minütiger Inkubation (10.3) zeigen beide Proben ohne die Zugabe von RanGTP Q69L keine Strukturen. Erst durch die Zugabe von 20 μ M RanGTP Q69L werden Aster ausgebildet (30 min). Die Strukturen scheinen sich qualitativ nicht zu unterscheiden (**Abbildung 8 a**). Ein vergleichbares Ergebnis zeigt sich nach 50 Minuten Inkubation. Ohne RanGTP Q69L bilden sich keine Strukturen aus. Nach Zugabe von 20 μ M RanGTP Q69L bilden sich Strukturen in beiden Proben aus (**Abbildung 8 b**). Die Asterausbildung aus den Nme7 depletierten Extrakten nach 20 und 50 Minuten lässt den Schluss zu, dass Nme7 nicht als essentieller Aktivator fungiert. Auch die Rolle als Stabilisator der MT kann ausgeschlossen werden, da sich sowohl im Δ Nme7 XEE wie auch der Kontrolle MT bilden. Die Qualität der MT ist augenscheinlich identisch. Eine Quantifizierung ist aufgrund der inhomogenen Verteilung der Strukturen nicht möglich.

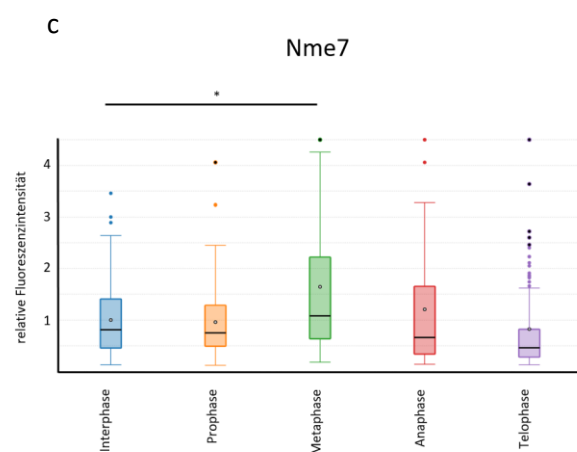
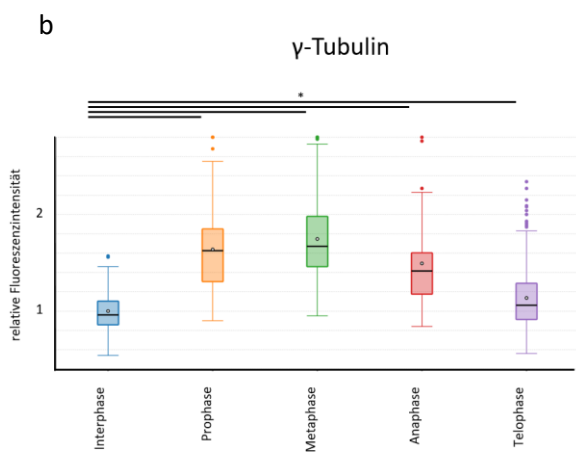
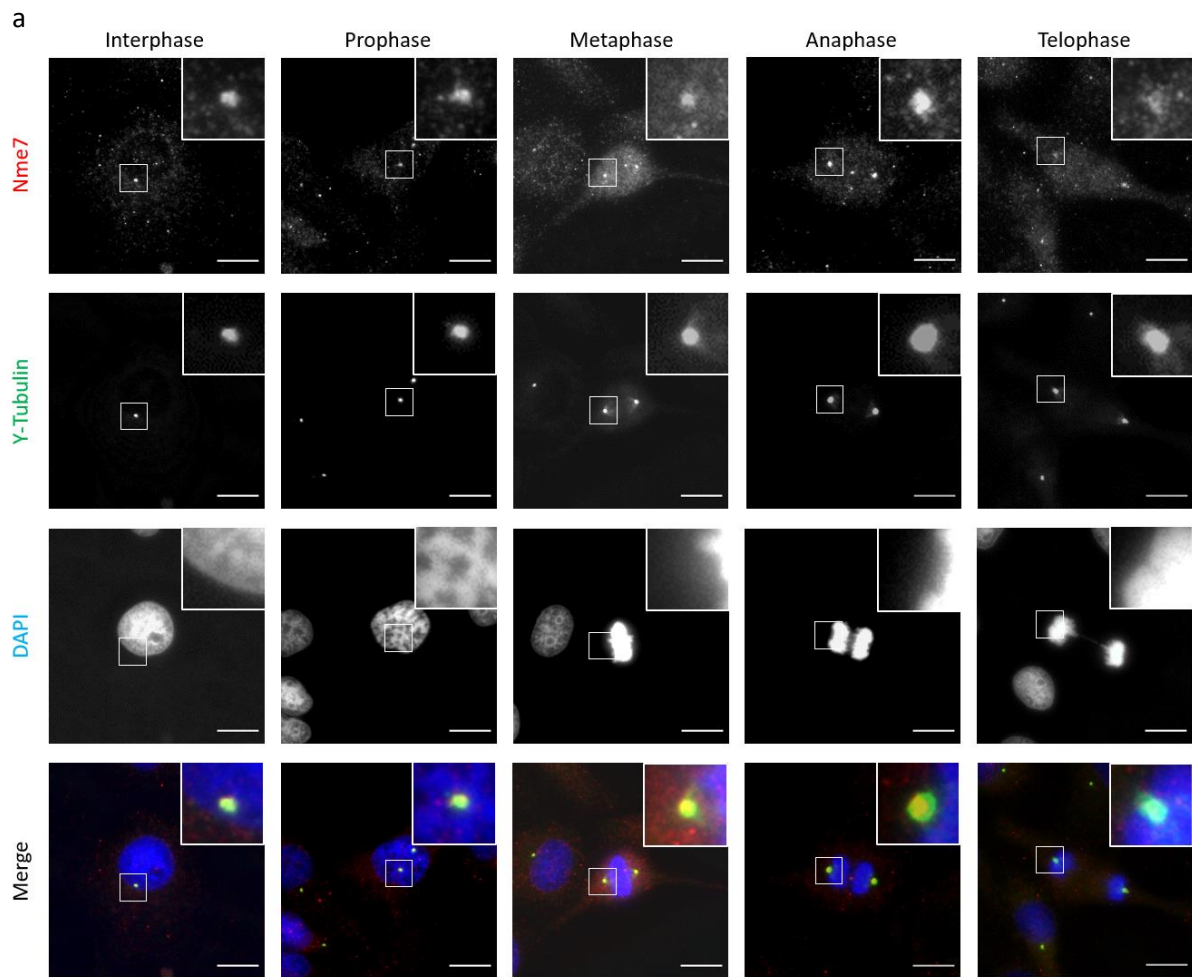


Abbildung 7: Immunfluoreszenz und quantitative Auswertung von NME7 und γ-Tub

a Exemplarische Immunfluoreszenzen (XL177 Xenopus Zellen Methanol fixiert) von Nme7 (rb) und γ-Tubulin (ms) der in **b** und **c** quantitativen Auswertung. **b** Quantifizierung des γ-Tubulin Signals in den verschiedenen Stadien des Zellzyklus. Die Signale der Mitosestadien sind normalisiert auf die der Interphase. Alle Mitosestadien sind im Vergleich zur Interphase signifikant erhöht. **c** Nme7 Quantifizierung in den Mitosestadien. Zur normierten Interphase ist die Metaphase signifikant erhöht. (Keyence BZ-X800, 60 x Vergrößerung, Maßstab 10 µm; Student's t-Test, two tailed, $p^* < 0,00625$; Anzahl der Proben vgl. **Tabelle 8**)

Aus diesem Grund wird zu einem späteren Zeitpunkt der *in vitro* MT Funktionsversuch durchgeführt und ausgewertet. Somit müssen noch Kandidaten wie das Mel-28 als Bestandteil des Nup107-160 Komplex und das Cdk5rap2 als mögliche Aktivatoren des γ -TuRC untersucht werden.

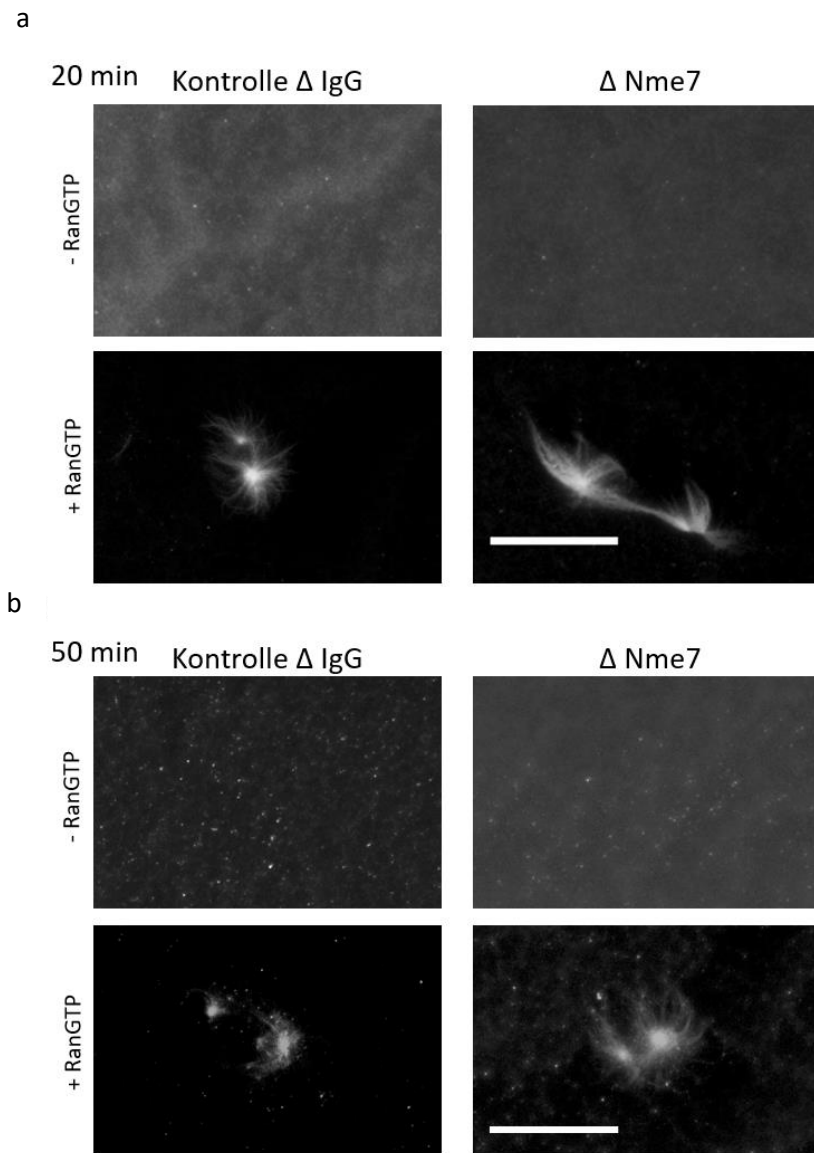


Abbildung 8: Funktionstest Δ Nme7/ Δ IgG in XEE

Funktionstest Nme7/IgG Depletion XEE zu unterschiedlichen Zeitpunkten. **a** nach 20 Minuten zeigen sich ohne die Zugabe von RanGTP Q69L sowohl in der Immundepletierten IgG (Kontrolle) Depletion wie auch in der Nme7 Depletion keine Strukturen. Erst durch die Zugabe von RanGTP Q69L (20 μ M) kommt es in beiden Proben zur Ausbildung von Astern. **b** Konsistent zu 20 Minuten ist das Ergebnis nach 50 Minuten. Ohne RanGTP Q69L kommt es zu keiner Ausbildung von Astern. Eine Quantifizierung ist aufgrund der inhomogenen Verteilung der Strukturen nicht möglich. Aus diesem Grund wird zu einem späteren Zeitpunkt der *in vitro* MT Funktionsversuch durchgeführt und ausgewertet. (Keyence BZ-X800, 40 x Vergrößerung, Maßstab 50 μ m)

8.4 Komponenten des NPC lokalisieren in der Mitose an den Spindelpolen

Eine Tandem MS/MS Analyse von Mel-28 IP zeigte verschiedene Proteine des γ -TuRC (Yokoyama, et al. 2014). Genauso werden in der hier untersuchten γ -TuRC massenspektrometrischen Analyse Proteine des Kernporenkomplexes gefunden **Tabelle 1**. Erwartungsgemäß wurden die Interaktionspartner des γ -TuRC bestätigt. Gleichzeitig wurden aber auch Proteine des NPC detektiert. Neben verschiedenen Nups wurden auch Mel-28 Proteinfragmente identifiziert. Im weiteren Verlauf soll nun auch das Mel-28 Protein als möglicher Aktivator des γ -TuRC analysiert werden. Mel-28 weist eine Molekülmasse (MW) von ca. 270 kDa auf. Proteine von solcher Größe sind schwierig volllängst rekombinant zu synthetisieren. Daher werden Fragmente des Mel-28 Proteins für eine Antikörper Synthese und spätere Antikörperreinigung verwendet. Bereits in der Arbeitsgruppe vorhanden sind unterschiedliche Kaninchen Seren, die nach Immunisierung mit einzelnen MEL-28 Fragmenten erhalten werden. Für die Experimente wird der Antikörper ausgewählt, dessen Produktion durch Immunisierung im Kaninchen am besten funktioniert hat. Im Aminosäureabgleich der einzelnen Antigenregionen von *X. l.* Mel-28 und *H. s.* MEL-28 konnte der Aminosäureabschnitt 1602 bis 2120 mit einer Identitätsübereinstimmung von 26 % identifiziert werden. Einige Abschnitte sind dabei fast identisch in der Übereinstimmung zur menschlichen Aminosäuresequenz. Mit GST-Tag ergibt sich ein Proteinfragment von ca. 80 kDa. Bei der Proteinexpression zeigt die Kontrolle im Coomassie-Gel hingegen ein verändertes Migrationsverhalten von knapp 100 kDa (**Abbildung 9 a** oben). Eine spätere Analyse im Western Blot identifiziert das Protein auf entsprechender Position (**Abbildung 9 a** unten; anti-GST). Die aus dem Serum gewonnenen Antikörper werden im BSA-Vergleich mit einer Konzentration von 300 ng/ μ l bestimmt (**Abbildung 9 b**). In einer Immunpräzipitation von Mel-28 ist eine Anreicherung des Mel-28 an den entsprechenden Beads nachgewiesen (**Abbildung 9 c**). Im XEE zeigt sich im Vergleich zur IgG Kontrolle eine klare Reduktion des Mel-28 in der Gesamtproteinfraktion.

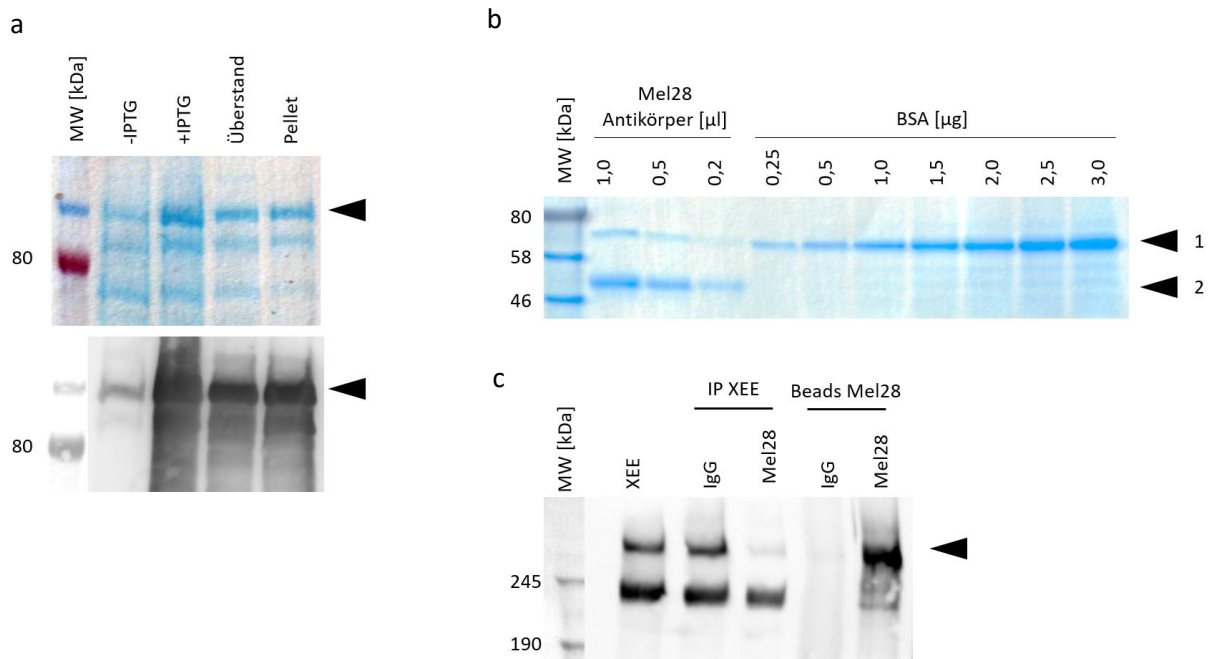


Abbildung 9: Antigenexpression, Konzentrationsbestimmung, Antikörperreinigung und Depletionstest in XEE von Mel-28
a Coomassie-Gel und Western Blot (anti-GST rabbit) des rekombinant exprimierten Antigens von Mel-28 Proteinfragment (~100 kDa) in *E. coli*. Induktion mit 1 mM IPTG. Nach der Bakterienlyse durch Ultraschall befindet sich das exprimierte Protein zur Hälfte im Überstand. **b** Konzentrationsbestimmung der aus dem Serum mit Hilfe des Antigens (a) gereinigten Antikörper (Pfeil 2) 300 ng/µl, Konzentrationsbestimmung durch BSA Vergleich (Pfeil 1). **c** Western Blot, Depletion von Mel-28 aus dem XEE zur Kontrolle IgG Depletion. Mel-28 wird aus dem XEE depletiert. Das depletierte Mel-28 wird an den Beads nachgewiesen.

Untersuchungen in der Immunfluoreszenz zeigen verteilt über die Mitosestadien unterschiedliche Lokalisationen des Mel-28 (**Abbildung 10 a**). In der Interphase und der frühen Prophase wird das Signal wie erwartet am Zellkern lokalisiert. Nach dem Zerfall der Zellkernmembran geht das Signal räumlich von Zentromeren und den Chromosomen aus. Es ist bekannt, dass MEL-28 im Rahmen der Segregation des genomischen Materials während der Mitose in den Kinetochoren angelagert wird. Am besten zu sehen ist dies in den Immunfluoreszenzen kurz bevor die MT sich zu den bipolaren Spindeln hin verkürzen.

Die quantitative Auswertung der γ -Tubulin Signale ergibt an den bipolaren Spindeln signifikante Änderungen über den Verlauf der Mitose in jedem Stadium im Vergleich zur Interphase (**Abbildung 10 b**). Die ermittelten Signalverteilungen der γ -Tubulin Kontrolle entspricht denen der Kontrolle zu Sec23A und anderen untersuchten Proteinen. Die quantitativen Untersuchungen der Mel-28 Signale zeigen ebenfalls signifikante Änderungen im Verlauf der Mitose. Im Vergleich zur Interphase nimmt die Signalintensität von Mel-28 in der Prophase zu. Mel-28 ist in der Interphase sowie frühen Prophase am NPC lokalisiert. Erst mit der Disassemblierung der Zellkernhülle delokalisiert das Mel-28. In der Prometaphase formiert sich Mel-28 an den Kinetochoren. In der Metaphase ist im Vergleich zur Interphase ein signifikanter Signalverlust des Mel-28 Signals an den gegenüberliegenden Spindelpolen

zu verzeichnen. Es werden nur Signalintensitäten in unmittelbarer Nähe des γ -Tubulin Signals sowie Teilüberlagerung mit den Kinetochoren gemessen. Ein Rückgang des Signals lässt daher nur direkte Rückschlüsse auf den genannten Bereich zu. Das Mel-28 Signal verlagert sich unter dem Mikroskop sichtbar in die Kinetochore der Chromosomen und wird aus diesem Grund auch nicht gemessen (**Abbildung 10 a**). Nach maximaler Verkürzung der MT ist weiterhin die signifikant reduzierte Signalintensität bis zum Ende der Anaphase zu beobachten.

Nach den hier vorgestellten Ergebnissen ist eine Reduktion des Mel-28 Signals über die Mitose vermutlich durch die Anlagerung des Proteins an die Kinetochore zu beobachten. Es bleibt jedoch die Frage offen, ob auch kleine Mengen von Mel-28 als Aktivator des γ -TuRC dienen können. Um dies zu überprüfen muss ein Aktivitätstest mit Mel-28 durchgeführt werden. Am besten eignet sich hierfür das XEE. Der Versuchsansatz im XEE darf bei einer Mel-28 Nukleator Abhängigkeit im depletierten Extrakt keine Aktivität mehr zeigen. D. h. im Δ Mel-28 XEE bleibt die MT-Asterbildung nach der Zugabe von RanGTP Q69L aus. Um eine Aktivierung von Mel-28 nachzuweisen kann ein Teil der Mel-28 gekoppelten Beads zu einem späteren Zeitpunkt in das depletierte XEE zurückgegeben werden. Ist Mel-28 der mögliche Aktivator, so kann es zur gesteigerten Ausbildung von MT kommen.

Um die Bedeutung von Mel-28 in der Mitose genauer zu analysieren wird die Funktion des Proteins in XEE betrachtet (**Abbildung 11**). Der Fokus liegt hierbei nicht auf den Kinetochoren sondern auf dem Nukleator der MT. Hierfür wird vorab das XEE entsprechend 10.11 mit IgG- (Kontrolle) und MEL-28-Antikörpern depletiert (**Abbildung 9 c**). Zunächst erfolgt ein Funktionstest mit 20 μ M RanGTP Q69L, der nach 25 min ausgewertet wird. Sowohl in der Kontrolle wie auch im Mel-28 depletierten Extrakt zeigt sich eine unveränderte Aktivität des Extraktes (**Abbildung 11**). Um dennoch die Auswirkung von Mel-28 im XEE zu testen werden im weiteren Verlauf werden 0,5 % der jeweiligen aus der Depletion gewonnen Beads in den XEE zurückgegeben (abweichend zu Kapitel 10.11.1). Mel-28 als Aktivator könnte hier im Vergleich zur Kontrolle für eine gesteigerte MT Assemblierung verantwortlich sein. Ohne die Zugabe von RanGTP Q69L zeigen weder die Bead-Kontrolle noch das Δ Mel-28-Extrakt mit Mel-28 Beads Ausbildungen von MT-Strukturen (**Abbildung 11**). Gibt man zu den jeweiligen Proben 20 μ M RanGTP Q69L, so bilden sich Tubulinaster aus. Diese sind jedoch nicht an den Beads assoziiert und unterscheiden sich nicht in der Anzahl (**Abbildung 11**).

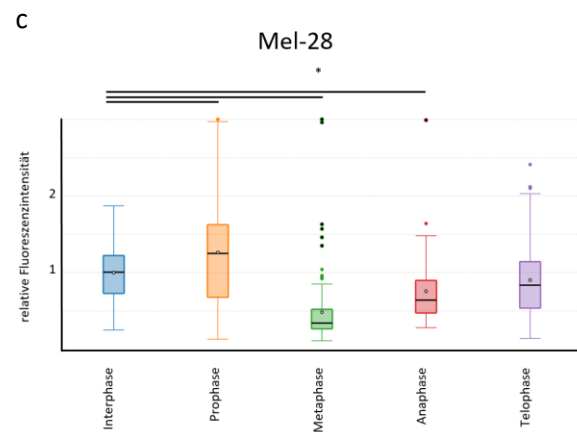
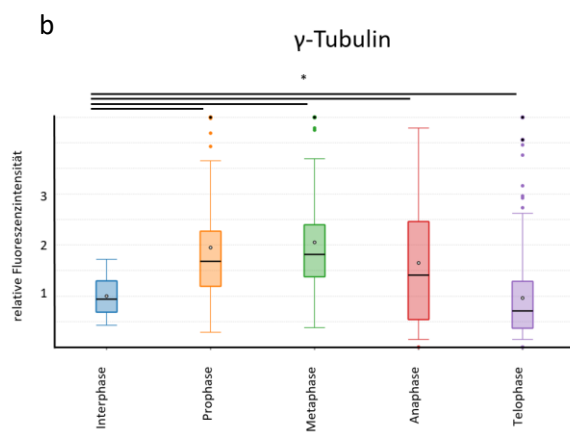
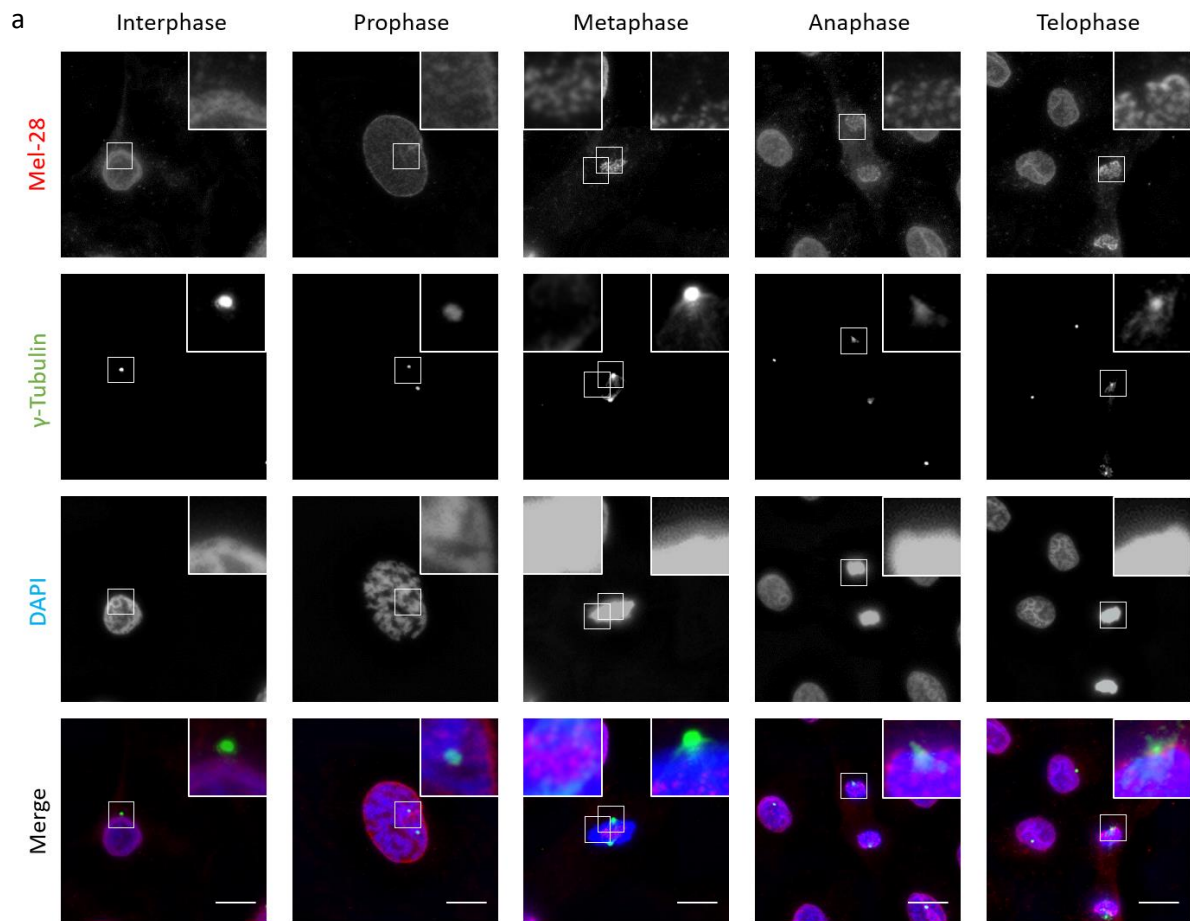


Abbildung 10: Immunfluoreszenz und quantitative Auswertung von γ -Tub und Mel-28 über die Mitose

a Exemplarische Immunfluoreszenzen (XL177 Xenopus Zellen Methanol fixiert) von Mel-28 (rb) und γ -Tubulin (ms) der in **b** und **c** quantitativen Auswertung. **b** Quantifizierung des γ -Tubulin Signalintensitäten (aus **a**) in den verschiedenen Stadien des Zellzyklus. Die Mitosestadien sind normalisiert auf die Interphase. Alle Mitosestadien sind im Vergleich zur Interphase signifikant. **c** Mel-28 Quantifizierung in den Mitosestadien. Zur normierten Interphase sind die Prophase, Metaphase und die Anaphase signifikant. (Keyence BZ-X800, 60 x Vergrößerung, Maßstab 10 μ m; Student's t-Test, two tailed, $p^* < 0,00625$; Anzahl der Proben vgl. **Tabelle 8**)

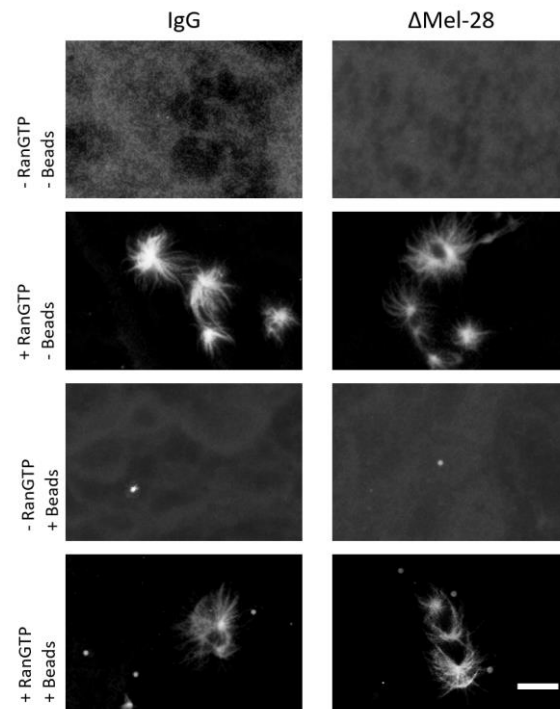


Abbildung 11: Funktionstest in Mel-28 Immundepletierten XEE

Funktionstest einer Mel-28 Immundepletion in XEE (Kontrolle IgG). Nach 25 Minuten Inkubation +/- RanGTP (20 μ M) zeigen sich in beiden + RanGTP Proben Asterstrukturen. Bei einer Injektion der bei der Depletion verwendeten IgG/Mel-28 Beads (0,5 %) bilden sich ohne RanGTP keine Strukturen aus. Erst durch Zugabe von 20 μ M RanGTP kommt es zur Entstehung von Mikrotubuliaster. Der Nukleationsursprung ist weder bei der Kontrolle noch bei der Δ Mel-28 an den Beads assoziiert.

Im Mel-28 depletierten XEE kommt es durch die Zugabe von RanGTP Q69L zu Ausbildung von A stern. Bei Zurückgabe von Mel-28 (Beads) bleibt die Ausbildung von MT aus. In der Kombination beider Proteine bilden sich ebenfalls MT-Aster aus (Wilde und Zheng 1999). Die Ergebnisse aus den Mel-28 depletierten Versuch lassen rückschließen, dass Mel-28 nicht als essentieller Aktivator des γ -TuRC fungiert. Ein weiterer möglicher Aktivator ist CDK5RAP2, welches eine bereits vorhandene Bindestelle am γ -TuRC hat.

8.5 CDK5RAP2 als bekanntes assoziierendes Protein direkt am γ -TuRC und möglicher Aktivator der Nukleation

Die bereits zum Teil bekannten Untersuchungen von CDK5RAP2 im humanen System sollen auf das *X. l.* System ausgeweitet werden. Ziel ist, Cdk5rap2 mit der beinhaltenden CM1 Region in der Rolle eines Aktivators des γ -TuRC weiter zu untersuchen. Annotiert ist nach aktuellen Datenbanken das *X. l.* Cdk5rap2 Protein beginnend mit der CM1 Region (**Abbildung 12 a & Abbildung 13 a**). Unklar ist jedoch, ob es wie beim *H. s.* CDK5RAP2 eine der CM1-Region vorangestellte Aminosäuresequenz gibt. Bei der Analyse der *X. l.* Cdk5rap2 RNA wird eine entsprechende Sequenz gefunden, die sich auch in einer cDNA Synthese mit anschließender Sequenzierung bestätigte. Auch diese Fragmente werden mit in die Untersuchungen als möglicher CDK5RAP2 Aktivator des γ -TuRC mit einbezogen (**Abbildung 12**). Analog zu den bekannten Versuchen rund um die Mutation F75A in *H. s.* in der CM1 Domäne wird durch einen Aminosäureabgleich im *X. l.* System die Aminosäurestelle F16 identifiziert. Die Stelle F16 wird im weiteren Verlauf zu F16A mutiert (**Abbildung 12**). Um den möglichen aktiven Teil des N-terminalen Cdk5rap2 zu identifizieren wird das N-terminale Cdk5rap2 *X. l.* entsprechend der humanen Proteinvarianten bis in den CM1-Bereich verkürzt.

8.5.1 Synthese rekombinanter Proteine und Antikörper Produktion von Cdk5rap2

Für Funktionsexperimente im XEE, Nukleationsversuche und die Produktion von Antikörpern, werden verschiedenste Cdk5rap2 Proteinfragmente benötigt. Dafür werden die in **Abbildung 12** beschrieben Proteinfragmente von Cdk5rap2 aus *X. l.* nach dem Protokoll der Proteinexpression 10.9 rekombinant in BL21 RosettaTM(DE3) hergestellt und gereinigt. Als Beispiel wird die Synthese des WT 1-139 N-terminalen Proteinfragments beschrieben. Die **Abbildung 13 b** zeigt das rekombinante Protein WT 1-139 N-terminal auf einem Coomassie Gel. Durch Induktion mittels IPTG wird das Protein exprimiert. Nach Aufschluss der Bakterien mittels Ultraschall und anschließender Zentrifugation befindet sich das Protein in Einschlusskörperchen, im Pellet (inclusion bodies). Der Überstand ist frei vom synthetisierten Protein. Ein Grund für den Einschluss von Proteinen ist die unphysiologisch hohe Konzentration des Proteins bei der Synthese oder Missfaltung. Für verschiedene Experimente, Versuche und die Antikörpersynthese bedarf es Proteine die ihre natürliche dreidimensionale Form und nicht in inclusion bodies eingeschlossen.

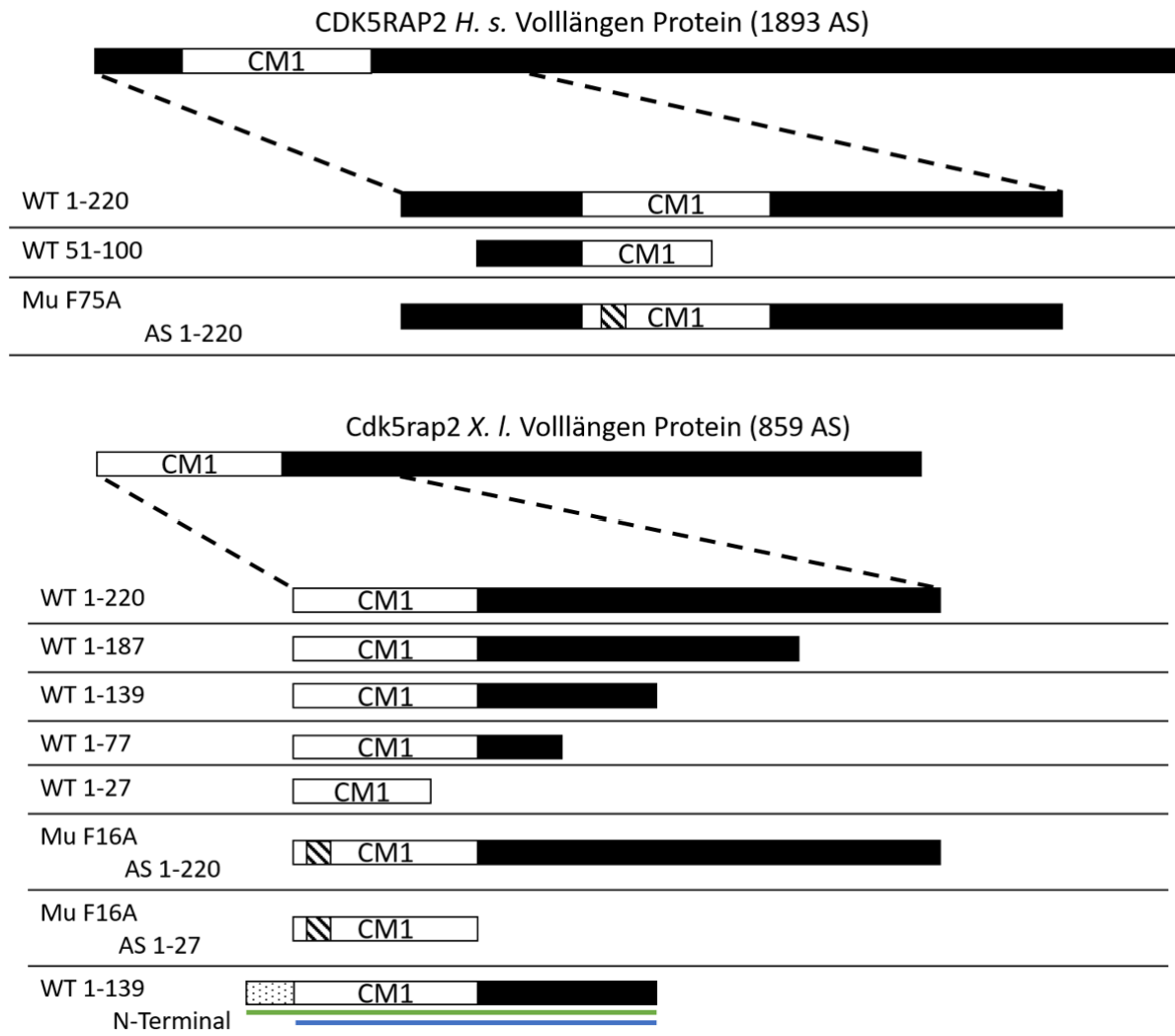


Abbildung 12: schematische Darstellung der rekombinante Proteinfragmente +/- Mutationen von CDK5RAP2 aus *H. s.* und *X. l.*

rekombinante Proteinfragmente (*X. l.* & *H. s.*) auf Grundlage des jeweiligen Volllängenproteins. Die CM1 Domäne ist in weiß dargestellt, die mutierte Stelle ist schwarz gestreift. Nicht annotierte, N-terminale verlängerte Bereiche sind gesprenkelt dargestellt. Der grün WT 1-139 N-terminale (Seramun) und der blau WT 1-139 (David) markierte Bereich kennzeichnen den Bereich das zur Immunisierung verwendete Proteinfragments.

Das heißt, dass die inclusion bodies aufgeschlossen werden müssen (10.9.2). Durch die in 10.9.2 beschriebene Methode wird durch Denaturierung mittels SDS das Protein aus den inclusion bodies herausgeholt. Anschließend erfolgt die schonende Elution des Proteins durch Elektrophorese aus dem Gel über Nacht. Ein direkter Vergleich mit definierten Konzentrationen an BSA ergibt eine Konzentration von 200 μ M (**Abbildung 13 c**). Das WT 1-139 N-terminale Proteinfragment ist das einzige Proteinfragment, das sich in inclusion bodies anreichert. Alle anderen Cdk5rap2 Fragmente befinden sich im Überstand. Neben der Immunisierung in den Kaninchen werden die Proteinfragmente zur Kopplung, anschließenden Reinigung der Seren und für Funktionsexperimente verwendet (10.10.1).

Im Anschluss wird das Proteinfragment WT 1-139 (**Abbildung 13 a** blau) an die Firma Davids Biotechnologie GmbH und das Proteinfragment WT 1-139 N-terminal (**Abbildung 13 a** grün) an die Firma Seramun Diagnostica GmbH geschickt.

Beide Firmen stellen die Antikörper nach ihren etablierten Protokollen in jeweils zwei Kaninchen her. Nach der finalen Immunisierung werden die Seren zur weiteren Verarbeitung in unser Labor versendet. Zur Kontrolle dienen Serumproben der Kaninchen, die vor der Immunisierung den Tieren entnommen werden. Die Kontrolle und das immunisierte Serum werden zum Vergleich vor der Affinitätsreinigung im Western Blot mit XEE sowie der Immunofluoreszenz in XL177 Zellen getestet.

Die produzierten Antikörper des Antigen WT 1-139 weisen eine weniger hohe Spezifität in der Immunofluoreszenz auf, als die gegen das Antigen WT 1-139 N-terminal. In den weiteren Versuchen wird daher ausschließlich der spezifischere, affinitätgereinigte Antikörper gegen die Antigensequenz WT 1-139 N-terminal verwendet. Die Aufreinigung der Antikörper erfolgt mittels Affinitätschromatographie gegen das jeweils zur Immunisierung verwendete Proteinfragment (10.10.1). Die so gewonnenen Antikörper werden erneut zunächst im XEE getestet (**Abbildung 13 d**). Sowohl die Antikörper gegen das Antigen WT 1-139 N-terminal aus Serum 1, wie auch die aus Serum 2, gewonnenen Antikörper zeigen im Western Blot im XEE eine spezifische Bande bei etwa 100 kDa. Die errechnete Größe für Cdk5rap2 liegt für die bekannte, annotierte Sequenz bei 92 kDa, bzw. mit N-terminalem Zusatz bei 98 kDa. Eine Doppelbande ist nicht zu erkennen, sodass zunächst von einer einzigen Isoform ausgegangen wird. Da der im Serum produzierte und später gereinigte Antikörper im Western Blot ein eindeutiges Signal zeigt, wird als nächstes die Effektivität in der Immunofluoreszenz getestet.

a

CDK5RAP2 X.l. (Prognose)	MVGS-HDRDVRSPFRI--GTSRY--RWPIWVPSASRIKSLGFIAIEFSANERA AVNRACT	55
CDK5RAP2 X.t.	-----	0
CDK5RAP2 H. s.	MMDLVLEEDVT-VPGT LSGCSGLVPSVPDDL DGINPNAGLGNLLEPNVSEETVSPTRARN	59
CDK5RAP2 X.l. (Prognose)	<u>MKDFEKQIAELKKNFNKLRIFYLEEQQQKCDNSS ELYRMNIELKVELET SKHDLQE</u>	115
CDK5RAP2 X.t.	<u>MKDFEKQIADLKKENFNKLRIFYLEEQQQKCDSSNEDLYRMNIELKVESETLKHDLQE</u>	60
CDK5RAP2 H. s.	<u>MKDFENQITELKKENFNKLRIFYLEERMQQEFHGPTEHIYKTNIELKVEVESLKRLEQE</u>	119
	*****:*.::*****:*****:*.::*. . .*:*: ***** *: *:***	
CDK5RAP2 X.l. (Prognose)	<u>KQHLLIKASKALENLAENRSKILQMKEDFNKNLQALEFELNQKISVLEKEVLTANE EAD</u>	175
CDK5RAP2 X.t.	<u>KQHLLIKASKALENLAGENEFKMIQVKEDCNKNLQSL EYELNRKISVLEKEVATANE EAD</u>	120
CDK5RAP2 H. s.	<u>REQLLIKASKAVESLAEAGGSEIQRVKEDARKKVQV EDLLTKRILLLEKDVTAQAEELE</u>	179
	:::*****:*.** . ::::** *.:* * *.:* * :*: * :*: * :*	
CDK5RAP2 X.l. (Prognose)	<u>KIAELLDQEREQRFALESKVLDCQA-----LYSTLGERARTIENGNPHLNSKDS SVVQ</u>	228
CDK5RAP2 X.t.	<u>KIAQLLDQERKQSALENKPLAV-----SILCERGR TIENENRYLNSKESVS-</u>	168
CDK5RAP2 H. s.	<u>KAFAGTETEKALRLRLESKLSMKMHEGLMALVLEKDR LIEELKLSLKSKEALIQC</u>	239
	* : * : * ** * * * : * * * * : * : * : *	
CDK5RAP2 X.l. (Prognose)	<u>FESQMSGCERCKKYLIQKDLGMDLS-PSDQKSGVLDQ-NEIPE DSDHIACDLQSKLDD</u>	286
CDK5RAP2 X.t.	<u>LESQ----ISVTNYLIQKDDLGMDDL SFSHEKSGVDLVQ-NDISEDAHNVASDLQIKLDH</u>	223
CDK5RAP2 H. s.	<u>LKEEKSQ-MACPDENV S-----SGELRGLCAAPREKERE TEAAQMEHQKERN S</u>	287
	::: . . . * : * : * : * : * : * : * : *	
CDK5RAP2 X.l. (Prognose)	<u>MEKKISVLQQLGEKEAALV LHEENAVKRDKTIQGLTLALKNKEEHRKFD----FKTG</u>	342
CDK5RAP2 X.t.	<u>MEKKISELQELREKETELALHEENAVKRDKTIQGLTLALKNREKEEQRTKY----LRTS</u>	279
CDK5RAP2 H. s.	<u>FEERIQALEDLREKEREIATEKKN SLKRDKAIQGLTMALKSKEKKEVEELNSEIEKLSAA</u>	347
	:::*. *.:* ** * . .:::*****:*****:*****:***:.. : .:	

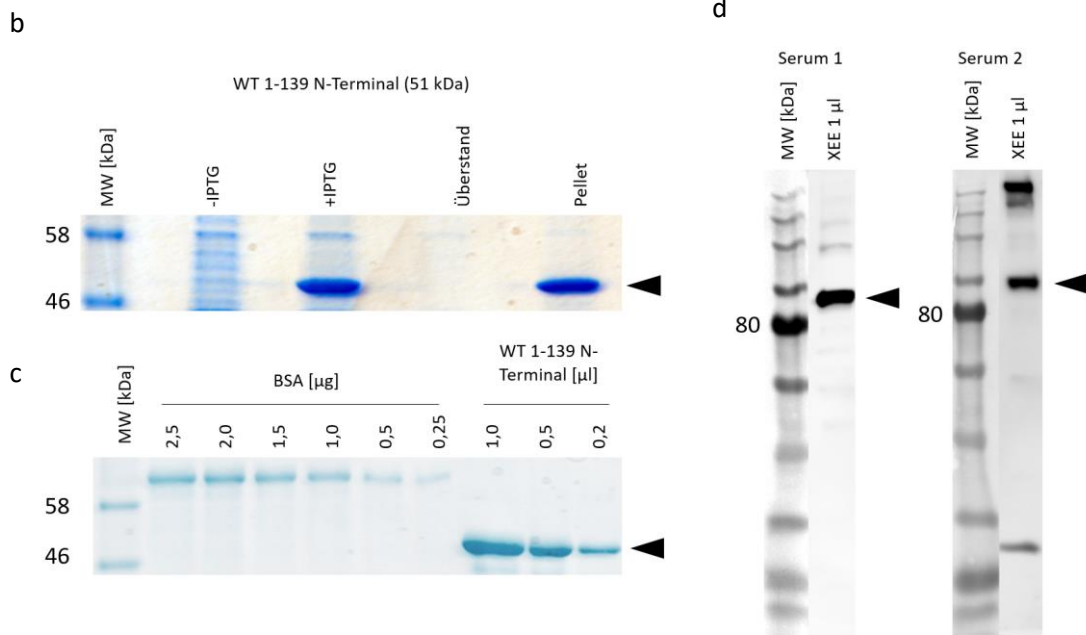


Abbildung 13 Antikörpersequenz, Proteinexpression und Antikörpertest im WB von Cdk5rap2

a Teilsequenz des Cdk5rap2 *X. l.* (mit zusätzlichen N-terminus) im Vergleich mit der annotierten Sequenz von *X. l.* und *H. s.* Der grün WT 1-139 N-terminale (Seramun) und der blau WT 1-139 (David) markierte Bereich kennzeichnen den Bereich das zur Immunisierung verwendete Proteinfragments. (* = identische AS; := Übereinstimmung der physikalische/chemische Eigenschaften hoch; := Übereinstimmung der physikalische/chemische Eigenschaften schwach ausgeprägt, unterstrichen ist die CM1 – Region) **b** Cdk5rap2 WT 1-139 N-terminale Proteinsynthese (grüne Sequenz). Expressionsproben vor- und nach Induktion mit IPTG sowie Proben aus Überstand und Pellet, dargestellt in einer Coomassiefärbung. **c** Aus Einschlusskörperchen gereinigtes Proteinfragment in unterschiedlichen Mengen zum Konzentrationsvergleich direkt mit definierten Mengen an BSA. **d** Gereinigte Antikörper (Seramun) aus Kaninchen 1 (Serum 1) und Kaninchen 2 (Serum 2) zum Test in XEE.

8.5.2 Validierung des *X. l.* Cdk5rap2 Antikörper durch spezifische Immunfluoreszenzfärbungen

Die Spezifität des Cdk5rap2 Antikörpers gegen das Antigen WT 1-139 N-terminal wird bereits im Western Blot (10.19) bestätigt. Um auch eine quantitative Auswertung des neuen Antikörpers in der Immunfluoreszenz vornehmen zu können muss dieser auch in der Zellkultur validiert werden. Zur Validierung des Cdk5rap2 Antikörpers werden verschiedene Zentrosomen-assoziierte Proteine in Kofärbungen untersucht (**Abbildung 14**).

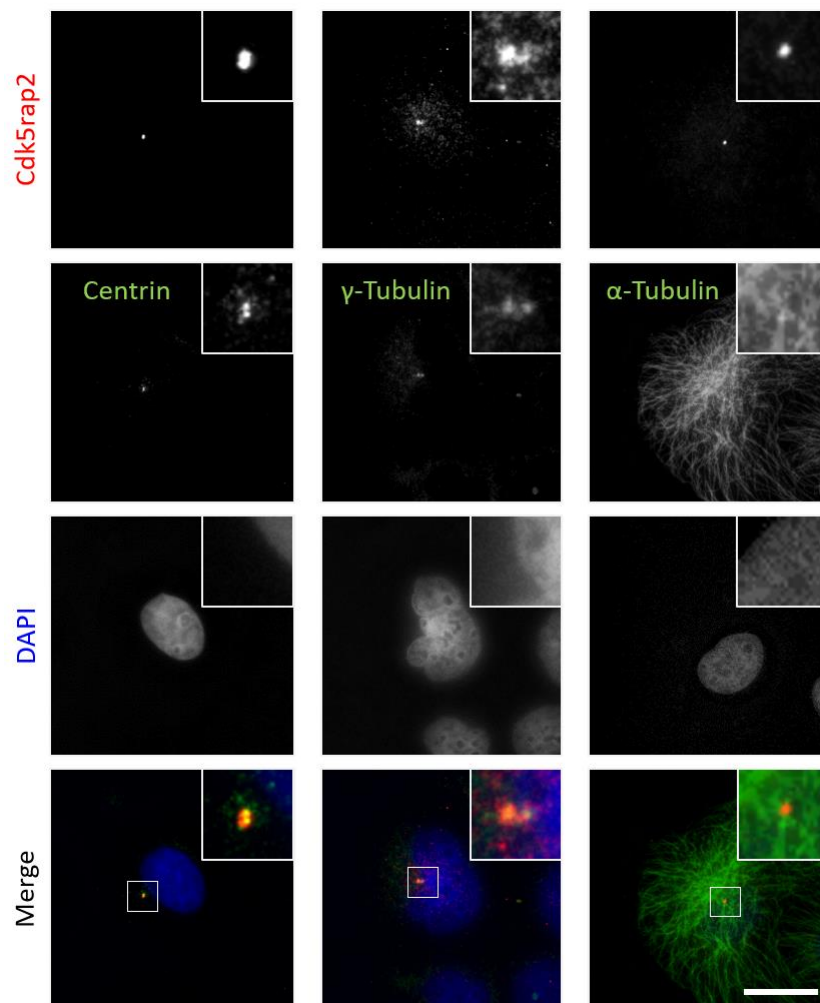


Abbildung 14: Validierung des neuen Cdk5rap2-Antikörper in der Immunfluoreszenzfärbung mit zentrosomalen Proteinen und α -Tubulin

Der synthetisierte Cdk5rap2 Antikörper gegen das Antigen WT 1-139 N-terminal (rb) (affinitätsgereinigtes Serum 2) in der Immunfluoreszenz bei XL177 Zellen (methanolfixiert) in Kofärbung mit Centrin, γ -Tubulin und α -Tubulin, Methanol fixiert. In der Kofärbung mit γ -Tubulin sind schwache Signale im Bereich des Cytoplasmas zu erkennen. Das stärkste Signal geht jedoch von einer klaren zentrosomale Assoziation von CDK5RAP2 aus. (Keyence BZ-X800, 60 x Vergrößerung, Maßstab 10 μ m).

Die **Abbildung 14** zeigt den affinitätsgereinigten Antikörper aus Serum 2 gegen das Antigen WT 1-139 N-terminal in der Immunfluoreszenz. Gefärbt werden Methanol fixierte XL177 Zellen. Der verwendete Cdk5rap2 Antikörper bestätigt in allen Kofärbungen eine Spezifität. Klar zu erkennen ist eine

Kolokalisation von Cdk5rap2 mit Centrin. Centrin lagert sich an den Zentriolen an und zeigt somit zwei klare Lokalisationen in der Färbung (7.1.3 & 8.1). Entsprechend verhält es sich in der Kofärbung mit γ -Tubulin. γ -Tubulin ist im γ -TuRC organisiert, der sich in der PCM befindet. Cdk5rap2 zeigt wie erwartet eine charakteristische Lokalisation in der Region des γ -TuRC. Um den Cdk5rap2 Antikörper weiter zu spezifizieren wird dieser in Kombination mit α -Tubulin getestet. Das Tubulin Cytoskelett zeigt sich durch die Markierung mit α -Tubulin Antikörper und Alexa Fluor 488. Neben einem spezifisch zu erkennendem Spot im Bereich des Zellkerns sind keine weiteren Hintergrundsignale in der Zelle oder entlang der MT zu erkennen. Daher kann davon ausgegangen werden, dass der Antikörper spezifisch das Cdk5rap2 Protein erkennt. Der affinitätsgereinigte Cdk5rap2 Serum 2 Antikörper gegen das Antigen WT 1-139 N-terminal zeigt ein spezifisches Signal in den zu erwartenden Zellregionen und ist damit erfolgreich validiert.

Durch den neuen und *X. l.* spezifischen Cdk5rap2 Antikörper können nun unterschiedlich Funktionen eines möglichen Cdk5rap2 Aktivators in Zusammenhang mit dem γ -TuRC genauer betrachtet werden. Es bleibt zunächst die Frage offen, ob der *X. l.* spezifische Cdk5rap2 Antikörper auch im humanen System funktioniert. Dazu wird zunächst die Spezifität und Sensitivität des CDK5RAP2 Antikörpers auch in humanen IMR Zellen analysiert.

8.5.3 Qualitative Analyse des CDK5RAP2 Antikörpers in humanen Zellen

Ein Teilvergleich der antigenen Sequenzen aus *X. l.* und *H. s* ist in **Abbildung 13 a** gezeigt. Zu beachten ist die hohe Konservierung der CM1-Domäne (**Abbildung 13 a** unterstrichender Bereich). Da über die CM1 Region hinaus auch die beiden Sequenzen des N-terminalen Abschnitts in einigen Bereichen identisch sind, wird die Spezifität des CDK5RAP2 AK im humanen System am Beispiel von IMR Zellen und unterschiedlichen Mitosestadien untersucht.

Während der gesamten Zellteilung bei IMR Zellen werden CDK5RAP2 und γ -Tubulin in Kolokalisation detektiert. In der Inter- und Prophase befindet sich das CDK5RAP2/ γ -Tubulin Signal in den IMR Zellen immer in unmittelbarer Nähe des Zellkerns (**Abbildung 15**). Somit ist das IMR Immunfluoreszenzsignal in der Interphase vergleichbar mit dem in *Xenopus* XL177 Zellen. Im weiteren Verlauf positionieren sich die Signale an den Spindelpolen (Meta- und Anaphase). Beide Signale werden kolokalisiert. Das CDK5RAP2 Signal scheint in der Interphase die höchste Intensität zu haben. Sobald sich die Kernlamina neu formiert hat lokalisiert sich das Signal wieder im Bereich des Zellkerns. Die Spezifität beider Antikörper in IMR Zellen zeigt zunächst, dass der *X. l.* spezifische Cdk5rap2 Antikörper auch im humanen System funktioniert. Eine weitere Erkenntnis ist, dass CDK5RAP2 auch in den humanen Zellen

am Zentrosom lokalisierbar ist. Gleichzeitig lässt sich feststellen, dass die Antigensequenz des neu generierten Cdk5rap2 Antikörpers eine hoch konservierte Aminosäureregion abdeckt.

Bereits in den IMR-Färbungen zeigt das CDK5RAP2 Signal unterschiedliche Intensitäten. Um eine spätere Analyse im *X. l.* System zuzulassen, wird analog den zu Sec23, Nme7 und Mel-28 eine entsprechende Koimmunfluoreszenzfärbung in mitotischen XL177 Zellen vorgenommen und ausgewertet.

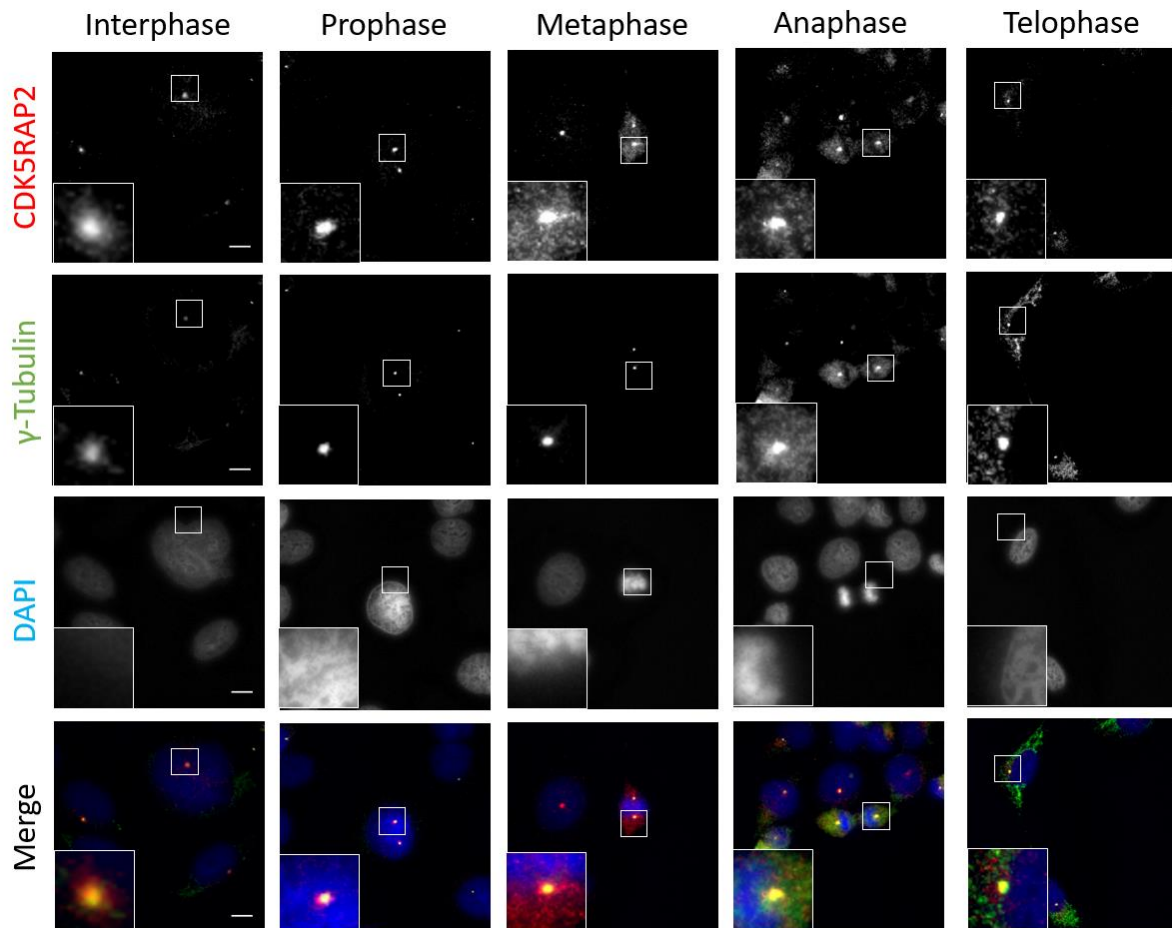


Abbildung 15: Lokalisierung von CDK5RAP2 mit dem *X. l.* spezifischen Cdk5rap2 Antikörper in unterschiedlichen Phasen der IMR-Zellen

Das CDK5RAP2 Signal zeigt in allen Zellzyklusstadien eine Kolokalisation mit γ -Tubulin. In der Prophase sind beide Signale am Zellkern lokalisiert. In der Metaphase und Anaphase befinden sich die Signale im Bereich der bipolaren Spindeln. In der Telophase ist das CDK5RAP2 Signal zwar noch γ -Tubulin assoziiert, allerdings lässt die Intensität nach. In der Interphase befindet sich das kolokalisierte Signal wieder im Bereich des Zellkerns. (Methanol Fixierung, Keyence BZ-X800, 60 x Vergrößerung, Maßstab 5 μ m).

8.5.4 Cdk5rap2 zeigt während der Zellteilung starke Veränderungen im Bereich der Zentrosomen

In den XL177 Zellen zeigen sich vor der Zellteilung die duplizierten Zentrosomen durch die Detektion von γ -Tubulin und Cdk5rap2 in unmittelbarer Umgebung des Zellkerns.

Mit Beginn der Mitose wandern die Signale zu den Spindelpolen (Prophase) (**Abbildung 16 a**). Danach können die in der PCM befindlichen Proteine Cdk5rap2 und γ -Tubulin eindeutig den zwei gegenüberliegenden MTOCs zugeordnet werden. In der Metaphase nehmen beide Signale an Intensität jeweils zu. Sobald die Aufteilung des genomischen Materials beginnt, scheint sich das Fluoreszenzsignal von Cdk5rap2 und γ -Tubulin im direkten Vergleich zur Prophase und Metaphase zu verringern. Die Intensität des Cdk5rap2 Signals nimmt mit Beginn der Zytokinese weiter ab. Vergleichend bleibt das γ -Tubulin Signal in der Stärke zunächst konstant zur Anaphase. In der darauffolgenden Interphase haben sich die Signalintensitäten beider analysierter Proteine wieder an die Intensität vor der Zellteilung angeglichen (**Abbildung 16 a**). Um genauere Informationen und quantitative Daten zu erhalten werden die Intensitäten der beiden Signale (Cdk5rap2 und γ -Tubulin) gemessen und in vielfacher Anzahl untereinander verglichen. Die Analyse wird analog zu den Proteine Sec23A, Nme7 und Mel-28 durchgeführt.

8.5.5 Immunfluoreszenzfärbungen identifizieren Cdk5rap2 als potenziellen Aktivator des γ -TuRC

Aus der Betrachtung der Immunfluoreszenzfärbungen von Cdk5rap2 und γ -Tubulin lässt sich rückschließen, dass es zu einer Veränderung der relativen Proteinmenge für beide Proteine (γ -Tubulin und Cdk5rap2) kommen kann (8.5.4 & **Abbildung 16 a**). Um diese Feststellung weiter zu vertiefen, werden eine Vielzahl an Proben analog der **Abbildung 16 a** anhand der unterschiedlichen Mitosestadien in der Signalintensität gemessen und quantitativ analysiert.

Die quantitative Auswertung des γ -Tubulin Signals (Kontrolle) weist eine vergleichbare Signalverteilung wie bei den Proben der Sec23A, Nme7 und Mel-28 Untersuchungen auf (**Abbildung 16 b**). Die Signalintensität steigt bis zur Metaphase um das ca. Anderthalbfache an und nimmt dann bis zum Ende der Zellteilung wieder ab (Telophase). Alle untersuchten Mitosestadien sind im Vergleich zur normierten Interphase von der Intensität des γ -Tubulin Signal signifikant verändert. Die quantitative Analyse des Cdk5rap2 Signals im Verlauf der Mitose zeigt einen entsprechenden Signalverlauf. Die auf das Interphase-Signal normalisierten Signale sind in der Prophase, Metaphase und Anaphase signifikant erhöht (**Abbildung 16 c**).

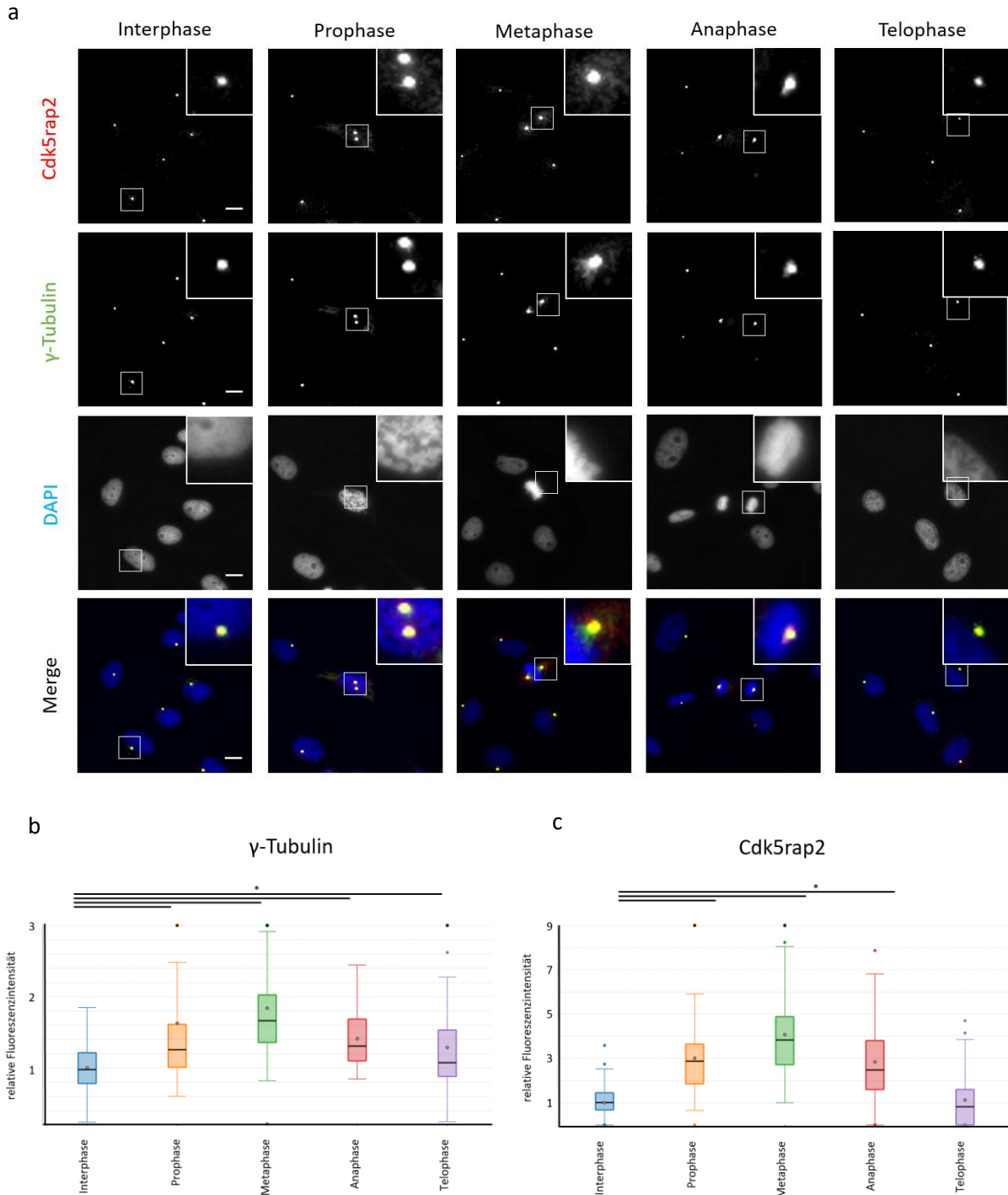


Abbildung 16: Quantifizierung und Identifikation von Cdk5rap2 als Aktivator in den Zellzyklusphasen

a Mit Cdk5rap2 (rb) und γ -Tubulin (ms) gefärbte XL177 Xenopus Zellen (Methanol Fixiert) in unterschiedlichen Phasen des Zellzyklus. In jeder Phase des Zellzyklus ist ein spezifisches Cdk5rap2 und γ -Tubulin Signal zu detektieren. In der Überlagerung (Merge) ist eine Kolokalisation der beiden Signale zu identifizieren. **b** Quantifizierung des γ -Tubulin Signals in den verschiedenen Stadien der Mitose. Die Mitosestadien sind normalisiert auf die Interphase. Das Signal ist in allen Mitosestadien im Vergleich zur Interphase signifikant erhöht. **c** Cdk5rap2 Quantifizierung in den Mitosestadien. Zur normalisierten Interphase sind die Prophase, Metaphase und die Anaphase signifikant erhöht. (Keyence BZ-X800, 60 x Vergrößerung, Maßstab 10 μ m; Student's t-Test, two tailed, $p^* < 0,00625$; Anzahl der Proben vgl. **Tabelle 8**)

Im Detail nimmt die Stärke des Cdk5rap2 Signals in der Prophase um ca. das Dreifache zu. In der Metaphase erreicht die Intensität des Cdk5rap2 Signals fast das Vierfache im Vergleich zur Interphase. In keiner der anderen möglichen Analysen möglicher Aktivatoren wird ein solch starker Intensitätsanstieg beobachtet. In der Anaphase verliert das Cdk5rap2 Signal an Intensität auf das Zweieinhalbfache. Die Signalintensität der Telophase entspricht der späteren Interphase.

Im direkten Vergleich vom γ -Tubulin Signal **Abbildung 16 b** zum Cdk5rap2 **Abbildung 16 c** kann man von einer identischen Signalverteilung während der Zellteilung sprechen. Die Signalstärke des Cdk5rap2 fällt hierbei im normalisierten Vergleich zur Interphase nur um ein Vielfaches intensiver aus. Schlussfolgernd wird zunächst der Fokus auf Cdk5rap2 als Aktivator des γ -TuRC gelegt und weiter untersucht. Um die *in vitro* Ergebnisse in realitätsnahen *in vivo* Versuche zu bestätigen werden *ex vivo* Experimente im XEE durchgeführt. Versuche im XEE stellen eine komplexe Methode dar, welche naturgemäßer näher am lebenden Organismus sind.

8.5.1 Untersuchung des Cdk5rap2 Aktivators in *ex vivo* (XEE) Experimenten (Strategie 1)

Cdk5rap2 wird als Aktivator des γ -TuRC als nächstes in der komplexen Umgebung des XEE untersucht. Für die folgenden Analysen werden nach 10.2 XEE präpariert. Zur genauen Untersuchung eines möglichen Aktivators können zwei Experimente durchgeführt werden.

Nach der Zugabe von Proteinen (10.5) kann die Anzahl der MT-Assemblierungen im Vergleich zur Kontrolle CSF-Puffer verglichen werden. Zu erwarten ist bei einem möglichen Aktivator eine gesteigerte Anzahl an Spindel-Assemblierungen im Vergleich zur Kontrolle (**Abbildung 2**). Zudem sollten sich in Anwesenheit eines Aktivators die Strukturen schneller ausbilden. Gleichmaßen kann die Auswirkung bestimmter Proteinfragmente im γ -Tubulin depletierten Extrakt untersucht werden. Dabei bieten sich unterschiedliche Ansätze an. Zum einem können die nach 10.11 von endogenen Cdk5rap2 depletierten Extrakte untersucht werden. Ist eine Aktivierung und somit MT-Assemblierung, des depletierten XEE im Vergleich zur Kontrolle (negativ CSF Puffer; positiv RanGTP) noch möglich? Zusätzlich können die zur Depletion mit dem spezifischen Antikörper immobilisierten und jetzt Antigen gekoppelten Beads wieder in das behandelte Extrakt zurückgegeben werden. Kommt es unter diesen Umständen wieder zu einer Assemblierung der MT (Rettungseffekt) (10.11.1)? Alternativ können zu dem depletierten Extrakt einzelne Cdk5rap2 Proteinfragmente aus einer rekombinanten Proteinexpression hinzugefügt werden. So bieten sich die in Kapitel 8.5.1 beschriebenen Proteinfragmente, an um die kürzeste Variante eines möglichen Aktivators zu finden. Zusätzlich kann durch einen speziellen Aminosäureaustausch die Funktionalität eines möglichen Aktivators bezogen auf eine bestimmte Region (CM1) beschrieben werden.

8.5.1.1 Die Ausbildung von MT in XEE ist γ -Tubulin abhängig

Bevor die Funktion des Cdk5rap2 Aktivator im XEE genauer untersucht werden kann, sollte zunächst die γ -Tubulin Abhängigkeit in der Ausbildung von MT bestätigt werden. Zu diesem Zweck wird XEE γ -Tubulin depletiert und im Anschluss die Ausbildung von RanGTP Q69L induzierten Astern genauer untersucht.

Abbildung 17 a zeigt die Depletion von γ -Tubulin aus dem XEE im Western Blot. In den γ -Tubulin Depletionen und IgG Kontrollen sind je 0,25 μ l Extrakt aufgetragen. Die einzelnen Immun-Präzipitationsfraktionen von γ -Tubulin zeigen eine Reduzierung des Signals nach dreimaliger Behandlung des XEE. Nach der dritten Behandlung ist kein γ -Tubulin Signal mehr vorhanden. Die Kontrollen zeigen ein vergleichbares γ -Tubulin Signal in den XEE Fraktionen.

Behandelt man die mit Antikörper gekoppelten Beads mit 1 % SDS, so kann man das präzipitierte Antigen (γ -Tubulin) anschließend im Western Blot analysieren. Zusätzlich können Bestandteile des Antikörpers (schwere, leichte Kette) detektiert werden. Ferner werden unspezifische erkannte Proteine aus dem Extrakt gezogen, die auch nach mehrfachen Reinigungsschritten an die Beads gekoppelten Antikörper assoziieren. Nach der ersten sowie zweiten Präzipitation zeigt sich eine Anreicherung des γ -Tubulin in den jeweiligen Beadfraktionen. Nach der dritten Behandlung entspricht die Anreicherung des möglichen Antigens der IgG Kontrolle, d. h. das Signal geht auf das Hintergrundbild zurück. Um ein aussagekräftiges Ergebnis des γ -Tubulin depletierten Extrakts zu bekommen muss dieses folglich zweimal durch γ -Tubulin Beads behandelt werden. Deshalb werden im weiteren Verlauf die XEE dementsprechend behandelt. Das Ergebnis kann jedoch eine gewisse Restaktivität des γ -Tubulin präzipitieren XEE nicht ausschließen, es ist eventuell noch γ -Tubulin vorhanden.

Daher ist nach der erfolgreichen Depletion von γ -Tubulin für den weiteren Versuchsablauf die Funktionalität des XEE mit Blick auf die Ausbildung der MT ausschlaggebend (**Abbildung 17 a**). Um diese zu testen werden die jeweiligen Proben mit 20 μ M RanGTP Q69L für 25 Minuten inkubiert. (7.1.2). Bei einem aktiven, nicht γ -Tubulin depletierten XEE sollten sich MT Asterstrukturen ausbilden. Als Kontrolle wird die Ausbildung von spontanen Astern zunächst ohne die Zugabe von RanGTP Q69L für das jeweilige Extrakt getestet. Nur sehr vereinzelt sind in den mit IgG bzw. γ -Tubulin-Antikörper depletierten Extrakt MT asterähnlichen Strukturen zu erkennen (**Abbildung 17 b**).

Als nächstes werden die jeweiligen Präzipitationsrunden auf ihre Aktivität hin untersucht MT-Aster auszubilden. Um die Funktion zu überprüfen wird RanGTP Q69L in die Proben (γ -Tubulin/IgG) gegeben. Die nach γ -Tubulin Präzipitation in Proteinlevel reduzierten Proben zeigen bereits nach der ersten Behandlung im Vergleich zu den IgG Kontrollen eine verminderte Anzahl an MT-Astern (46:100) (**Abbildung 17 b**). Diese reduzieren sich weiter nach der zweiten Präzipitation (9:99). Nach der dritten

Immunpräzipitation scheint sich die Anzahl der Strukturen im Vergleich zur zweiten γ -Tubulin Depletion angeglichen zu haben (9:17). Das Verhältnis von Strukturen im γ -Tubulin depletierten Extrakt zu IgG (Kontrolle) beträgt nach der dritten Depletion 17:98. Die Auswertung der IgG depletierten Kontrolle weist für alle Depletionen eine konstante Anzahl auf. Im weiteren Verlauf des Versuches wird 1 % der jeweiligen für die Depletion verwendeten Beads in das depletierte XEE zurückgebracht.

Die Auswertung der ersten Depletion mit zurückgebrachten Beads zeigt, dass die γ -Tubulin Beads aus der ersten Depletionsrunde in der Anzahl die meisten Strukturen aufweist (**Abbildung 17 b** erster Pfeil). Die entsprechende IgG Kontrolle weist 85 % weniger Strukturen auf. Gibt man erneut 1 % der Beads aus der zweiten Depletion in die entsprechende Probe, so erhält man immer noch eine erhöhte Anzahl an gebildeten Asten im Vergleich zur IgG Kontrolle (**Abbildung 17 b** zweiter Pfeil). Gibt man die Beads aus der dritten Depletion in die dritte Präzipitation geht unter der Zugabe von RanGTP die Anzahl der Strukturen auf die Anzahl der Kontrolle.

Das Experiment lässt mehrere Rückschlüsse zu. Die Menge an die Beads gebundenes γ -Tubulin nimmt über die aufeinander folgenden Präzipitationsschritte ab. Gibt man einen Anteil der jeweiligen Beads in das behandelte XEE zurück, so bilden sich MT-Aster reduzierend mit der Anzahl der Depletionsrunden aus. Das XEE besitzt noch einen Rest endogenes, nicht gekoppeltes γ -Tubulin (**Abbildung 17 a**), dass mit zur Strukturbildung beiträgt. Diese Menge wird mit jeder weiteren Präzipitationsrunde vermindert.

Weiter bestätigen sich auf diese Weise schon zwei bekannte Beobachtungen. RanGTP Q69L stimuliert die Bildung von MT-Astern. Ferner ist die Bildung der Aster γ -Tubulin abhängig (Gruss, et al. 2001; Wilde und Zheng 1999).

Summa Summarum ergibt sich aus dem gezeigten *ex vivo* Versuch, dass sowohl γ -Tubulin wie auch RanGTP für die Ausbildung von MT-Astern notwendig sind. Der eigentliche Aktivator befindet sich noch im Extrakt und sollte die Anzahl der Strukturen in den Proben je nach Inhibition (Depletion) verringern bzw. nach Stimulation erhöhen.

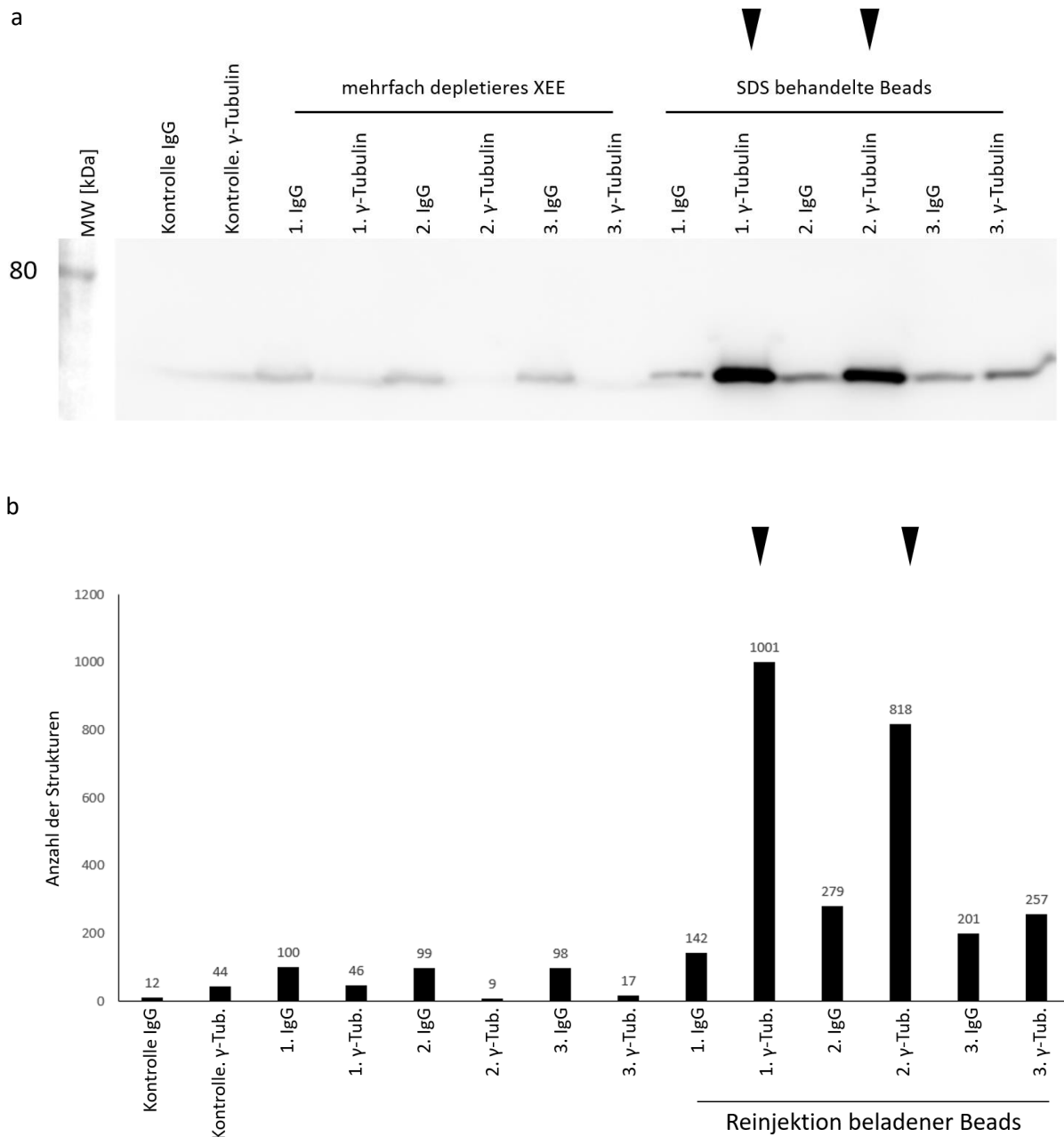


Abbildung 17: Funktionstest in γ -Tubulin in immundepletierten XEE

a Western Blot einer γ -Tubulin Depletion aus XEE (primärer AK γ -Tubulin). Nach drei aufeinander folgenden Präzipitationen ist kein γ -Tubulin Signal mehr nachweisbar (depletierteres Extrakt). Die IgG Kontrollen zeigen für jede Depletionsrunde im XEE die gleiche Signalstärke. Das Signal der γ -Tubulin XEE Proben nimmt mit jeder Immunpräzipitationsrunde ab (je 0,25 μ l Extrakt). Das später von den Beads mit SDS eluierte γ -Tubulin ist nach der ersten und zweiten Präzipitation stark angereichert. Die IgG Kontrolle zeigt ein konstantes Signal von der Hintergrundbindung. **b** XEE mehrfach IgG und γ -Tubulin Antikörper depletiert. Alle Extrakte werden im Anschluss mit 20 μ M RanGTP Q69L behandelt. Funktionsassay: Ausbildung von Asterstrukturen. Einzelnen Proben wird 1 % der vorher zur Depletion vorhandenen Beads zurückgegeben. Ohne entsprechende Zugabe von Beads bilden sich entsprechend weniger Strukturen aus. Nach Zugabe der Beads erkennt man einen eindeutigen Anstieg von vorhandenen Strukturen im γ -Tubulin depletieren Extrakt.

8.5.1.2 Funktionstest verschiedener *Cdk5rap2* Aktivatorfragmente in depletierten XEE

Um *Cdk5rap2* als möglichen Aktivator des γ -TuRC zu verifizieren, werden verschiedene Fragmente des Proteins im XEE getestet. Mittels depletion wird das γ -Tubulin aus dem XEE entfernt (**Abbildung 18**). Die Kontrolle wird im Vergleich IgG behandelt. In den IgG und γ -Tubulin AB depletierten XEE zeigen sich ohne RanGTP Q69L kaum Aster (**Abbildung 18**). Auch nach der Zugabe des Fragmentes *Cdk5rap2* 1-139 ist keine wesentliche Veränderung in der Anzahl der Aster in den beiden Proben zu verzeichnen. Der Aktivator ist somit im XEE abhängig von RanGTP Q69L.

Erst durch das Supplement von 20 μ M RanGTP Q69L bilden sich Aster in den Proben ohne zusätzlichen Aktivator aus. Die mit IgG depletierte Kontrolle (**Abbildung 18** Pfeil 1) zeigt 53 % mehr Strukturen als die γ -Tubulin präzipitierte Probe (**Abbildung 18** Pfeil 2). Eine Restaktivität des depletierten Extraktes scheint demnach in der γ -Tubulin depletierten Probe noch vorhanden zu sein. Durch die Zugabe des *Cdk5Rp2* Fragmentes 1-139, welches die CM1 Sequenz enthält, zeigen beide Proben eine erhöhte MT-Asterbildung (**Abbildung 18**). Erwartungsgemäß kommt es durch eine γ -Tubulin Depletion zumindest Anteilig zu einer Reduktion des γ -TuRC. Nach der Zugabe des Proteinfragments mit CM1 Domäne ist aufgrund des möglichen Aktivators die Anzahl der Strukturen gesteigert. Nach der Zugabe der reinen Katalysatorproteinfrequenz (nur CM1 Domäne) liegt die Erwartung in einer weiter gesteigerten Anzahl der MT. Die Kontrolle verhält sich erwartungsgemäß mit einer vom Grundzustand, ohne Proteinfragmente, bereits ausgeprägten Anzahl an MT.

Die Anzahl der IgG Strukturen fällt somit höher aus als die Anzahl in den γ -Tubulin präzipitierten Extrakten (**Abbildung 18** Pfeil 3 und 4). Die Anzahl der Aster nimmt hier bei der γ -Tubulin depletierten *Cdk5rap2* Probe im Vergleich zur Kontrolle ab (3053 Strukturen zu 1975 Strukturen \sim 35 %). Gibt man in das γ -Tubulin depletierten XEE das kurze Fragment 1-27, welches die CM1 Sequenz enthält, so bilden sich ebenfalls Strukturen aus (**Abbildung 18** Pfeil 5). Das Signal aus der kurzen Sequenz AS 1-27 (3503 Strukturen) übersteigt das aus der verlängerten AS 1-137 (1975 Strukturen) um ca. 25 % (**Abbildung 18** Pfeil 4 und 5). Bei einer Mutation in der CM1 Region reduzieren sich die Strukturen im γ -Tubulin depletierten Extrakt, Fragment AS 1-27 F16A (909 Strukturen) (**Abbildung 18** Pfeil 6). Im Vergleich zum Wildtyp AS 1-27 nimmt die Anzahl der Strukturen ab (ca. 75 %) (**Abbildung 18** Pfeil 5 und Pfeil 6).

Schlussfolgernd lässt sich festhalten, dass unter Zugabe von 20 μ M RanGTP Q69L die einzelnen *Cdk5rap2* Fragmente einen Einfluss auf die Anzahl der gebildeten Strukturen haben. Allgemein gilt, dass bei höherem γ -Tubulin Gehalt im Vergleich zur γ -Tubulin depletierten Probe im Vergleich zur Kontrolle mehr MT-Aster ausgebildet werden. Je nach *Cdk5rap2* Fragment unterscheidet sich die Anzahl der MT-Aster. Zusätzlich ist die CM1 Sequenz ein essentieller Bestandteil in der Funktion der Aktivierung. Mit Blick auf die *Cdk5rap2* Sequenz scheint die Anzahl der Strukturen ohne die F16A Mutation zuzunehmen. Durch eine Mutation in der CM1 Region reduziert sich die Anzahl der Strukturen.

Um einen direkten Einfluss des Cdk5rap2 Aktivators auf den Nukleator zu testen, können auch *in vitro* MT-Nukleations Experimente (Strategie 2) durchgeführt werden (vgl. Liu, et al. 2019).

In reinem Tubulin können die einzelnen Bestandteile wie Aktivator und Nukleator gezielt hinzugefügt und untersucht werden, und die Funktion weiterer Komponenten ist ausgeschlossen. In diesen Versuchen werden nur einige der nach **Abbildung 12** vorhandenen Cdk5rap2 Proteinfragmente untersucht.

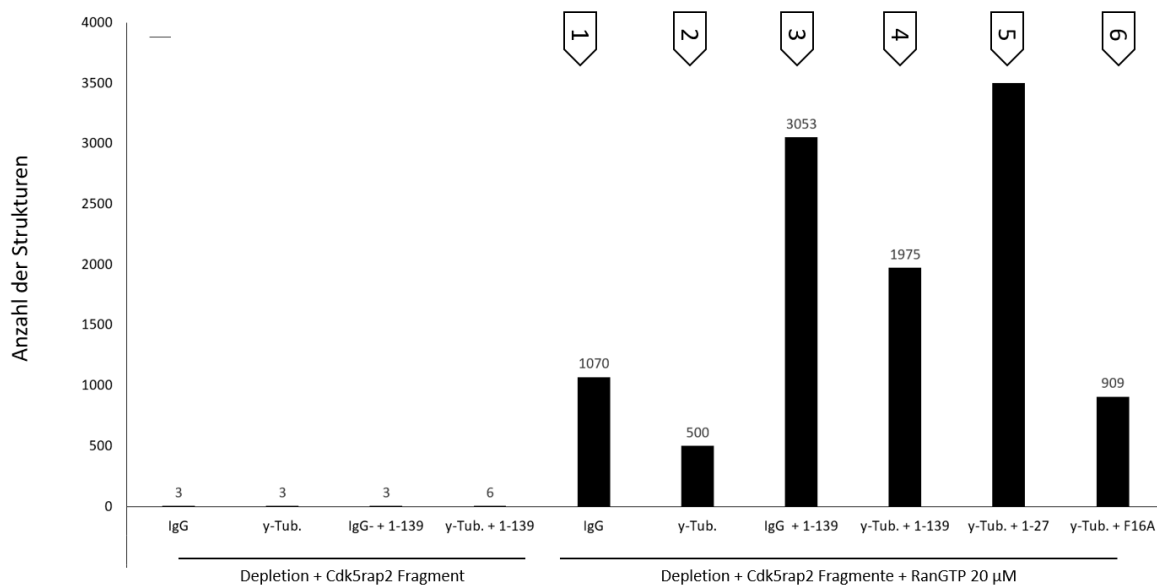


Abbildung 18: Gesteigerte Aktivierung des XEE durch verschieden Cdk5rap2 Aktivatorfragmente

Anzahl der Strukturen im γ-Tubulin/IgG präzipitieren XEE unter der Zugabe unterschiedlicher Cdk5rap2 Fragmente. Ohne RanGTP Q69L bildet sich nur eine geringe Anzahl an Strukturen aus. Nach Zugabe von 20 μM RanGTP Q69L zeigt die IgG Kontrolle im Vergleich zu γ-Tubulin depletierte Probe mehr Strukturen (1 + 2). Im Vergleich der beiden Proben zeigen sich unter Zugabe von RanGTP Q69L & Cdk5rap2 AS 1-139 bei der IgG Probe mehr Strukturen (3 + 4). Bei der Zugabe von RanGTP Q69L & Cdk5rap2 1-27 (5) nimmt die Anzahl der Strukturen weiter zu. Ist die CM1 Domäne mutiert (6), werden weniger Aster gebildet. Die jeweils ausgezählte Stichprobenmenge der in der Summe ausgezählten Deckgläschen beträgt n = 2.

8.6 Einfluss verschiedener Cdk5rap2 Aktivatorfragmente auf die Nukleation

8.6.1 Isolierung des γ -TuRC und zeitabhängige Nukleation durch unterschiedliche Cdk5rap2 Aktivatoren

Die Isolierung vom γ -TuRC aus XEE wird im Kapitel 10.12 und 10.13 beschrieben (Liu, et al. 2019). Neben dem möglichen Aktivator liegt jetzt auch der Nukleator als einzelne Komponente (Komplex) vor und kann in reinem α - und β -Tubulin Dimeren (Tubulin) gezielt untersucht werden. In der Umgebung von gereinigten und Cy3 markiertem Tubulin sollte ein möglicher Aktivator die Polymerisation der MT zusammen mit γ -TuRC aktivieren bzw. stabilisieren. Daher werden in diesen Experimenten einzelne der verschiedenen rekombinanten Cdk5rap2 Proteinfragmente in Kombination mit dem isolierten γ -TuRC in reinem Tubulin inkubiert. Diese Versuche werden als reine *in vitro* Versuche bezeichnet (Strategie 2 **Abbildung 2**).

Zunächst wird der aus XEE isolierte γ -TuRC alleine untersucht. Durch Probenpuffer mit SDS wird der 2,2 MDa große Komplex in seine einzelnen Proteinuntereinheiten aufgespalten. Im SDS-Gel ist das Migrationsverhalten des γ -Tubulin daher wie bekannt bei ca. 48 kDa zu detektieren.

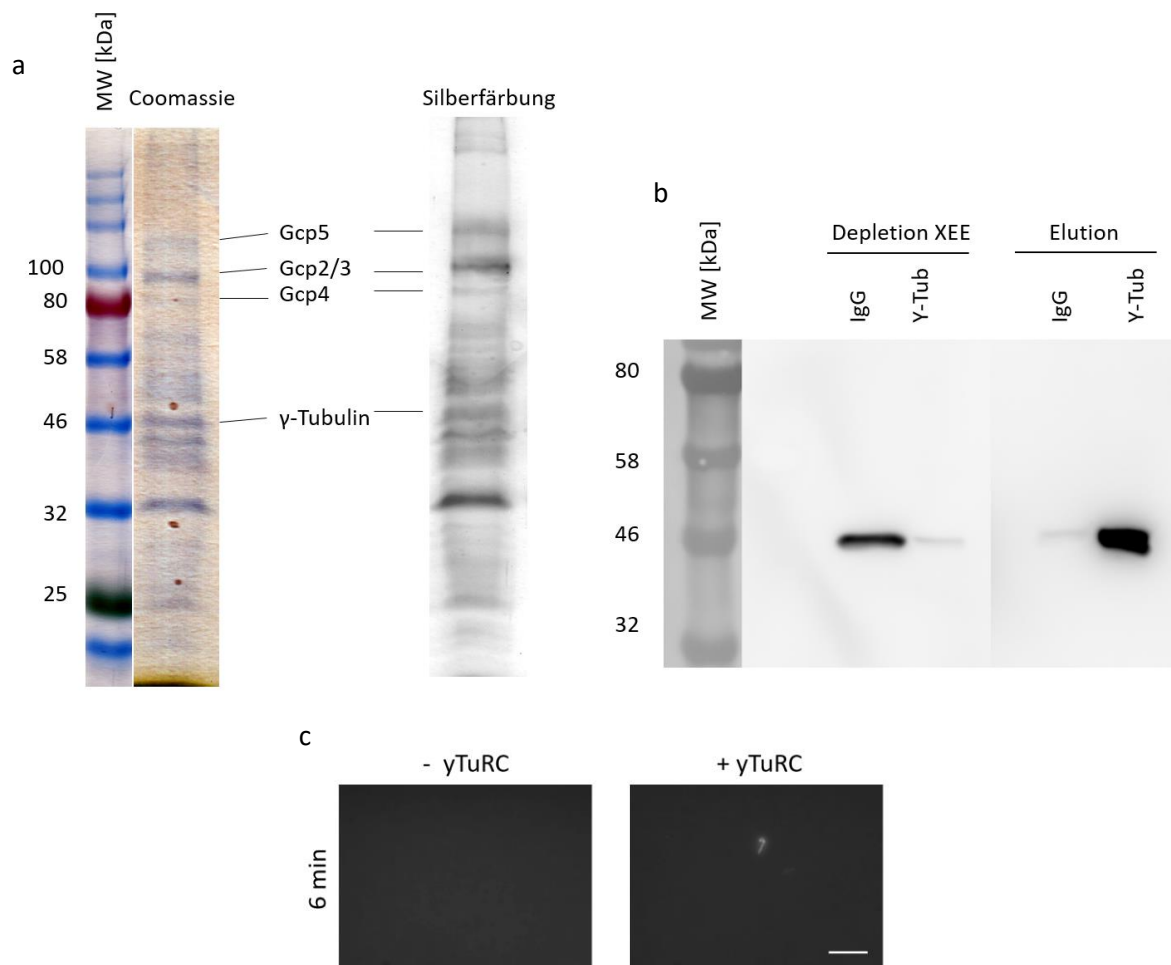
In **Abbildung 19 a** ist der aus dem XEE isolierte γ -TuRC mit seinen Komponenten im Coomassie-Gel und einer Silberfärbung zu erkennen. Zu erkennen sind die einzelnen Gcps sowie das γ -Tubulin. Bei etwa 210 kDa ist das Gcp6 zuzuordnen. Gcp5 migriert bei etwa 130 kDa, Gcp2 und Gcp3 ergeben eine Doppelbande bei etwa 110 kDa. Gcp4 ist bei ca. 80 kDa zu lokalisieren. Das γ -Tubulin zeichnet sich im Gel bei ca. 50 kDa ab.

Um die Identität des γ -Tubulin zu bestätigen wird der Western Blot mit primärem Antikörper gegen γ -Tubulin analysiert (**Abbildung 19 b**). Als Kontrolle wird die Depletion mitgeführt. In **Abbildung 19 b** ist eine spezifische Bande für γ -Tubulin bei etwa 50 kDa zu erkennen. Im γ -TuRC depletierten Extrakten nimmt das γ -Tubulin Signal ab. Vergleichend ist in der IgG Kontrolle keine Abnahme des γ -Tubulin Signals im XEE zu erkennen. In der depletierten, gereinigten Fraktion bleibt dementsprechend das Signal aus (**Abbildung 19 b**). Rückschließend vom γ -Tubulin Signal kann man daher sagen, dass der γ -TuRC im γ -Tubulin depletierten Extrakt nicht mehr vorhanden ist, die Kontrolle zeigt den γ -TuRC.

Die Funktionalität und somit der eigentliche Komplex an sich kann nur im anschließendem Nukleationsversuch untersucht werden. Der isolierte Nukleator (γ -TuRC) oder das Eluat der IgG-Kontrolle (ohne γ -TuRC) wird jeweils zum kalten, reinen Tubulin gegeben (10.14). Je nach Versuchsansatz können Kontrollpuffer oder die Cdk5rap2 Proteinfragmente in den Reaktionsansatz hinzugegeben werden. Nach einer 30 min Inkubation auf Eis erfolgt die Polymerisierung für 5 min bei 37 °C. Im weiteren Verlauf werden die Strukturen mittels Spin-Down auf Deckgläsern zentrifugiert und anschließend auf einem Objektträger fixiert und analysiert. Die analysierte Fläche ist hierbei in allen Untersuchten Proben gleich, die Angaben der MT beziehen sich jeweils auf 46 μm^2 . Das Protokoll orientiert sich an (Liu, et al. 2019).

So werden nach dem etabliertem Protokoll zwei verschiedene Mengen an γ -TuRC untersucht (10.13). Zunächst werden die Proben ohne Spin-Down, nur mit der Fixierungslösung direkt auf dem Objektträger fixiert. Es ergibt sich der Vorteil, dass die Anzahl der Proben durch die Anzahl der Rotorplätze nicht limitiert wird. Auf diese Weise ist jedoch nur eine qualitative, keine quantitative Aussage möglich. In Abbildung 19 c werden die γ -TuRC in gereinigtem Tubulin ohne Aktivator getestet. Im gereinigten Tubulin ohne Aktivator und ohne γ -TuRC kommt es zu keiner Ausbildung von MT. Mit γ -TuRC sind nach 6 min vereinzelt kurze MT zu erkennen.

Im weiteren Versuch werden CDK5RAP2 Fragmente [0,1 μ M] von *H. s.* und *X. l.* zusammen mit γ -TuRC und ohne γ -TuRC (IgG-Kontrolle) in gereinigtem Tubulin inkubiert (**Abbildung 19 d** und **e**). Es wird der beste Zeitpunkt anhand der ausgebildeten Strukturen von 5 bzw. 8 Minuten getestet. Ohne γ -TuRC zeigen allen Proben sowohl nach 5 wie auch nach 8 Minuten nur eine geringe Anzahl an MT. In diversen Proben ist eine geringe, spontane Nukleation zu erkennen (**Abbildung 19 d**). Gibt man zusätzlich zu den Fragmenten gereinigtes γ -TuRC, so ist in einigen Proben Nukleation verstärkt **Abbildung 19 e**.



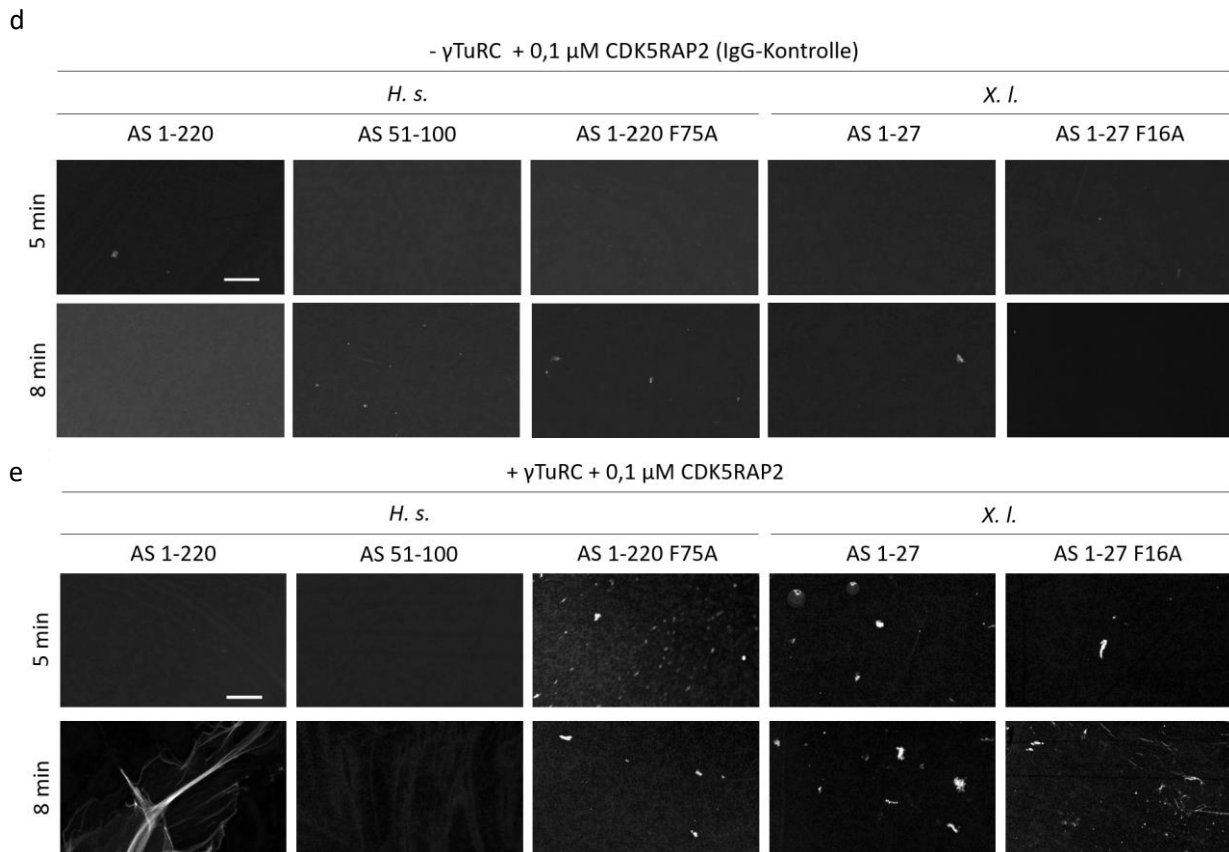


Abbildung 19 Reinigung des γ -TuRC und Nukleationsfunktionsversuch

a Coomassie-Gel (10 %) und Silberfärbung des gereinigten γ -TuRC aus XEE. Zu erkennen sind die einzelnen Komponenten des γ -TuRC. **b** γ -Tubulin Western Blot (10 %) der γ -TuRC Isolierung aus XEE. Gezeigt ist das depletierte Extrakt sowie die Elutionsfraktion. Kontrolle: Depletion mit IgG aus XEE. **c** +/- γ -TuRC in gereinigtem Tubulin. Nach 6 min ist in der Probe mit γ -TuRC vereinzelt Nukleation vorhanden. **d** Unterschiedliche Fragmente von CDK5RAP2 [0,1 μ M] *H. s.* und *X. l.* mit IgG-Kontrolle in gereinigtem Tubulin. In den untersuchten Proben ist, wenn vorhanden, eine geringe Nukleationsaktivität zu erkennen. **e** Unterschiedliche Fragmente von CDK5RAP2 [0,1 μ M] *H. s.* und *X. l.* mit dem γ -TuRC in gereinigtem Tubulin. Nach 8 min ist in der Probe mit dem Fragment AS 1-220 und AS 1-220 F75A Nukleation vorhanden. Bei der Probe mit dem AS Fragment 51-100 ist keine Nukleationsaktivität erkennbar. Bei den *X. l.* Proben, Fragment 1-27, tritt die Nukleation verlangsamt auf. Zu einer weiteren Verzögerung kommt es bei der Probe mit Mutationsfragment F16A. Zeitpunkt 5 min und 8 min nach der Stimulation; Keyence BZ-X800, 20 x Vergrößerung, Maßstab 50 μ m.

In der Probe mit dem Fragment *H. s.* AS 1-220 bilden sich nach 8 min bereits viele Aster aus. Eine Nukleationsaktivität ist vorhanden. Bei der verkürzten Variante AS 51-100, welche nicht vollends die CM1 Domäne beinhaltet, werden weder nach 5 Minuten noch nach 8 Minuten Nukleationen detektiert. Bei der Variante AS 1-220, mit der Mutation F75A in der CM1 Domäne, scheint es hingegen ebenfalls nach 5 Minuten zur Nukleation zu kommen. Die MT sind hier allerdings nicht als Aster ausgebildet, sondern scheinen sich nadelförmig zu verteilen. Ein identisches Ergebnis ergibt sich bei Fragmenten aus *X. l.*. Ohne Mutation (AS 1-27 mit CM1 Domäne) zeigt sich eine nadelförmige Struktur, die bereits nach 5 Minuten entsteht. Mit der entsprechenden Mutation AS 1-27 F16A scheint die Nukleationsaktivität verspätet einzusetzen. Nach 8 Minuten sind ebenfalls einzelne Strukturen zu erkennen, die jedoch nicht stark ausgeprägt sind.

8.6.2 Quantitative Analyse der durch den Cdk5rap2 Aktivator eingeleiteten Nukleation am γ -TuRC

In weiteren Experimenten wird die durch Cdk5rap2 gestartete Aktivierung des γ -TuRC anhand der gebildeten MT quantitativ bestimmt. In der Literatur ist eine Konzentration für Tubulin Reaktionsansätze von 7,5-20 μ M Tubulin beschrieben (Consolati, et al. 2020). Daher wird zunächst eine Tubulinkonzentration von 20 μ M verwendet. Aus **Abbildung 19 d** und **e** ergibt sich für die Dauer der Experimente der Messzeitpunkt, mindestens 5 min nach Aktivierung.

Um die Kapazität der Polymerisierung zu testen werden Taxol, IgG und Kontrollpuffer im Tubulin getestet. Taxol verhindert die Depolymerisation der MT indem es an die β -Tubulin bindet und diese stabilisiert (Foland, et al. 2005). In **Abbildung 20 a** ist die Ausbildung der MT mit 20 μ M Taxol in 20 μ M Tubulin gezeigt. Durchschnittlich werden hier 267 einzelne MT pro 46 μ m² bestimmt. Unter dem Einfluss des IgG Eluates bzw. dem Kontrollpuffer zeigen sich kaum MT-Assemblierungen. Rückschließend kann man daher sagen, dass das Tubulin in der Konzentration von 20 μ M aktiv ist.

Als nächstes werden unterschiedliche Konzentrationen an α - und β - Tubulin geprüft, um die Konzentration von 20 μ M zu verifizieren. Mit gleichbleibender Menge an γ -TuRC wird die Menge an Tubulin variiert (12,5 20 und 25 μ M Tubulin). Bei einer Konzentration von 25 μ M werden 542 Strukturen gezählt. Reduziert man die Tubulinkonzentration um 20 % (20 μ M), so werden im Durchschnitt nur zu 28,5 MT detektiert. Wird die Menge weiter reduziert so bilden sich im direktem Vergleich zur Kontrolle (IgG/Puffer) nicht wesentlich mehr Strukturen aus. Es bestätigt sich die in der Literatur angegebene Menge an Tubulin. Die bestätigte Konzentration von 20 μ M Tubulin ist somit die optimale Konzentration um einen Cdk5rap2 Aktivator zu untersuchen. Die 20 μ M Tubulin lassen je nach Versuchsansatz bei der Testung möglicher Aktivatoren eine Varianz mit weniger bzw. mehr MT-Assemblierungen zu.

Als nächstes werden verschiedene CDK5RAP2 *H. s.* Proteinfragmente zusammen mit dem γ -TuRC oder der Kontrolle (IgG) in reinem Tubulin inkubiert und analysiert (**Abbildung 20 b**).

Das Fragment *H. s.* WT 1-220 enthält die volle CM1 Domäne. Im Mittel sind 18 Strukturen zu detektieren. Die Kontrolle weist etwa 80 % (4,5) weniger Strukturen auf.

Das Proteinfragment 51-100 beinhaltet nur einen N-terminalen Teil der CM1 Region mit Phenylalanin an der Position 75. Dies hat Auswirkungen auf die Gesamtanzahl der durchschnittlich ermittelten Strukturen. Die Anzahl der gebildeten MT reduziert sich. In Gegenwart des γ -TuRC werden allerdings immer noch mehr Strukturen im Vergleich zur Kontrolle detektiert (5,5 γ -TuRC zu 0,5 IgG \sim 9 %).

In der *H. s.* CDK5RAP2 Mutante ist die bereits in der Einleitung genannte und in der Literatur beschriebene Mutation F75A vorhanden (Mu F75A AS 1-220). Von allen drei mit γ -TuRC getesteten CDK5RAP2 Aktivatoren weist diese Probe am wenigsten MT auf. Das inaktive Aktivatorprotein (Mu F75A AS 1-220) mit γ TuRC und die IgG Kontrolle (ohne γ -TuRC) unterscheiden sich kaum.

Schlussfolgernd lässt sich somit festhalten: Die CM1 Region ist wichtig für die Ausbildung von MT in reinem Tubulin und benötigt das Phenylalanin an der Position 75.

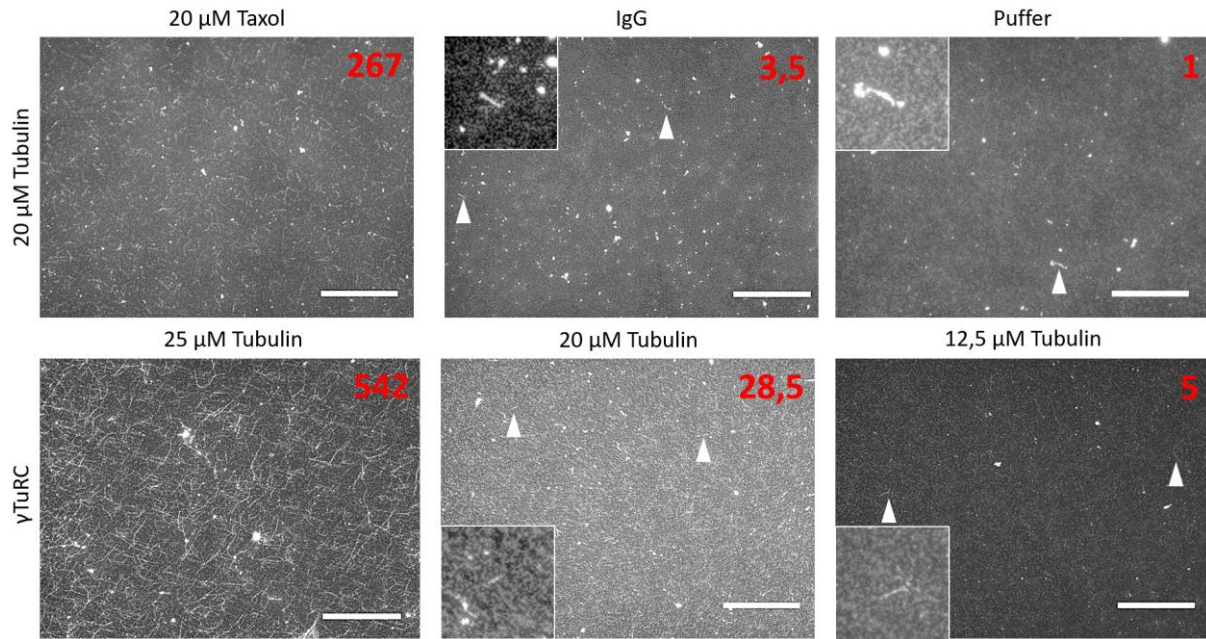
Abbildung 20 c zeigt analog zu den *H. s.* CDK5RAP2 Proteinfragmente die Ergebnisse aus Experimenten mit Cdk5rap2 *X. l.*. Bei den längeren Cdk5rap2 Fragmenten WT 1-189, WT 1-139 und WT 1-77 bleibt die Anzahl der ermittelten MT in Gegenwart der Cdk5rap2 Fragmente vergleichbar (WT 1-189 Mittel 9 Strukturen, WT 1-139 Mittel 9,25 Strukturen, WT 1-77 Mittel 9,5 Strukturen). Die Anzahl der Strukturen in den IgG Kontrollen schwanken zwischen 2,5 und 7,75 Strukturen. Durch Cdk5rap2 als Aktivator wird die Nukleation eingeleitet.

Das Proteinfragment WT 1-27 besteht ausschließlich aus der CM1 Domäne. Nach Zugabe des Fragments in das reine Tubulin zeigt sich in Anwesenheit des γ -TuRC eine erhöhte Anzahl an MT. Der Wert beträgt im Mittel 22,5 Strukturen. Allerdings kommt es auch unter der Zugabe des WT 1-27 in der Kontrolle zu einer leichten Steigerung in der Anzahl der Strukturen im Vergleich zu den drei größeren Fragmenten (durchschnittliche Anzahl 12,5).

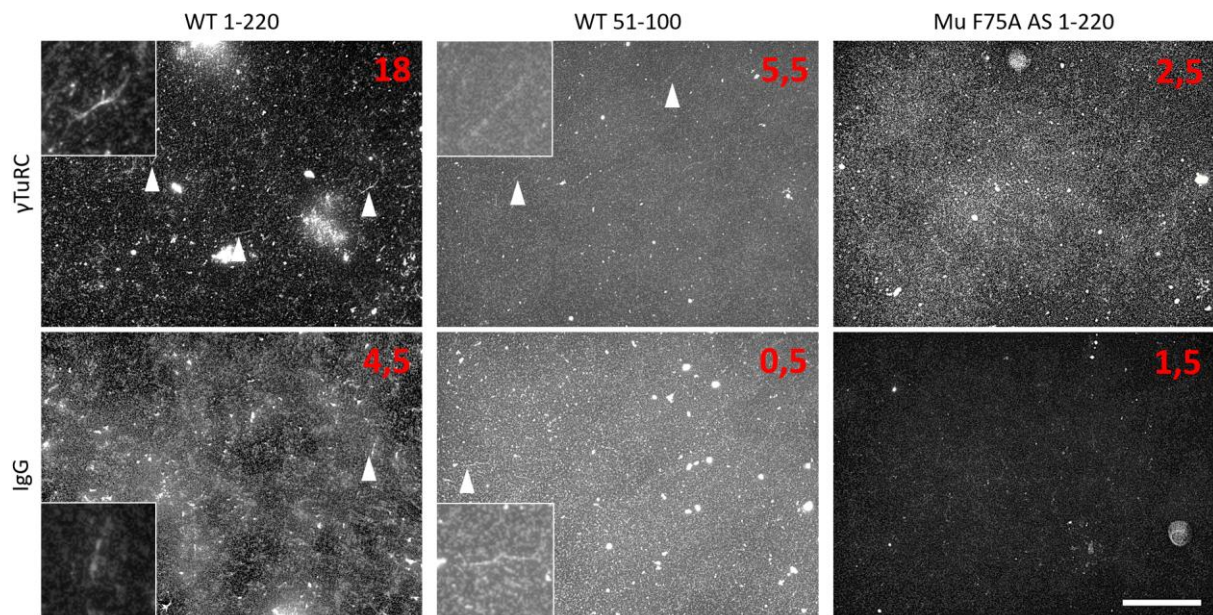
Wie bei der Mutante F75A in *H. s.* wird in *X. l.* Cdk5rap2 die homologe Position 16 mutiert. Das Phenylalanin 16 wird durch ein Alanin ausgetauscht. In dem kurzen Fragment Mu F16A AS 1-27 reduziert sich die Anzahl der Strukturen im Vergleich zum WT 1-27 enorm. Ermittelt werden im Durchschnitt nur noch 2,5 MT Strukturen (Kontrolle 2). Somit bleibt noch die Frage, welche Folgen sich ergeben, wenn ein längeres Fragment mit Mutation eingesetzt wird. Daher wird im nächsten Schritt der Fokus auf das Proteinfragment Mu F16A AS 1-220 (*X. l.*) gelegt (**Abbildung 20 c**). Das Fragment zeigt in Anwesenheit des γ -TuRC eine Anzahl von durchschnittlich 5,3 Strukturen. Vergleicht man das Ergebnis der Mu F16A AS 1-220 mit γ -TuRC mit der Mu F16A AS 1-220 IgG-Kontrolle, so ist keine signifikante Veränderung in der Anzahl der Strukturen nachzuweisen (Anzahl der durchschnittlichen IgG Strukturen je Bild ist 5).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass es bei den langen *X. l.* Cdk5rap2 Fragmenten (WT 1-189; WT 1-139; WT 1-77) mit dem γ -TuRC untereinander keinen Unterschied in der Anzahl der MT gibt. Mit dem kurzen WT 1-27 Fragment nimmt die Anzahl der MT in Anwesenheit des γ -TuRC zu. Wie auch in den humanen Konstrukten bewirkt die Mutation F16A in den *X. l.* Fragmenten in Anwesenheit des γ -TuRC eine Reduktion in der Ausbildung von MT. Das Phenylalanin in der CM1 Domäne übernimmt eine Schlüsselfunktion in der Ausbildung der MT. Die IgG (ohne γ -TuRC) Kontrollen zeigen in der Regel zum jeweiligen aktiven Cdk5rap2 Protein eine verminderte Assemblierung der MT. Eine Ausnahme bilden die inaktiven Cdk5rap2 Mutationsvarianten. Hier ist die Probe γ -TuRC nahezu identisch mit der IgG Kontrolle.

a



b



c

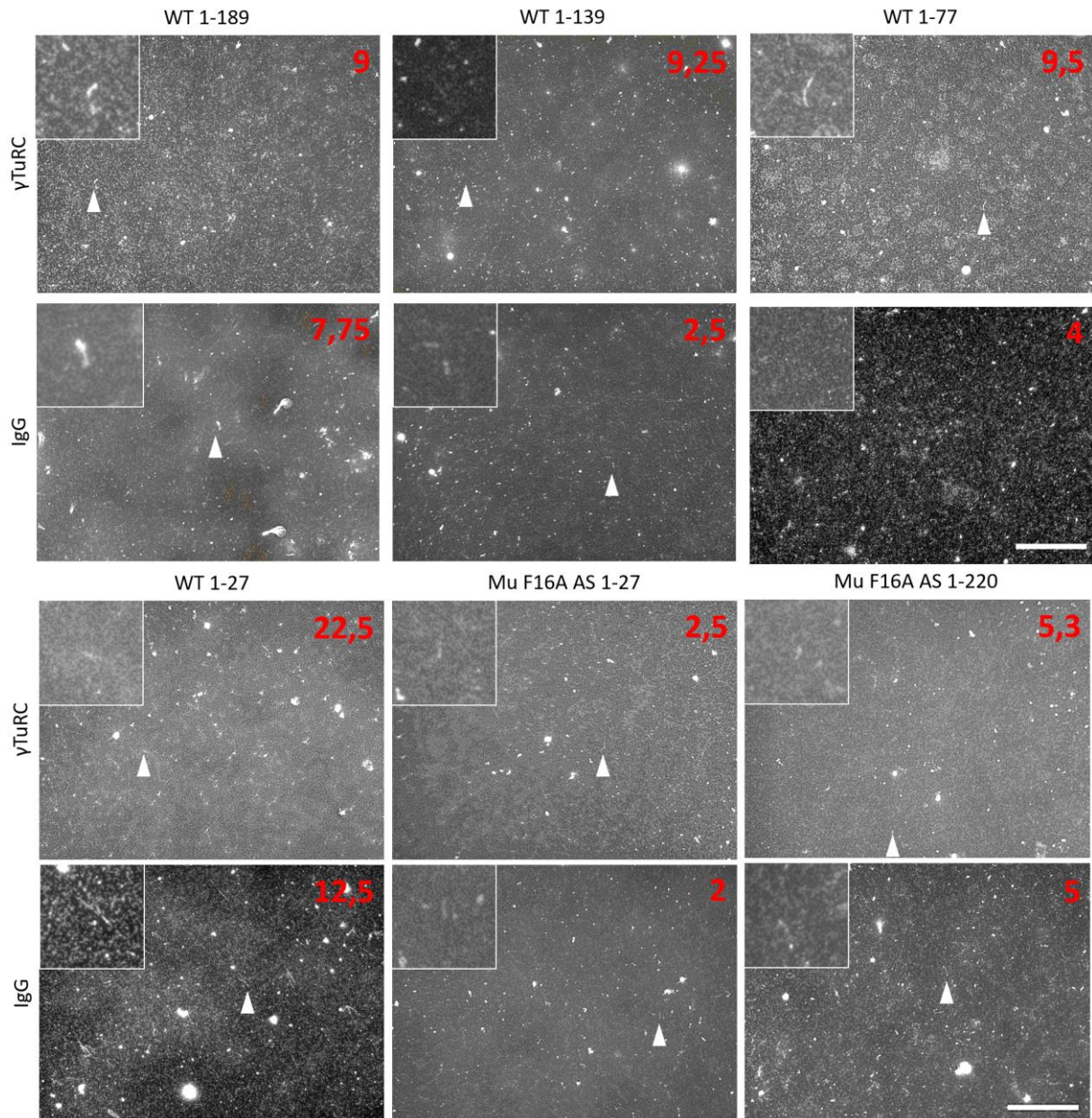


Abbildung 20: *In vitro* MT Nukleationsversuch mit unterschiedlichen CDK5RAP2 Fragmenten als Aktivatoren des γ -TuRC
 Getestet werden verschiedene CDK5RAP2 *H. s.* und *X. l.* Aktivatorfragmente um die Nukleationseffizienz anhand der gebildeten MT zu bestimmen. Mitgeführt werden jeweils Positiv- und Negativkontrollen, unterschiedliche Konzentrationen an γ -Tubulin sowie CDK5RAP2 Mutationen. Die Anzahl der durchschnittlich vorhandenen MT ist in den jeweiligen Bildern angegeben. Die ausgezählte Fläche beträgt $46 \mu\text{m}^2$ über eine Z-Ebene von $0,1 \mu\text{m}$ bei mindestens 10 Bildern, der Maßstab beträgt $50 \mu\text{m}$ und die Detailansicht $25 \times 25 \mu\text{m}$, im Vollfokusmodus. Zur besseren Identifikation sind einzelne MT markiert und hervorgehoben. **a** Funktionsaktivität und Kalibrierung des gereinigten Tubulin. Taxol stabilisiert die MT, eine gesteigerte Anzahl der MT ist zu beobachten. Im Gegensatz dazu ist mit Puffer und ohne γ -TuRC (IgG Kontrolle) die Anzahl der MT reduziert. Die Tubulinkonzentration liegt bei den drei Proben bei $20 \mu\text{M}$. Nach Zugabe des γ -TuRC kommt es zur Ausbildung von MT. Die Anzahl der ausgebildeten MT ist abhängig von der Menge an eingesetzten Tubulin und nimmt von $25 \mu\text{M}$ zu $12,5 \mu\text{M}$ ab. **b** *Homo sapiens* CDK5RAP2 Fragmente ($1 \mu\text{M}$) in $20 \mu\text{M}$ Tubulin. Als Kontrolle werden IgG Eluate eingesetzt. Nach Zugabe von WT 1-220 nimmt die Anzahl der Strukturen zu. Im Vergleich kommt es zu einer Reduktion bei den Fragmenten WT 51-100 und Mu F75A AS 1-220. **c** *Xenopus laevis* Cck5rap2 Fragmente ($1 \mu\text{M}$) in $20 \mu\text{M}$ Tubulin. Als Kontrolle werden IgG Eluate eingesetzt. Nach Zugabe von WT 1-189, WT 1-139 und WT 1-77 bleibt die Anzahl der Strukturen mit γ -TuRC konstant. Die Anzahl der Strukturen nimmt beim WT 1-27 zu. Im Vergleich es kommt zu einer Reduktion bei den Fragmenten Mu F16A AS 1-27 und Mu F16A AS 1-220. Ein Übersichtsgraph befindet sich im Anhang (**Abbildung 23**).

9 Diskussion

9.1 Die Nukleation am γ -TuRC bedarf eines Aktivators

Bereits in 2008 wurde bekannt, dass es für die optimale Bindung von α - und β -Tubulin zu einer Rotation des γ -Tubulin (Tub4p) im γ -TuSC zu einer errechneten Winkeländerung von 14° kommen muss (Kollman, et al. 2008; Kollman et al. 2015; Farache, et al. 2018). Eine Aktivierung sowohl vom γ -TuSC wie auch vom γ -TuRC kann durch assoziierende Faktoren erfolgen, ist jedoch keine Voraussetzung. Der alternative Aktivierungsmechanismus kann auch durch einen intrinsischen Vorgang ausgelöst werden, dem sogenannten induced fit. Es kommt zur Anpassung der Funktion des γ -TuRC während des Nukleationsprozesses, der Bindung der α - und β -Tubuline. Resultierend wird der γ -TuRC in die richtige Konformation überführt.

Ein solcher Mechanismus ist zwar grundsätzlich möglich, energetisch jedoch ungünstig. Der Energieaufwand für einen spontanen Übergang der Konformationsänderung des γ -TuRC ist groß und verlangt daher die Rolle eines Katalysators mindestens in Form eines Modulators. Unter dem Einfluss des Modulators kann es dann zur Überführung der Konformationen ineinander kommen. Daher ist die Umsetzung eines trans-Aktivierungsmechanismus wahrscheinlicher.

Bereits besser untersucht ist das Polymerisationsverhalten von Aktin. Ohne Nukleationsursprung beginnt die Aktinpolymerisation nur langsam aus einzelnen Untereinheiten bis hin zu Oligomeren und weiter zu Filamenten. Erst nach einiger Zeit setzt dann die exponentielle Wachstumsphase ein. Ist bereits polymerisiertes Aktin vorhanden, so sind diese der Nukleationsursprung für neue, wachsende Aktinfilamente. Das Wachstum beginnt in diesem Fall direkt exponentiell (Alberts, et al. 2015). Die Wahrscheinlichkeit einer spontanen Nukleation ist bei der Polymerisation von Aktinfilamenten aufgrund der einfacheren Anordnung und Struktur wesentlich höher als im Vergleich zu den röhrenförmigen MT, mit ihrem universellen Nukleationsursprung. Schlussendlich ist der Geschwindigkeit bestimmende Keimling (seed) bei der Tubulin Polymerisation wesentlich größer und komplexer als bei der Aktin Polymerisation. Bei der Aktin Polymerisation ist der Keimling viel kleiner. Es verhärteten sich daher die Indizien, dass auch die MT einen Nukleator brauchen.

9.2 Assemblierungsfaktoren realisieren die korrekte Zusammensetzung des γ -TuRC
Im weiteren Verlauf der Zeit gab es dann vermehrt Hinweise auf eine angepasste Konformation/Stöchiometrie des γ -TuRC. Durch massenspektrometrische Analysen konnten verschiedene Mikrotubuliaktivitäten in Kombination mit der Verankerung am MTOC durch unterschiedliche Proteine nachgewiesen werden (Muroyama, Seldin und Lechler 2016). Aktuelle Forschungsergebnisse zeigen, dass für den Start der Assemblierung der MT am Nukleator (γ -TuRC) ein Aktivierungsmechanismus gebraucht wird. Dies könnte über einen trans wirkenden Aktivator funktionieren. Mittels Tandem MS/MS wurden in dieser Arbeit assoziierende Proteine gefunden, die biochemisch mit dem γ -TuRC interagieren. Die am γ -TuRC interagierenden Proteine können bestimmte Funktionen haben. Dabei sind assoziierende Proteine und deren Bindestellen maßgeblich an der korrekten Funktion des γ -TuRC beteiligt. Aus diesem Grund, und um ein besseres Verständnis von der Funktion des γ -TuRC zu bekommen, lohnt es sich einen genaueren Blick auf diese Proteine am Komplex zu werfen. Um den großen und komplexen γ -TuRC zu assemblieren, können die detektierten Proteine eine Chaperon ähnliche Funktion ausüben. Ein möglicher Assemblierungsfaktor kann die bereits bekannte im γ -TuRC integrierte und interagierende β -Aktin Untereinheit sein (Liu, et al. 2019). Eine mögliche Erklärung liefert β -Aktin als Superfamilie der Hitzeschockproteine A (HspA) Artigen ATPasen (Mounier und Arrigo 2002). Bereits bekannt ist, dass verschiedene Hsps mit Komponenten des Cytoskelettes interagieren. So sind Hsp90 und Hsp70 bereits als Interaktionspartner des MT-Netzwerkes und Bestandteil der Zentrosomen bekannt (Mounier und Arrigo 2002; Liang und MacRae 1997).

Die evolutive Konservierung des γ -TuRC ermöglicht hilfreiche Untersuchungen. Entsprechend lässt sich die Biogenese unter dem Gesichtspunkt möglicher Mechanismen und beteiligter Faktoren vergleichen. Auch in Pilzen gibt es Orthologe des γ -TuRC. So wird gezeigt, dass Mzt1 essentiell für *C. albicans* ist. In MZT1 KO Untersuchungen kommt es zu Defekten in der Lokalisierung des γ -TuSC sowie der mitotischen Spindelassemblierung (Lin, et al. 2016). Bereits im γ -TuSC kommt es zur Interaktion mit der bekannten und später untersuchten CM1 Domäne mit Mzt1 über den N-Terminus von GCP3 oder CDK5RAP2 (Lin, et al. 2016). In Koimmunpräzipitationsversuchen wird eine Assoziation von MZT1 mit dem γ -TuRC und CDK5RAP2 über die CM1 Domäne von CDK5RAP2 bewiesen (Lin, et al. 2016). Vergleichend zu dieser Arbeit werden verschiedene CDK5RAP2 Fragmenten/Mutanten untersucht. Je nach CDK5RAP2 Variante zeigten sich unterschiedliche Bindeaffinitäten zu Mzt1 sowie differenzierte Ausbildungen der MT (Lin, et al. 2016).

MZT1 kommt somit als Assemblierungsfaktor und womöglich auch als Komodulator für die Aktivierung des γ -TuRC in Frage. Assemblierungsinteraktionen und Funktionen über β -Tubulin oder MZT1 sind somit wahrscheinlich und müssen auf jeden Fall in der weiteren Beurteilung von möglichen Aktivatoren berücksichtigt werden.

9.3 Targeting Faktoren organisieren den zielgerichteten Transport von Proteinen und γ -TuSC

Eine weitere Möglichkeit die Funktionalität und somit Aktivität des γ -TuRC zu beeinflussen bieten Targeting Faktoren/Proteine. Diese Proteine sind für die Zielsteuerung des γ -TuRC verantwortlich. NEDD1 ist ein mögliches Protein, dass bereits in der Einleitung als Targeting Faktor vorgestellt wird. NEDD1 ist verantwortlich für die Verankerung des γ -TuRC am Zentrosom im perizentrosomalen Material (Muroyama, Seldin und Lechler 2016). Eine Depletion von NEDD1 reduziert das zentrosomal vorhandene γ -Tubulin. Dies hat einen negativen Einfluss auf die Mikrotubulinukleation (Muroyama, Seldin und Lechler 2016). NEDD1 könnte in seiner Funktion als Targeting Faktor eine Aktivierung des γ -TuRC bewirken. Mittels massenspektrometrischer Analysen konnte bereits nachgewiesen werden, dass es zu unterschiedlichen Mikrotubuliaktivitäten der Verankerung am MTOC mittels NEDD1 kommt (Muroyama, Seldin und Lechler 2016).

Nedd1 ist als ein Protein des Augmin-Komplexes bekannt (Farache, et al. 2018; Conduit 2019). Es kommt zur Interaktion des Komplexes an bereits vorhandenen MT. Der Komplex ist im weiteren Verlauf dann in Assoziation mit dem γ -TuRC und agiert als Ursprungsort neuer MT. Auch Nedd1 ist in der Entstehungsphase des Komplexes vorhanden. Der Vollständigkeit halber müssen als Assemblierungsfaktoren am Augmin Komplex noch Tpx2 und Xmap215 genannt werden. Tpx2 ist für die eigentliche Stabilisierung des Komplexes bis zum MT Polymerisation verantwortlich. Xmap215 stabilisiert die wachsenden MT. (Alfaro-Aco und Petry 2017; Petry, et al. 2013). Auf die genaue Bedeutung und Funktion von Tpx2 und Xmap215 wird in dem Kapitel 9.9 eingegangen. Ein weiterer Targeting Faktor kann auch der Augmin-Komplex selbst bzw. dessen Bestandteile sein. Vorstellbar ist eine Zielsteuerung vom γ -TuRC oder Komponenten an bereits vorhandene MT und eine damit verbundene Aktivierung.

Im Fokus dieser Arbeit stehen jedoch Proteine, die eine Assoziation am γ -TuRC bilden, in biochemischen Experimenten detektiert wurden und einen möglichen Aktivierungsmechanismus unterstützen. Bei den hier assoziierten und analysierten Proteinen kann es sich zum einem um den tatsächlichen Aktivator handeln, aber auch um einen möglichen Modulator.

9.4 Modulatoren und Aktivatoren interagieren mit dem γ -TuRC

Die wissenschaftliche Grundlage für die Suche eines solchen γ -TuRC Aktivator bilden die Publikationen von Liu et al. 2019 und Wieczorek, et al. 2019. Die Forscher untersuchten unabhängig voneinander mit Hilfe der Kryoelektronenmikroskopie den Aufbau des γ -TuRC. Während Wieczorek *et al.* den γ -TuRC aus HeLa S3 zytoplasmatischen Extrakten gewinnt, gelingt es Liu, et al. diesen in großen Mengen aus XEE zu isolieren. Schlussfolgernd kommen beide Forschungsgruppen jedoch zu derselben Erkenntnis. Der γ -TuRC stellt in den Ergebnissen der Kryoelektronenmikroskopie nicht die perfekte Matrize für assemblierte MT dar (**Abbildung 1 c**). Assemblierte MT passen von ihrer röhrenförmigen Struktur nicht auf den γ -Tubulin Ring sondern hätten ihre Konvergenz unterhalb. Durch eine theoretisch mögliche und berechnete Rotation kann der γ -Tubulin Ring die perfekte Vorlage für die MT bilden (Wieczorek, et al. 2019; Liu, et al. 2019).

Somit wird die Wahrscheinlichkeit immer höher, dass es einen Aktivator gibt, der für die Anpassung der Ringstruktur verantwortlich ist. (**Abbildung 20**). Diese These vertreten auch die Autoren der zuvor genannten Veröffentlichungen. Beide gehen in ihrer Arbeit auf CDK5RAP2 als möglichen Aktivator ein, geben schlussendlich aber keine finale Bewertung ab. Andere assoziierende Proteine werden vereinzelt in Betracht gezogen, jedoch auch nicht weiter analysiert (Wieczorek, et al. 2019; Liu, et al. 2019).

Cdk5rap2 und mögliche weitere Aktivatoren werden anhand von Tandem MS/MS Datensätzen in Betracht gezogen. Wie bereits in der Einleitung thematisiert, werden einige dieser Proteine trotz stringenten Waschens (hohe Salzkonzentrationen) in Assoziation mit dem γ -TuRC gefunden, wobei dieser in seiner inaktiven Form vorliegt. Vergegenwärtigt man sich diese Tatsache, so muss kritisch gefragt werden, ob die nach der Reinigung und Tandem MS/MS Analyse stabil am γ -TuRC assoziierten Faktoren alleine die Aktivierung des Komplexes ausmachen. Man erwartet beim Modell eines Aktivators, dass der Aktivator im gereinigten Komplex hier nicht mehr oder nicht ausreichend vorhanden ist. Wahrscheinlich ist daher, dass beim Waschen des γ -TuRC für die weiteren Analysen, Teile des Aktivators bzw. Kofaktoren verloren gehen und der γ -TuRC daher in der inaktiven Konformation vorliegt.

Nme7 z. B. bleibt trotz sehr stringenter Waschbedingungen stabil am γ -TuRC assoziiert und kann dort in signifikanten Mengen nachgewiesen werden. Prinzipiell spricht dies gegen Nme7 als möglichen Aktivator, da der γ -TuRC in seiner inaktiven Form vorliegt. Eine mögliche Erklärung ist, dass entweder ein Teil von Nme7 oder ein Kofaktor beim Reinigen des γ -TuRC verloren geht. Ohne diese beteiligte Komponente kommt es zu keiner Aktivierung des γ -TuRC, der Komplex liegt inaktiv vor.

Um die vielfältigen Möglichkeiten unterschiedlicher Aktivatoren und deren Angriffspunkte zu analysieren, ist es wesentlich die Komplexität des γ -TuRC zu verstehen. Bereits die Vorläuferkomponenten des γ -TuRC zeigen Assoziationen verschiedener Proteine mit dem

sogenannten γ -TuSC (Choi, et al. 2010). Die Komplexität des γ -TuRC wird weiter verdeutlicht, wenn man die Zusammensetzung der γ -TuRC in verschiedenen Organismen untereinander vergleicht. Schon bei der Rekrutierung und Zusammensetzung der γ -TuSC werden unterschiedliche Gcps eingebaut (Tovey und Conduit 2018).

Ein Aktivator an dieser Stelle vermittelt zunächst den Eindruck einer nicht notwendigen Komplikation in diesem System. Warum bedarf es einer solch zusätzlichen Komponente? Die Auswirkungen eines Aktivators auf den Nukleator und entstehenden MT werden deutlich, wenn man die Spontanreaktivität der α - und β -Tubuline Dimere vergleicht (**Abbildung 1 a**).

In Gegenwart eines universellen Nukleators bzw. Nukleationsursprungs ist bereits eine beschleunigte Polymerisation der einzelnen Untereinheiten zu erkennen (Kollman et al. 2011). Zusätzlich zu der in Kollmann *et al.* genannten gesteigerten Nukleationsaktivität, durch den γ -TuRC selbst, werden in dieser Arbeit verschiedene, assoziierende Proteine und deren Fragmente als mögliche Kandidaten für Aktivatoren des Nukleators identifiziert und im weiteren Verlauf analysiert.

Weiter werden die Auswirkungen eines möglichen Aktivators bedeutsam, wenn man Krankheiten in Verbindung mit γ -Tubulin betrachtet. So wird z. B. γ -Tubulin in multiplen Glioblastom Tumoren überexprimiert (Binarová und Tuszynski 2019). Eine Überexpression von γ -Tubulin zeigt hemmende Wirkung auf das inhibierende C53 Protein bei DNA-Schäden (Horejsí, et al. 2011). Ein möglicher Aktivator kann in diesem Zusammenhang für eine gesteigerte MT-Polymerisation sorgen, der molekulare Link zum Zellkern bleibt allerdings unklar.

Ein Ausschluss einzelner hier untersuchter Proteine als möglicher isolierter Aktivator ist auch in diesem Zusammenhang nicht möglich. Daher werden die in dieser Arbeit untersuchten, assoziierenden Aktivatoren unterschiedlich starken Evidenzen zugeordnet. Auf diese Art wird zusätzlich auch ein kombinierter Mechanismus berücksichtigt. Die Kombination kann aus den hier untersuchten Proteinen sowie noch unbekanntem Interaktionspartnern bestehen.

9.5 COPII Vesikel Proteine Sec23A & Sec24A assoziieren am γ -TuRC und fungieren als mögliche Aktivatoren

COPII Vesikel Proteinfragmente (Sec23/Sec24) wurden als assoziierende Proteine in der γ -Tubulin Tandem MS/MS detektiert (**Tabelle 1**) und stehen somit im biochemischen Zusammenhang mit dem γ -TuRC. *In vitro* Experimente in XL177 Zellen zeigen eine Lokalisation von Sec23A in der Mitose an den bipolaren Spindelpolen, eine zentrosomale Lokalisation, in Kolokalisation mit γ -Tubulin. Die eigentliche Funktion von Sec23A/Sec24A gilt es noch genauer zu untersuchen. Depletionsexperimente der Sec23 und Sec24 Proteine im XEE mit anschließendem Funktionsversuch können die Aufgaben der beiden Proteine im Hinblick der MT-Assemblierung genauer beleuchten. Mit den zur Verfügung stehenden Antikörpern konnte jedoch auch in vielen aufwendigen Versuchen eine Depletion nicht erreicht werden.

SEC23 und SEC24 sind an der Außenseite der COPII Vesikel lokalisiert und über das Motorprotein Dynein mit den MT verbunden. Über Dynein findet der Transport von COPII Vesikeln entlang der MT in Richtung des Nukleationsursprung statt (Zong, et al. 2012; B. Alberts, et al. 2015). Die Voraussetzung einer Assoziation von SEC23 und SEC24 mit den Minus- Enden der MT und somit dem γ -TuRC ist daher gegeben. Dynein oder andere Komponenten der Motorproteine sind nicht in signifikanten Mengen in der Tandem MS/MS Analyse vorhanden. Grund dafür könnte eine Umfunktionierung der Dyneine im Laufe der Mitose sein. Wahrscheinlicher ist jedoch, dass aufgrund der hohen Dynamik die Motorproteine grundsätzlich schwer zu fischen sind. Grund dafür kann sein, dass sie prozessiv entlang der MT laufen und eher abfallen können. So ist Dynein zunächst verantwortlich für den Transport von MTOC Komponenten zu den Spindelpolen. Zusätzlich ist es an der Quervernetzung der MT und dem Zerfall der Kernhülle beteiligt. Weiter wird es als Komponente der Kinetochore lokalisiert (Vaughan und King 2012). Die Umfunktionierung von Dynein in der Mitose spricht für einen Aufgabenwechsel der assoziierenden Proteine.

Der Fokus richtet sich somit zunächst auf die beiden COPII Proteine Sec23/Sec24 (**Tabelle 1**). Im Western Blot, der Immunofluoreszenz und in der Tandem MS/MS konnte die gemeinsame Lokalisation und die biochemischen Interaktionen von Sec23/Sec24 mit γ -Tubulin erfolgreich nachgewiesen werden. Die eigentliche Funktion am Nukleator bleibt noch ungeklärt. Dennoch sollten die Interaktionen beider Proteine zum γ -TuRC weiter untersucht werden. Ein Bezug der COPII Proteine lässt sich zu pathologischen Veränderungen aufbauen, deren Ursache genetischen/molekularen Ursprungs sind. Das auch der Sec23/Sec24 Familie zugehörige Protein SEC23B sorgt in mutierter Version für Metastasen bei kolorektalen Karzinomen (Yang, et al. 2020). Ein möglicher Erklärungsansatz liegt hier in der genaueren Beziehung der Sec23/Sec24 Familie in den betroffenen Zellen zum γ -TuRC.

Aus der Liste möglicher Aktivatorokandidaten werden neben Sec23/Sec24 weitere bekannte Proteine am γ -TuRC diskutiert. Daher werden diese Proteine auch als weitere potentielle Aktivatoren des γ -TuRC untersucht und analysiert.

9.6 NPC Mel-28 als unkonventionelles Protein in Assoziation mit dem γ -TuRC

Bei einer durchgeführten Tandem MS/MS Analyse einer γ -Tubulin bzw. γ TuRC Immunpräzipitation aus XEE, werden unter weniger stringenten Bedingungen Komponenten des Nup107-160 Komplex als Interaktionspartner des γ -TuRC identifiziert (**Tabelle 1**). Vergleichend werden in einer Mel-28 massenspektrometrischen Analyse aus XEE Bestandteile des γ -TuRC (Gcp2; γ -Tubulin) detektiert (Yokoyama, et al. 2014).

Mel-28 (ELYS) interagiert in der Interphase mit dem Nup107-160 Komplex und gehört somit zum Kernporenkomplex (NPC) (Franz, et al. 2007). In der Mitose werden Komponenten des Nup 107-160 Subkomplexes sowohl an den Kinetochoren wie auch an den Spindeln und Spindelpolen (Nup 133) nachgewiesen (Orjalo, et al. 2006; Galey, et al. 2006; Franz, et al. 2007; Yokoyama, et al. 2014). Die Funktion an den Spindelpolen ist dabei noch nicht hinreichend geklärt.

Das Mel-28 Protein weist folgende strukturelle und funktionelle Domänen auf: verschiedene NLS, AT-Haken, β -Propeller, α -helikale Region, Coiled-Coil Domäne, eine Chromatin Bindestelle, eine NPC und Kinetochorbindestelle (Gómez-Saldivar, et al. 2016; Yokoyama, et al. 2014). Über das C-terminale Ende hat Mel-28 einen AT-Haken und ein Nuclear Localization Signal (NLS), eine RanGTP abhängige MT Bindestelle. (Yokoyama, et al. 2014). Für die RanGTP abhängige Ausbildung von MT ist der γ -TuRC als Nukleator ein essentieller Bestandteil (Wilde und Zheng 1999).

Durch eine Mel-28 Depletion in XEE konnte gezeigt werden, dass Mel-28 für die Rekrutierung vom γ -Tubulin zu MT assoziierenden Proteinen verantwortlich ist. Anschließend wird die Assemblierung der MT eingeleitet. Gleichzeitig kommt es RanGTP abhängig zur Bindung von Mel-28 über seinen C-Terminus an die MT (Yokoyama, et al. 2014). In dieser Arbeit wird die Ausbildung von MT im Zusammenhang mit Mel-28 analysiert. Untersucht wird dies anhand von Mel-28 Depletionen aus XEE (*ex vivo*). Nach der Zugabe von RanGTP Q69L in Mel-28 depletierten XEE bilden sich nach 25 min MT-Asterstrukturen aus (**Abbildung 11**). In der hier vorgestellten Untersuchung sind die Strukturen der Mel-28 Depletion vergleichbar mit der Kontrolle. Auch Experimente in Δ Mel-28 XEE mit und ohne Spermien zeigen MT Strukturen. Bei der anschließenden quantitativen Auswertung des Versuches konnte jedoch eine Reduktion der Ausbildung von MT um 80 % berechnet werden (Yokoyama, et al. 2014). Durch die Zugabe von Mel-28 mRNA tritt ein Rettungseffekt auf (Yokoyama, et al. 2014). In *in vitro* Experimenten kommt es bei einem MEL-28 knockdown in der Mitose zu einer erhöhten Menge an β -Tubulin im Bereich des Mittelkörpers der sich teilenden Zellen. Dies hat Auswirkung auf die Geschwindigkeit der Zellteilung, die Cytokinese ist verlangsamt (Rasala, et al. 2006).

Neben der eigentlichen Depletion von Mel-28 ist auch der Nukleationsursprungsort ausschlaggebend. Setzt man statt Spermien Zentrosomen als Nukleationsursprung in Δ Mel-28 XEE ein, so werden MT ausgebildet. Diese sind in ihrer Intensität eher schwach ausgeprägt, aber dennoch nachweisbar (Yokoyama, et al. 2014). In diesem Zusammenhang stellt sich direkt die Frage, ob die Assemblierung der MT am Zentrosom auf die Komposition z.B. des MTOC zurückzuführen ist.

Da das Zentrosom allumfänglich als Hotspot des γ -TuRC gilt, muss somit der Zusammenhang von Mel-28, γ -TuRC und der Assemblierung von MT geklärt werden. Ist der Aktivator des γ -TuRC in dem hier durchgeführten Experiment im MTOC enthalten, und ist es Mel-28?

Die hier beschriebenen Versuche zeigen die Auswirkungen der Mel-28 Depletionen. An dieser Stelle interessant wäre ein Rettungsexperiment mit einem rekombinanten Mel-28. Eine mit und ohne RanGTP Q69L abhängige Mel-28 Nukleation der MT könnte so untersucht werden. Wie bereits in der Einleitung beschrieben handelt es sich bei Mel-28 *X. l.* um ein großes Protein von ca. 270 kDa (8.4). Aufgrund der Größe des Proteins ist eine rekombinante Mel-28 Synthese als problematisch einzustufen. Alternativ ergibt sich die Testung einzelner funktionaler Domänen des Mel-28 Proteins. Analog zu den Konstrukten von Gómez-Saldivar et al. (Abbildung 5) können so verschiedene Proteinfragmente synthetisiert und anschließend getestet werden (Gómez-Saldivar, et al. 2016). Wird eine Domäne als essentiell für die Nukleation identifiziert, können Mutationen dieser die Funktion konkretisieren und Hypothesen bestätigen. Ein vergleichbares Vorgehen wird in dieser Arbeit *ex vivo* im XEE mit den rekombinanten Cdk5rap2Proteinfragmenten durchgeführt.

Bei der Synthese rekombinanter Mel-28 Fragmente sollte ein fluoreszierendes Fusionsprotein hergestellt werden. Daraus ergibt sich der Vorteil, dass das rekombinante Protein im XEE detektiert, immunpräzipitiert und im Western Blot analysiert werden kann.

Anstelle von rekombinanten Proteinen können Anteile der zuvor durch die Depletion gewonnen Mel-28 Beads wieder in das XEE zugegeben werden (8.4 und **Abbildung 11**). Dies ermöglicht die Untersuchung einer erhöhten Konzentration von Mel-28 und die Analyse der Reaktion des Gesamtlängenproteins im depletierten XEE. Eine Beeinträchtigung des Versuchs stellen die noch an den Beads gekoppelten assoziierten Proteine dar, die auch durch stringentes Waschen vermutlich nicht vollends entfernt werden können. Die Fraktion ist nicht „sauber“, sondern enthält auch alle möglichen assoziierenden Proteine.

Hinsichtlich der hier durchgeführten Experimente und der publizierten Datenlagen kann bis dato Mel-28 in der Mitose nur mit zu den MAPs gezählt werden (Yokoyama, et al. 2014). Die biochemische Struktur und Lokalisation von Mel-28 stimmen mit den Kriterien eines Aktivators überein. Für eine genauere Beurteilung der Funktion von Mel-28 als möglichen Aktivator des γ -TuRC müssten noch weitere Experimente durchgeführt und analysiert werden. Schlussendlich kann man daher sagen, dass die Mel-28 Funktion am γ -TuRC nach momentanen Kenntnisstand der Ergebnisse zunächst

aufgabenspezifisch aber nicht aktivatorspezifisch ist. Die Rolle von Mel-28 als möglicher Aktivator am γ -TuRC muss daher noch weiter untersucht werden.

9.7 NME7, ein Hotspot Kandidat als Aktivator des γ -TuRC

Die Nukleosid-Diphosphat Kinase NME7 (NM23-H7 oder NDPK7) erfüllt die besten Voraussetzungen eines Aktivators. Bereits bekannt und in den hier vorgestellten γ -Tubulin Tandem MS/MS bestätigt ist die Lokalisation des Proteins am γ -TuRC (Liu, Choi und Qi 2014). Das zum größten Teil in der Interphase zentrosomal lokalisierte Protein besitzt drei unterschiedliche Domänen: DM10 Domäne, Kinasedomäne A und Kinasedomäne B (Liu, Choi und Qi 2014). Als Funktionskomponente bringt NME7 also zwei Kinasedomänen mit, die eine Reaktion am γ -TuRC katalysieren könnten. Die Nukleosid Diphosphat Kinase katalysiert die Reaktion von zwei Dinukleotide zu einem Trinukleotid und einem Mononukleotid (Adam, et al. 2020). Der Kinasedomäne B wird dabei allerdings keine katalytische Aktivität zugeschrieben, beide Domänen sind jedoch relevant für eine Interaktion mit dem γ -TuRC (Liu, Choi und Qi 2014). Eine Phosphorylierung von Histidin wird durch die NME7 Histidinkinase Aktivität katalysiert (Adam, et al. 2020).

Die funktionellen Voraussetzungen am γ -TuRC sind durch die Kinasedomänen gegeben, jedoch im Detail noch unbekannt. Die Phosphorylierung von Histidin durch NDPK und damit verbundene Aktivitätsänderung konnte allerdings schon in anderen Proteinkomplexen gezeigt werden. Durch die Aktivität der Kinase wird ein noch nicht final geklärt G-Protein-Signalübertragungsmechanismus eingeleitet. Die G-Protein β -Untereinheit (His266) wird phosphoryliert und im weiteren Verlauf vermittelt die Reaktion so die Aktivierung des G-Proteins. Untersucht wurde diese an der Gehirnmembran von Rindern (Cuello, et al. 2003; Engelhardt und Rochais 2007). Schlussendlich sind die NDPKs somit nicht nur rein energetische Kinasen, sondern es entsteht ein durch die Histidinkinase regulierter, vermittelter Mechanismus.

Auf den γ -TuRC sind schon Ser/Thr/Tyr Phosphorylierungen an Komponenten des γ -TuRC wie dem γ -Tubulin (z. B. Ser131) aber auch GCP5 oder GCP6 bekannt (Liu, Choi und Qi 2014; Alvarado-Kristensson, et al. 2009). Eine Phosphorylierung eines Histidins über NME7 muss noch untersucht werden und könnte eine mögliche Antwort auf der Suche eines Aktivators des γ -TuRC sein (Liu, Choi und Qi 2014). Der inaktive Zustand des γ -TuRC kann trotz eines möglichen Nme7 Aktivators zusätzlich durch fehlende Kofaktoren erklärt werden. Durch Kristallstrukturanalysen konnte gezeigt werden, dass Histidinproteinkinase (HPK) Familien wie die HPK3 mit Kofaktoren (Mg^{2+}) interagieren (Wolanin, Thomason und Stock 2002). Mg^{2+} könnte so für Nme7 eine zentrale Kofaktorrolle einnehmen und die katalytische Aktivität der Histidinkinase steigern. Eine Phosphorylierung bewirkt dann die Aktivierung des γ -TuRC. Die Histidinproteinkinaseaktivität von Nme7 ist in Kombination mit einem Kofaktor wie Mg^{2+} ein geeigneter Aktivator des γ -TuRC. Allerdings ist Mg^{2+} bereits im XEE in vorhanden.

Um die Wirkung von Kofaktoren zu testen, könnten Versuch in Anwesenheit von Nme7 und einem Chelator mit hoher Affinität zu Mg^{2+} wie EGTA durchgeführt werden. Ist Nme7 in Verbindung mit dem Kofaktor Mg^{2+} verantwortlich für die Aktivierung des γ -TuRC, so bleibt unter dem Einfluss von EGTA die am Nukleationsursprung vorhandene Assemblierung der MT aus. Ein anderer möglicher Kofaktor könnte eine Modifikation sein.

In diesem Zusammenhang stellt sich daher weiter die Frage, welche Funktionen und Aufgaben Nme7 am γ -TuRC übernimmt. Neben der Assoziation von NME7 am γ TuRC gibt es bereits bekannte Interaktionen am Vorläufer γ TuRC, dem γ TuSC (Farache, et al. 2018). Die Interaktionen am γ -TuSC bekräftigen die Ergebnisse der Tandem MS/MS Analyse und attestieren eine klare Assoziation von Nme7 am γ -TuRC (**Tabelle 1**). Auch der komplementäre Versuch einer Nme7 massenspektrometrischen Analyse (**Tabelle 3**) sowie die Ergebnisse aus den Experimenten der Quantifizierung des Nme7 Proteins (**Abbildung 7**) sind konsistent mit der Koloalisation.

Welche Bedeutung haben demzufolge assoziierende Proteine am Nme7 oder γ -TuRC? In aus der Zellkultur isolierten Zentrosomen und immunpräzipitierten NME7 konnte neben NME7 Interaktionspartner wie γ -Tubulin, GCP2-6 auch CDK5RAP2 detektiert werden (Liu, Choi und Qi 2014) (**Tabelle 3**). Zusätzlich werden mögliche Interaktionspartner und deren Verbindung zu NME7 dabei in Nme7 RNAi knockdowns untersucht. Ohne Nme7 ist keine Veränderung der zentrosomalen Lokalisation des γ -TuRC gegeben, jedoch kann das CDK5RAP2 in diesem Experiment nicht mehr nachgewiesen werden (Liu, Choi und Qi 2014). CDK5RAP2 ist über die schon genannte CM1 Domäne ein direkter Interaktionspartner der GCPs (Lin, et al. 2016). Gcps besitzen sogenannte GRIP Domänen, die für die Interaktion mit dem γ -Tubulin verantwortlich sind (Farache, et al. 2018; Wiese und Zheng, 2000).

Auch die Ergebnisse von Choi, et al. und Liu, et al lassen aus der Immunpräzipitation eine weitere Interaktion des NME7 im Bereich der GCP vermuten (Choi, et al. 2010; Liu, Choi und Qi 2014). In Experimenten von Liu, et al. aus dem Jahr 2014 wird die Auswirkung verschiedener Mutationen von NME7 und deren Einflüsse auf die Katalyseeigenschaften der beiden Kinasedomänen untersucht (Liu, Choi und Qi 2014). In den Untersuchungen werden bis dato die Interaktion des NME7 Proteins mit dem γ -TuRC nur in der Zellkultur untersucht (Liu, Choi und Qi 2014). Nicht analysiert werden die generierten Mutanten in Bezug auf die Ausbildung von MT, ausgehend vom γ -TuRC, im zellfreien System oder im reinem Tubulin. Versuche in komplexen Systemen wie dem XEE (*ex vivo*) ermöglichen Experimente wie Depletionen oder die Addition von Proteinfragmenten in eine physiologische Umgebung und erweitern das Feld der Experimente enorm. In dieser Arbeit werden deshalb Nme7 Interaktionen direkt im XEE untersucht und daraus neue Erkenntnisse gewonnen. Je nach Qualität und Quantität der Ausbildung von MT können Rückschlüsse auf die Aktivatoreigenschaften des Nme7 gezogen werden.

Um die Aussage der *ex vivo* Experimente zu verifizieren ist es wichtig, auch Versuche *in vitro* durchzuführen. In Zellen wird die größte Anreicherung von NME7 und γ -Tubulin am Zentrosom in der Metaphase identifiziert (Liu, Choi und Qi 2014). Das Ergebnis konnte in dieser Arbeit reproduziert werden (**Abbildung 7**). In den XL177 Zellen wird Nme7 vergleichend in der Mitose an den Zentrosomen und den mitotischen Spindeln identifiziert. Aufgrund der Ergebnisse kann man deshalb vermuten, dass Nme7 essentiell für die Ausbildung des γ -TuRC ist. Durch *in vitro* Nme7 RNAi knockdown ist bekannt, dass es auch ohne Nme7 zur zentrosomalen Lokalisation und Ausbildung des γ -TuRC kommt. (Liu, Choi und Qi 2014). In weiteren Experimenten wird die direkte Nukleationsaktivität am γ -TuRC untersucht. Bei Konzentrationen zwischen 6 μ M Nme7 in 10 μ M reinem Tubulin bilden sich MT aus, es sind jedoch keine signifikanten Änderungen in der Anzahl der Strukturen zu beobachten (Thawani, et al. 2020). Die Funktion und Bedeutung von NME7 ist somit final noch nicht geklärt. Es schließt sich die Frage an, ob NME7 die Aktivierung des Nukleators und somit das MT Wachstum wirklich beeinflusst. Regrowth MT Experimente in der Zellkultur (hTERT-PRE1 Zellen) haben gezeigt, dass es zu einer verzögerten Ausbildung der MT in Abwesenheit von NME7 kommt. Das Wachstum der Zelle ist reduziert. Umgekehrt zeigt sich eine erhöhte Aktivität des γ -TuRC nach Zugabe von NME7 (Liu, Choi und Qi 2014). Eine Möglichkeit der Aktivierung liegt auch in der direkten Interaktion von NME7 an γ -Tubulin. Theoretisch könnte auch γ -Tubulin wie das am β -Tubulin vorhandene GTP zu GDP hydrolysieren (Gombos, et al. 2013; Wiese und Zheng, 2006). Bekannt ist, dass es zu keiner konformationellen Änderung beim GDP/GTP γ -Tubulin kommt und dieses für die Mikrotubulieausbildung wichtig ist (Gombos, et al. 2013; Wiese und Zheng, 2000).

Im Sinne eines Aktivators des γ -TuRC sind die genauen Interaktionen und somit auch die Funktionen mit dem NME7 noch nicht hinreichend geklärt. Erschwerend kommt hinzu, dass die genaue Position des NME7 am γ -TuRC bis heute ungeklärt ist (Tovey und Conduit 2018). Hypothesen sprechen von einer kombinierten Wirkung eines CM1 wirksamen Proteins mit Phosphorylierungen, die den γ -TuRC aktivieren (Tovey und Conduit 2018). Im Zusammenhang mit den Untersuchungen von NME7 am γ -TuRC werden überdies die Proteine MOZART 1 und GCP8 identifiziert (Liu, et al. 2019). Zusammenfassend heißt das, dass NME7 eine zentrale Funktion am γ -TuRC einnimmt, die jedoch final noch unbekannt ist. Als nicht einsatzbereiter Aktivator zeigt NME7 erkennbare Evidenzen, die für eine Aktivierung noch weiter untersucht werden müssen.

Grundsätzlich lässt sich also zum jetzigen Zeitpunkt sagen, dass NME7 wahrscheinlich keine strukturgebende, sondern eine regulierende Funktion am γ -TuRC besitzt. Das Protein konnte durch eine Tandem MS/MS am Komplex lokalisiert werden, eine Aktivierung des γ -TuRC über NME7 konnte in dieser Arbeit nicht final beobachtet werden.

9.8 CDK5RAP2 als potentieller Aktivator des γ -TuRC

In mehreren kürzlich veröffentlichten Publikationen wird der γ -TuRC in seiner molekularen Form in der Kryoelektronenmikroskopie untersucht (Wieczorek, et al. 2019; Liu, et al. 2019; Consolati, et al. 2020). Zwei Veröffentlichungen sprechen eindeutig von einer Aktivator-Nukleatorreaktion, die den γ -TuRC von seiner inaktiven in die aktive Form überführt und so die Mikrotubulipolymerisation katalysiert. Als bedeutende Kandidaten zählen die Veröffentlichungen CDK5RAP2 und andere CM1 Domänen beinhaltende Proteine auf (Wieczorek, et al. 2019; Liu, et al. 2019). Bekannt sind bereits geometrischen Veränderung des γ -TuSC durch frühere Veröffentlichungen die eine geschlossenen bzw. offene Form unterscheiden. Vermittelt wird die Strukturänderung über Gcp2 und Gcp3. Bei einer offenen Konformation steigt die Nukleationsaktivität am γ TuRC an (Kollman, et al. 2015; Farache, et al. 2018). Die Funktion der aktiven CM1 Sequenz wird auch als nucleation activator (γ TuNA) bezeichnet (Farache, et al. 2018). Eine solche γ TuNA CM1 Domäne ist N-terminal in Cdk5rap2 enthalten (Barrera, et al. 2010). In Zellen ist CDK5RAP2 in der perizentriolaren Matrix und im Zytosol lokalisiert (Jaiswal, et al. 2021; Fong, et al. 2007; Choi, et al. 2010). CDK5RAP2 abhängiges Wachstum der MT beginnend vom γ -TuRC geht jedoch nur vom Zentrosom und dem Golgi-Apparat aus (Wang, et al. 2010). Beeinträchtigungen des CDK5RAP2 Proteins haben zur Konsequenz, dass es durch den Einfluss auf den γ -TuRC zu Störungen der Mikrotubulinukleation am Zentrosom kommt (Fong, et al. 2007). In *in vitro* Experimenten konnte in gereinigtem Tubulin gezeigt werden, dass ohne γ -TuRC das MT Wachstum ausbleibt. Erst nach der Zugabe von γ -TuRC und 30 nM CDK5RAP2 kommt es zur Ausbildung von MT (Muroyama, Seldin und Lechler 2016).

Um die Funktion des Proteins weiter zu untersuchen wurden verschiedene CDK5RAP2 Fragmenten und Mutationen im XEE untersucht (*ex vivo*). Der Kern der Arbeit richtete sich hierbei allerdings nicht auf Aktivierung des γ -TuRC, sondern vielmehr auf die Bindekapazität des Proteins an γ -Tubulin und die eigentliche CDK5RAP2 Lokalisation (Fong, et al. 2007; Choi, et al. 2010). Aufgefallen ist, dass der isolierte γ -TuRC alleine eine geringe Nukleationsaktivität besitzt. Erst in Kombination mit Proteinen, die eine CM1 Domäne besitzen, steigt die Anzahl der MT (Choi, et al. 2010; Tovey und Conduit 2018). Mit dem Ziel, den Einfluss von CDK5RAP2 auf die Aktivatorfunktion am γ -TuRC zu testen, werden zunächst die hier vorgestellten CDK5RAP2/CM1 Varianten untersucht (**Abbildung 12**).

Angesicht der Ergebnisse der kryoelektronenmikroskopischen Analyse besteht die Hypothese, dass die Änderung des γ -TuRC im Bereich der GRIP1-Domänen der GCP liegt, dem Bereich mit welchem CDK5RAP2 interagiert (Wieczorek, et al. 2019; Liu, et al. 2019). Übereinstimmend mit den in dieser Arbeit untersuchten Varianten wird ein Teil der unterschiedlichen CDK5RAP2 Varianten bereits in Experimenten, *in vitro* oder in Verbindung mit Ran Q69L getestet (Choi, et al. 2010; Liu, et al. 2019). So wird *in vitro* erfolgreich die Bindekapazität eines N-terminalen CDK5RAP2 Fragments (beinhaltet die CM1-Region) nachgewiesen. Ein Effekt auf die Ausbildung der MT wird unter den zwei CDK5RAP2

getestet Varianten *in vitro* nicht beobachtet (3 μ M CDK5RAP2 1-220 & 3 μ M CDK5RAP2 F75A) (Liu, et al. 2019). Gleichzeitig kommt es *ex vivo* zur RanGTP Q69L abhängigen Ausbildung von Asten. Es konnte gezeigt werden, dass es nach der Zugabe von CDK5RAP2 1-220 *ex vivo* zu einem Anstieg der Zahl an Strukturen im Vergleich zur Mutante F75A kommt. Die Anzahl der Strukturen im XEE der CDK5RAP2 Mutante ist vergleichbar mit der Kontrolle XEE (Liu, et al. 2019). Auch andere Labore bestätigten diese Eigenschaften. Im Nukleationsversuch reduzieren sich die Nukleationsereignisse von CDK5RAP2 F75A zum Wildtyp Protein signifikant (Choi, et al. 2010). In Rettungsexperiment in intakten Zellen mit CDK5RAP2 und der Mutante konnte eine klare Orientierung des Proteins an den Spindelpolen nachgewiesen werden. Es kam zum Rettungseffekt der CDK5RAP2 depletierten Zellen durch CDK5RAP2 F75A (Kim und Kunsoo 2014). Geht man einen Schritt weiter und führt einen Regrowth Versuch durch, so zeigt die F75A Mutante eine zeitliche Verzögerung und der Nukleationsschwerpunkt verlagert sich deutlich zum Zentrosom (Choi, et al. 2010; Farache, et al. 2018). Darauf folgend ergibt sich die Frage: Was passiert bei einer zielgerichteten Abschaltung von CDK5RAP2 mittels RNA-Silencing im Regrowth Versuch? Auch hier ist eine veränderte Mikrotubulinukleation im Vergleich zum Wildtyp zu beobachten. Gravierender sind aber die Auswirkungen von γ -Tubulin RNA-Silencing. MT können sich nicht mehr ausbilden (Choi, et al. 2010). Diese Ergebnisse zeigen, dass CDK5RAP2 mit an einer Regulation zur Ausbildung des γ -TuRC beteiligt sein muss (Choi, et al. 2010; Farache, et al. 2018). Ob es sich hierbei um einen direkten oder indirekten Mechanismus handelt, ist nicht bekannt.

In vivo Versuche zeigen eine klare Assoziation von CDK5RAP2 zum γ -TuRC. Um ein besseres Verständnis der Proteininteraktionen zu bekommen lohnt sich der Blick auf *in vitro* Versuche in komplexeren Systemen wie dem XEE, also sogenannte *ex vivo* Versuche.

Strittig ist in diesem Zusammenhang die Frage, ob humane CDK5RAP2 Konstrukte in Versuchen mit XEE gewonnenem γ -TuRC zuverlässige Aussagen zulassen. Eine Abgleichung der Aminosäuresequenzen von *X. l.*, *X. t.* und *H. s.* ist in **Abbildung 13 a** gezeigt. Um sich auch hier Gewissheit zu verschaffen, werden in dieser Arbeit gleichzeitig rekombinante Cdk5rap2 *X. l.* Konstrukte hergestellt und parallel getestet. Eine Problematik ergibt sich aus fehlenden Cdk5rap2 Antikörpern. Kommerziell gibt es just nur anti-humane Antikörper, die C-terminal ausgerichtet sind. Zum ersten Mal wird daher ein Cdk5rap2 Antikörper entwickelt, der zum einen *Xenopus*-spezifisch ist und N-terminales Cdk5rap2 erkennt. Eine Cdk5rap2 Depletion aus dem XEE ist ein zentrales Experiment um das Protein als möglichen Aktivator des γ -TuRC weiter zu untersuchen. Trotz unterschiedlicher Methoden ist es leider nicht gelungen Cdk5rap2 aus dem XEE zu depletieren. Um dennoch die Auswirkungen einer Depletion abschätzen zu können werden bereits bekannte Ergebnisse aus CDK5RAP2 RNAi Versuchen analysiert. In der Literatur ist der knockdown von Cdk5rap2 und dessen Auswirkung auf den γ -Tubulin-Gehalt beschrieben. Eine Reduktion von Cdk5rap2 hat drastische Effekte auf die spätere Ausbildung der MT (Muroyama, Seldin und Lechler 2016)

In Versuchen mit der XL177 Zelllinie konnte quantitativ erstmalig gezeigt werden, dass sich das Cdk5rap2 Signal über die Mitosestadien verändert. Das Signal nimmt bis zur Metaphase um das Vierfache zu (**Abbildung 16**). Im Vergleich dazu ist die gemessene Intensität des γ -Tubulinsignals nur um das 1,5-fache gestiegen und verhält sich wie in den anderen Experimenten (Piehl, et al. 2004). Aus dem Ergebnis lässt sich die Vermutung ableiten, dass Cdk5rap2 im Laufe der Mitose im Bereich der Spindelpole eine essentielle Funktion übernimmt. In den von uns durchgeführten Tandem MS/MS Analysen konnten keine Cdk5rap2 Proteinfragmente detektiert werden. Wie bereits thematisiert, könnte ein Grund in den einzelnen Waschschrritten liegen. Die Tatsache, dass Cdk5rap2 in den Tandem MS/MS nicht mehr vorhanden ist unterstützt die These, dass der Aktivator verloren geht und nicht mehr zur Verfügung steht.

Um diese Funktion des Proteins weiter zu untersuchen werden Cdk5rap2 Nukleationsversuche in reinem Tubulin durchgeführt (*in vitro*). Die Versuche zeigen für einige der *X. l.* Cdk5rap2 Fragmente eine deutlich gesteigerten Mikrotubulipolymerisation. Die nach Liu et al. beschriebene CM1- γ TuRC Bindestelle ist in der Fragmentvariante WT 1-27 *X. l.* vorhanden (Liu, et al. 2019). Das kurze Fragment zeigt sowohl im Extrakt wie auch im reinem Tubulin eine gesteigerte Mikrotubulieausbildung.

Für die verschiedenen Mutanten F16A sieht man nicht nur in der kurzen Variante, sondern auch für die lange Variante *X. l.* Mu F16A As 1-220, eine Reduktion in der Anzahl der Strukturen in beiden Versuchen (*ex vivo* und *in vivo*). Es wurde gezeigt, dass die in der Literatur beschriebenen *in vitro* Ergebnisse auf komplexere Systeme (*ex vivo*) übertragbar sind (Lin, et al. 2016; Choi, et al. 2010).

CDK5RAP2 ist vermutlich nicht als alleiniger Aktivator des γ -TuRC verantwortlich. Gewisse Kofaktoren bzw. Proteine sind vorstellbar (Muroyama, Seldin und Lechler 2016). Änderungen am γ -TuRC könnten auch in Kombination mit einem Targeting Faktor wie Nedd1 ausgelöst werden. Nedd1 könnte posttranslationale Modifikationen bewirken oder aktiv/passiv eine Modulierung von Assoziationsfaktoren des γ -TuRC beeinflussen (**Abbildung 21**) (Muroyama, Seldin und Lechler 2016; Conduit 2019). Es steht fest, dass Nedd1 und Cdk5rap2 für die Rekrutierung des γ -TuRC mitverantwortlich sind und vermutlich auch Nedd1, neben Cdk5rap2, die Verankerung des Komplexes im MTOC ermöglicht (Muroyama, Seldin und Lechler 2016; Conduit 2019).

Zusammenfassend kann man daher sagen, dass Cdk5rap2 ein Protein ist, das als Anker und zur Lokalisation des γ -TuRC am MTOC fungiert (Farache, et al. 2018). Gleichzeitig bestätigt sich in dieser Arbeit die Evidenzen, dass Cdk5rap2 maßgeblich an der Ausbildung von MT und mit Sicherheit auch an der Nukleation des γ -TuRC beteiligt ist. Cdk5rap2 ist ein aktivierendes Protein des γ -TuRC.

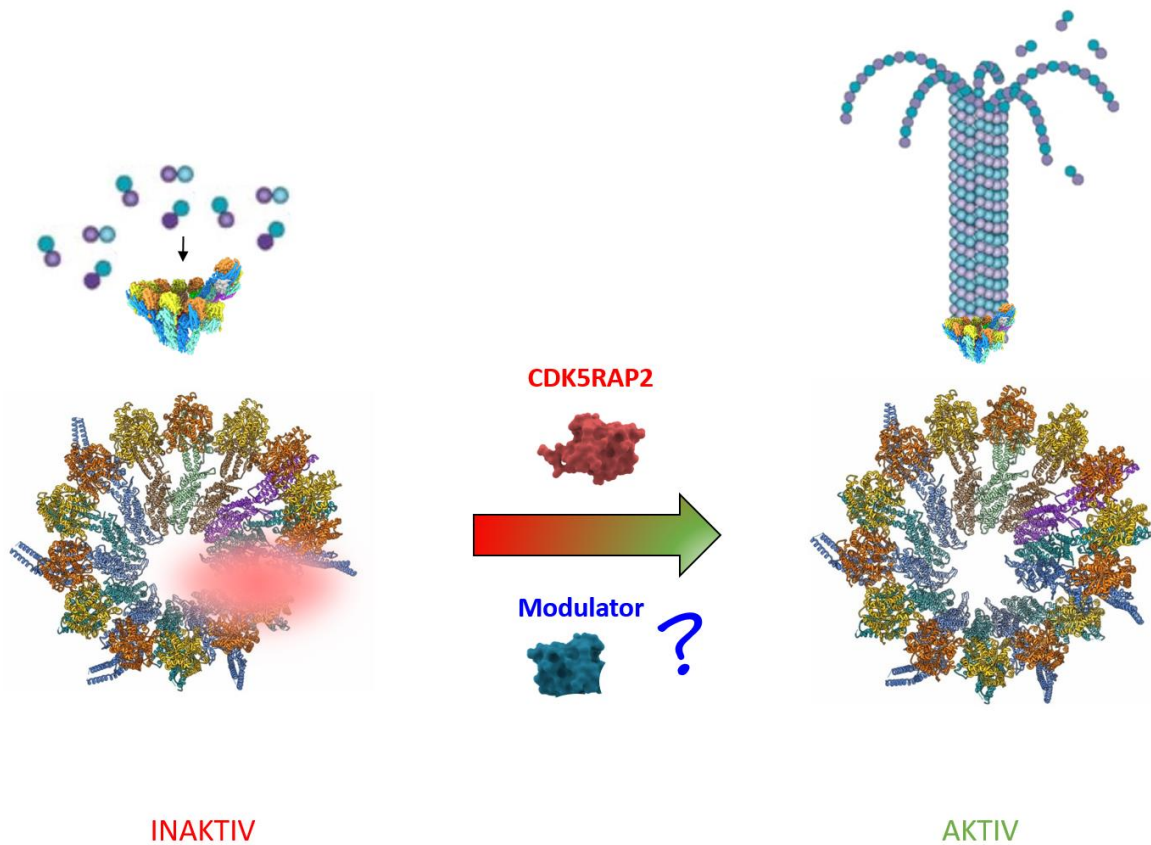


Abbildung 21 Aktivierung des γ -TuRC durch CDK5RAP2 und einen weiteren unbekanntem Modulator

Der γ -TuRC wird durch CDK5RAP2 sowie einen weiteren Modulator in seine aktive Form überführt. Resultierend kommt es zum Wachstum der MT. Rot schattiert ist die Region, die die höchste Regung zeigt und maßgeblich an der Neuorientierung des Rings beteiligt ist (veränderte Abbildung nach (Liu, et al. 2019; Alberts, et al. 2015; Conde und Caceres 2009).

Es bleibt demnach noch die Frage offen, ob ein weiteres Protein an der Aktivierung des γ -TuRC z. B. als Modulator beteiligt ist (**Abbildung 21**). Neben den in der Tandem MS/MS detektierten Proteinen sollten deshalb die schon mit den MT assoziierenden, bekannten Proteine weiter untersucht werden. Als mögliche weitere Kandidaten kommen hier die in der Literatur bereits als Interaktionspartner des γ -TuRC und MT assoziierenden, beschriebenen Proteine Tpx2, Xmap215 oder Nedd1 in Frage. Gleichzeitig muss auch die Kombination von Proteinen berücksichtigt werden. So sollte in etwa. Cdk5rap2 in Kombination mit Nme7 getestet werden.

9.9 Bekannte und alternative Interaktionspartner von MT und des γ -TuRC

Die biochemischen Analysen dieser Arbeit haben klar gezeigt, dass es eine Vielzahl an assoziierenden und interagierenden Partnern am γ -TuRC gibt. Ausgehend vom γ -TuRC findet die Assemblierung der MT statt, zudem assoziieren die MT mit Proteinen wie Tpx2 und Xmap215. So ist Tpx2 für die Stabilität der MT verantwortlich und reduziert die Katastrophen, die eigentliche MT Depolymerisation (R. Zhang, et al. 2017; Wieczorek, et al. 2015). Xmap215 leitet das MT-Wachstum ein, indem es die Wachstumsrate steigert und als Tubulin Shuttle der MT fungiert (Brouhard, et al. 2008). Untersuchungen beider Proteine, Tpx2 und Xmap215, haben eine gesteigerte Aktivität am γ -TuRC gezeigt (R. Zhang, et al. 2017; Consolati, et al. 2020; Alfaro-Aco, Thawani und Petry 2017; Thawani, Kadzik und Petry, 2018).

Insofern stellt Xmap215 aus *Xenopus laevis* (*Homo sapiens* Ortholog ist chTOG) einen weiteren Kandidaten für eine mögliche aktive Assemblierung von MT dar. Im Rahmen der Mitose ist Xmap215 in einem Multiproteinkomplex organisiert, der für die Organisation, Stabilität, Reifung und Bildung der MT verantwortlich ist (Neumayer, et al. 2014). Ferner ist es am Plus-Ende der MT orientiert (Wachstumsrichtung), was wiederum nicht für einen Aktivator oder möglichen Modulator spricht (Gard und Kirschner 1987). In *ex vivo* Experimenten in XEE wird gezeigt, dass es bei der Immundepletion von Xmap215 zu einer verminderten Ausbildung von Astern kommt. Gleichzeitig verlagert sich das Gleichgewicht der Mikrotubulipolymerisation in Richtung des Mikrotubuliabbaus, der Katastrophe (Kinoshita, Habermann und Hyman 2002). In reinem Tubulin (*in vitro*) konnte eine stimulierende Wirkung von XMAP215 auf die Mikrotubulinukleation nachgewiesen werden (Consolati, et al. 2020). Das Problem des assays ist allerdings, dass keine Unterscheidung zwischen Wachstum und Nukleation vorgenommen werden kann.

Die stimulierende Wirkung von XMAPS215 auf die MT Nukleation konnte auch an bereits existierenden MT nachgewiesen werden. Guanosine-5'-(α,β)-methylentriphosphat (GMPCPP) ist ein langsam hydrolysierendes Analogon des GTP und wird in Kombination mit MT gerne als Nukleationsursprung, alternativ zum γ -TuRC eingesetzt. In Verbindung mit GMPCPP stabilen MT konnte gezeigt werden, dass es zu einer schnelleren Polymerisierung von MT unter dem Einfluss von XMAP215 kommt (Wieczorek, et al. 2015). In dieser Arbeit wird Xmap215 in der hier untersuchten biochemischen, massenspektrometrischen Analyse jedoch nicht detektiert (**Tabelle 1**). Der Grund hierfür könnte in den unterschiedlichen, stringenten Waschbedingungen liegen und schließt Xmap215 nicht zwingend als Aktivator/Modulator aus.

In den Experimenten hier nicht untersucht, aber als alternativer γ -TuRC Aktivator bzw. Modulator denkbar ist Tpx2. Bereits bekannt ist die stimulierende Wirkung auf die Nukleation *in vitro* (7.2.2) (Alfaro-Aco, Thawani und Petry 2017; Gruss, et al. 2001). Consolati, et al. bestimmten eine gesteigerte, TPX2 abhängige Mikrotubulinukleation an immobilisierten γ -TuRC in reinem Tubulin. Die

physiologische TPX2 Konzentration für eine Nukleation war um ein Vielfaches niedriger (Consolati, et al. 2020). Vermutet wird, dass in diesem Zusammenhang die Wirkung von TPX2 vermittelter γ -TuRC Nukleation einem alternativen Mechanismus zugrunde liegt. Wahrscheinlich lässt sich die Depolymerisation der MT unterdrücken und nicht wie bei XMAP215 die Polymerisation stabilisieren.

9.10 Fazit

Ein Aktivator des γ -TuRC muss drei Eigenschaften mitbringen. Erstens muss der Kandidat für eine Aktivierung des Nukleators in unmittelbarer Umgebung lokalisiert sein. Nur so kann es zu einer Assoziation kommen. Zweitens müssen die biochemischen Eigenschaften stimmen. Die Interaktion eines Aktivators mit dem γ TuRC muss gewährleistet sein. Zu guter Letzt muss die Funktion gegeben sein. Die Funktion folgt gesetzmäßigen Zusammenhängen. Unter dem Einfluss eines Aktivators kommt es zur Ausbildung eines aktiven, funktionsfähigen γ -TuRC. Die Nukleationseffizienz wird um ein Vielfaches erhöht (**Abbildung 1 a**).

Auf der Basis biochemischer Untersuchungen mittels Tandem MS/MS und Western Blot werden Kandidaten wie Sec23/Sec24, Nme7, Mel-28 oder Cdk5rap2 als mögliche Aktivatoren identifiziert und analysiert. CDK5RAP2 ist nach den in dieser Arbeit untersuchten Kriterien, aus der Zahl der getesteten Kandidaten der plausibelste Kandidat, mit den postulierten Eigenschaften, der Aktivator des γ -TuRC zu sein.

Schlussendlich konnte eine erhöhte Anzahl von MT unter dem Einfluss eines Cdk5rap2 Aktivators in *ex vivo* und *in vitro* Experimenten bestimmt werden. Es bleibt noch die Frage offen, ob es eine weitere Komponente (einen weiteren Modulator) gibt, die in Kooperation mit dem Aktivator die Nukleation sowohl positiv wie auch möglicherweise negativ beeinflussen kann. Die Resultate aus den Experimenten überzeugen, dass es nach momentanem Wissenstand einen Aktivator geben muss. CDK5RAP2 ist unter den hier untersuchten Kandidaten der bestmögliche Aktivator.

10 Methoden

10.1 Haltung *Xenopus laevis*

Die Frösche werden dauerhaft in Wasserbehältern in einem Tierverband von drei bis sechs Tieren gehalten. Dabei kommen zwei Haltungsboxen zum Einsatz. In einer Haltungsbox von 15 l werden maximal 3 Tiere gehalten und in einer Haltungsbox von 25 l werden maximal 6 Tiere gehalten. Alle Becken sind über eine Filteranlage miteinander verbunden. Der regelmäßige Austausch mit Frischwasser ist gewährleistet. Die Raumtemperatur beträgt dauerhaft 18 °C. Die Wasserwerte werden kontinuierlich gemessen und kontrolliert (Temperatur 16 °C; der pH – Wert 6,8-7,2 und Leitfähigkeit 1200 - 1600 µS.) Der Tag- Nachtrhythmus beträgt das ganze Jahr über jeweils 12 Stunden. Eine Fütterung mit Trockenfutter findet zwei Mal wöchentlich mit pelletiertem Fertigfutter (Aquatic 3) statt (**Tabelle 13**). Die Reinigung der Anlage wird einmal im Monat und nach Bedarf vorgenommen. Natürlich verstorbene Tiere werden mindestens zwei Wochen bei – 20 °C gelagert um mögliche Infektionskrankheiten nachvollziehen zu können. Während der Versuche kam es zu keiner Kontamination im gesamten Tierverband. Injektionen der Tiere werden mit einer Insulinspritze mit der Nadelgröße 0,45 x 12 mm vorgenommen.

10.2 Präparation *Xenopus*-Ei-Extrakt (XEE)

Die Frösche werden 3 - 10 Tage vor der eigentlichen Injektion mit Ovogest (Choriongonotropin) 50 I. E. oder 100 I. E. Intergonan (Gonadotropin) präinjiziert. Für eine Eiablage am nächsten Tag werden die Tiere 18 Stunden vorher mit 500 - 800 I.E. injiziert. Die Injektion wird den Tieren subkutan lateral/dorsal der Wirbelsäule im Bereich der Lymphe verabreicht. Die Frösche werden danach einzeln in Eiablageboxen, gefüllt mit ca. 1 l 1x MMR, gesetzt. Am Tag der Extraktpräparation werden die Tiere wieder in ihre Sammelbox überführt, die abgelegten Eier befinden sich in den einzelnen Boxen und werden in Bechergläsern gesammelt. Je nach Menge der vorhandenen Eier der einzelnen Frösche können diese im weiteren Verlauf gesammelt oder separat behandelt werden. Alle Schritte müssen mit absoluter Sorgfalt und Vorsicht durchgeführt werden, Erschütterungen sind auf Grund der fragilen Eier zu vermeiden. Die Eier werden mehrmals mit 1 x MMR gewaschen. Apoptotische, aufgeschnürte und unnatürliche Eier werden mit Hilfe einer Einwegpipette selektiert und verworfen. Vor der weiteren Behandlung muss die Gallerthülle der Eier entfernt werden. Dazu wird das MMR soweit wie möglich abgenommen und durch die frisch angesetzte Degelierungslösung ersetzt. Die Degelierungslösung wird nach kurzer Zeit gewechselt. Die Inkubationszeit ist abhängig von Degelierungszustand der Eier, sollte jedoch 5 min nicht überschreiten. Das in der Degelierungslösung vorhandene Cystein dringt in die Gallerthülle ein, bricht die Disulfidbrücken der Gallertproteine auf wodurch die Hülle entfernt wird.

Danach werden die Eier zunächst zweimal in XB-Lösung und anschließend zweimal in XB-CSF Lösung gewaschen. Bevor die Eier in die 5 ml Beckman Zentrifugationsröhrchen überführt werden können, müssen diese mit 1 ml XB-CSF und 1 μ l Cytochalasin D/B (10 mg/ml) gefüllt werden. Mit Hilfe von Adaptern können die Tubes in Corex Glasröhrchen überführt werden, welche dann in Gummiadaptoren gelagert werden. Im Anschluss werden die Eier in der bei 18 °C vorgekühlten Heraeus Multifuge 3 S-R Benchtop Zentrifuge im Swing-out-rotor zunächst für 30 Sekunden bei 700 g und weiter bei 1400 g gepackt. Die Zentrifuge läuft ohne Bremse aus. Der Überstand an XB-CSF wird vollständig abgenommen. Die Röhrchen werden in den JS-13.1 Beckman Coulter Rotor überführt und bei 11000 rpm für 25 min bei einem Temperaturgradienten bis 4 °C ohne Bremsen zentrifugiert. Nach der Zentrifugation sieht man eine Anordnung verschiedener Schichten. Unterhalb der gelben Lipidschicht befindet sich das Eiextrakt. Das Eiextrakt wird durch eine Insulinspritze mit einer Injektionsnadel von 0,90 x 40 mm durch das Beckman Zentrifugationsröhrchen entnommen. Ohne die Nadel wird das Extrakt aus der der Insulinspritze in ein Reaktionsgefäß überführt. Nach der Zugabe von 1 μ l einer 1:10 Verdünnung Cytochalasin D/B (10 mg/ml) in XB-CSF wird das Extrakt vorsichtig zu einer homogenen Masse suspendiert. Danach kann das Eiextrakt verwendet werden, alternativ kann das Extrakt in Flüssigstickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert werden. Alle Versuche mit Eiextrakt müssen mit abgeschnittenen, stumpfen Pipettenspitzen unter strenger Temperaturkontrolle durchgeführt werden. Extrakte können grundsätzlich für den Zeitraum des Versuches auf Eis aufbewahrt werden (max. 4-6 h).

10.3 Funktionstest *Xenopus*-Ei-Extrakt

Eingefrorene und frische Extrakt werden vor der jeweiligen Anwendung im Versuch auf ihre Funktionalität untersucht. Hierfür wird das eingefrorene Extrakt zunächst schnell bei Raumtemperatur aufgetaut bzw. frisch verwendet. Anschließend wird eine Probe von 18 μ l entnommen. Zu der Probe werden 2 μ l markiertes Cy3-Tubulin (0,2 μ M) sowie eine finale Konzentration von 20 μ M RanGTP (Gruss, et al. 2001) hinzugegeben. Die Extraktsuspension wird für 30 min in einem 18 °C Wasserbad inkubiert. Nach der Inkubationszeit werden 1,8 μ l der Suspension entnommen und mit der Fixierlösung auf einem Objektträger fixiert.

Aktives Eiextrakt formiert Spindel, die in einzelner oder gesammelter Form vorliegen. Sind keine Spindeln vorhanden, so handelt es sich um Extrakt in der Interphase. In diesem Fall sieht man keine Ausbildung von Spindeln bzw. nur Schliere. Als Positivkontrolle kann stets DMSO zum Extrakt gegeben werden.

10.4 Markiertes Cy3-Tubulin

Um MT im Eiextrakt oder im Funktionsversuch unter dem Fluoreszenzmikroskop sichtbar zu machen, wird ein Teil der Tubulinmdimere mit Cyanin-Farbstoff 3 (Cy3) (Ausgangskonzentration 0,2 μM) markiert. Diese werden dann in geringer Konzentration (Verdünnung min. 1:50) zum jeweiligen Versuch hinzugegeben und dementsprechend in MT eingebaut. Das gereinigte Tubulin wird nach den Protokollen von Castoldi und Popov 2003 und Borisy, et al. 1975 gewonnen und wird durch die Arbeitsgruppe durch das Labor von Prof. Dr. Schiebel zur Verfügung gestellt.

Die Kopplung des Cy3 wird entsprechend nach dem Protokoll von Peloquin, Komarova und Borisy 2005 durchgeführt. Für die Polymerisation des Tubulin wird das Tubulin (504 μl (23 mg/ml, 116 nmol)) GTP 100 mM (8,25 μl (1 mM Endkonzentration)) Glycerin 86 % (320 μl ; 33 % Endkonzentration) und MgCl_2 1 M (0,83 μl ; 1 mM Endkonzentration) bei 37 °C für 30 min inkubiert. Anschließend wird die Suspension auf 2 x 0,5 ml High pH Kissen gelegt und bei 80.000 rpm im TLA120.2 bei 37 °C für 20 Minuten zentrifugiert. Anschließend wird der Überstand abgenommen, die Interphase mit vorgewärmten Markierungspuffer gespült und im Anschluss das high pH Kissen abgenommen.

Als nächstes folgt die Markierung der Polymere mit Cy3. Dafür wird zunächst das Tubulin-Pellet in 150 μl warmen Markierungspuffer resuspendiert. Der aktive Cy3 Farbstoff wird frisch in DMSO aufgenommen (stöchiometrische Konzentrationen: 100 mM Enzkonzentration bei 1,25 mg Cy3: 16,25 μl Farbstoff). Es wird das 7-fache des molaren Überschusses an Farbstoff zum Tubulin hinzugegeben. Bei einer Ausbeute von ca. 70 % im ersten Pelletierungsschritt (80 nM) sind dies 400 nM Farbstoff (~ 5,5 μl). Die Markierungsreaktion dauert 15 min bei 37 °C, wobei alle 5 min der Ansatz resuspendiert wird. Anschließend wird ein Volumen Quenchlösung (ca. 150 μl) für 15 min bei 37 °C hinzugegeben. Das Quenching soll die aktive Gruppe, den N-Hydroxysuccinimidester absättigen. Der Ansatz wird auf 0,5 ml low pH Kissen gegeben und bei 80.000 rpm für 20 min bei 37 °C im TLA120.2 zentrifugiert.

Für die folgende Depolymerisation wird zunächst der Überstand abgenommen, die Interphase mit warmem BRB80-Puffer gespült und im Anschluss das low pH Kissen vollständig entfernt. Das Cy3 markierte Pellet wird nun in 100 μl eiskaltem BRB80-Puffer resuspendiert und mindestens für 60 min auf Eis inkubiert. Nach der Inkubation wird die Probe bei 80.000 rpm für 10 min bei 2 °C zentrifugiert (TLA120.2) Das markierte Tubulin befindet sich im depolymerisierten Zustand im Überstand. In kleinen 2 μl Aliquotes kann dieses nun in flüssig Stickstoff schockgefroren und in späteren Versuchen verwendet werden.

Um die Effizienz und Ausbeute zu bestimmen kann die optische Dichte bei 280 und 550 nm in einer 1:200 Verdünnung gemessen werden. Ein Funktionstest kann in einer 1:250 Verdünnung mit nicht markierten Tubulin erfolgen oder im *Xenopus*-Ei-Extrakt. Die Konzentration wird mit 0,2 μM bestimmt.

10.5 Analyse von Proteinfragmenten im XEE

Analog zum Funktionstest werden RanGTP, Cy3-Tubulin sowie das Proteinfragment zum XEE (20 µl) gegeben. Unterschiedliche Konzentrationen sind an gegebener Stelle beschrieben, als Kontrolle werden die Proben mit Dialysepuffer behandelt. Der Ansatz wird vorsichtig mit stumpfer Spitze resuspendiert. Im Anschluss erfolgt eine 30-minütige Inkubation auf Eis und danach eine Inkubation bei 18 °C im Wasserbad. Nach 30 und 50 Minuten wird eine Probe (1,8 µl) abgenommen und mit der Fixierlösung (1,8 µl) auf einem Objektträger fixiert. Danach können die Proben unter dem Mikroskop ausgewertet werden.

10.6 Saccharose Gradient

Um Proteine/Proteinkomplexe und deren Assoziation im Extrakt nachweisen zu können, werden Saccharose Gradienten analysiert. Hierfür wird einen Tag vor dem Versuch ein Saccharose Gradient in einem Beckman Zentrifugationsröhrchen hergestellt. Es werden von unten nach oben 40 %, 30 %, 20 % und 10 % Saccharose Lösungen (je 550 µl) geschichtet. Die Saccharose Lösungen mischen sich in den Übergängen der Konzentrationsunterschieden bei 4 °C üN. Am Folgetag werden die Eiextrakte (je 75 µl Eiextrakt) für 30 Minuten mit den jeweiligen Proteinen/Komponenten auf Eis inkubiert und anschließend auf die Zentrifugationsröhrchen mit den Saccharose Gradient pipettiert. Die einzelnen Konzentrationen und Komponenten können dem Ergebnisteil entnommen werden. Die Gradientenröhrchen werden bei 100.000 g für 150 Minuten bei 4 °C zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wird der Gradient in Fraktionen von je 50 µl von oben abgenommen. 20 µl der abgenommenen Probe werden mit 60 µl Probenpuffer versehen und dienen zur Analyse in SDS-Page oder im Western Blot (10.19).

10.7 Klonierung verschiedener Cdk5rap2 Fragmente in pGEX-6P1

Nach der Injektion von *Xenopus laevis* wird das *Xenopus*-Ei-Extrakt nach dem Protokoll beschriebenen hergestellt. Aus dem Eiextrakt wird im Anschluss mit Hilfe des First Strand cDNA Synthesis Kits auf der Basis von Oligo (dt) Primern die cDNA synthetisiert. Die so gewonnene cDNA wird als Template für die Standard-PCR (13.3) verwendet. Als Primer werden die cDNA-Cep215 AS 1-220 X. l. forw. und cDNA-Cep215 AS 1-220 X. l. rev. eingesetzt (11.8). Analog wird das DNA Fragment cDNA-Cep215 AS 1-139 +N193 synthetisiert. Die amplifizierten Fragmente (Insert) werden über ein 0,8 % Gel gereinigt und im Anschluss mit den entsprechenden Restriktionsenzymen nach Herstellerprotokoll verdaut. Wichtig ist ein entsprechender Verdau des Leervektor pGEX-6P1 mit den analogen Restriktionsenzymen des Inserts. Nach der Restriktionsinkubationszeit wird der Vektor sowie das Insertionsfragment über ein 0,8 % Agarosegel aufgetrennt, ausgeschnitten und mit dem Gelextraktionskit der Firma Qiagen gereinigt (10.8.1). Die Ligation erfolgt nach Herstellerprotokoll mit der T4 Ligase bei 16 °C über Nacht. Die Hälfte des Volumens (10 µl) wird nach Inkubation in *Escherichia coli* (*E. coli*) DH5-Alpha transformiert. Es folgt die in Kapitel 10.8.1 beschriebene Plasmidpräparation. Im Anschluss wird eine Probeverdau mit den Restriktionsenzymen (BamH1 und Sal1) durchgeführt und der Verdau auf ein Gel aufgetragen. Fällt das Insertionsfragment in gewünschter Größe aus, so wird das synthetisierte Plasmid zur finalen Kontrolle zur Sequenz verschickt. Nach erfolgreicher Kontrolle der Sequenzierung kann die Synthese der rekombinanten Proteine durchgeführt werden.

Die unterschiedlichen Vektoren der Wildtypfragmente *X. l. Cdk5rap2* 187 bis 27 werden auf der Grundlage des Vektors pGEX-6P1-cep215-1-220-WT (*X. l.*) synthetisiert. Dabei dient der Vektor als Vorlage und wird mit Hilfe der entsprechenden Primer im Bereich des CDK5RAP2 Abschnittes verkürzt. Die Restriktion, Reinigungen, Ligation und Kontrolle erfolgt analog des zu dem oben beschriebenen Verfahren des Ursprungsvektors. Bei jedem Ansatz wird eine Kontrolle ohne Insertionsfragmente mitgeführt.

Die Mutanten F16A wird nach der in Kapitel 13.3 Mutations-PCR generiert. Das entsprechende WT-Vektor Plasmid dient als Vorlage. Zunächst werden zwei PCR Ansätze mit jeweils nur einem Primerpaar parallel im Thermocycler für 15 Zyklen inkubiert. Zu beachten ist eine niedrige Annealing Temperatur der Primer, die die Mutation setzen und somit nicht zu 100 % auf das Template passen. Nach Ablauf der 15 Zyklen werden die Ansätze zu den jeweils passenden analogen Primern gegeben. Anschließend wird eine Standard-PCR nach Herstellerprotokoll durchgeführt. Nach der PCR wird das Template durch das Enzym Dpn1 über Nacht verdaut. Das Enzym Dpn1 verdaut nur methylierte DNA, und somit nur den Ursprungsvektor (5' CA^{CH3} >< TC 3') Der Reaktionsansatz kann jetzt in *E. coli* DH5-Alpha transformiert werden. Um die Effizienz des Dpn1 Verdau der Mutations-PCR zu kontrollieren wird ein

Reaktionsansatz ohne Primer mitgeführt. Bei jedem Ansatz wird eine Kontrolle ohne Insertionsfragmente mitgeführt.

Die humanen pGEX-6P1- Cep215 Konstrukte wurden durch Peng Lui aus der Arbeitsgruppe Professor Doktor Elmar Schiebel zur Verfügung gestellt.

10.8 Transformation freier DNA in Bakterien

Zur Vervielfältigung von DNA wird das Bakterium *E. coli* DH5-Alpha verwendet. Die Eigenschaft *der E. coli* DH5-Alpha liegt in einer hohen Transformationsrate freier DNA in die kompetenten Bakterien. Gleichzeitig charakterisiert die Bakterien eine niedrige Restriktion- und Rekombinationseffizienz (Kottwitz 2005).

Die rekombinanten Proteine werden in dem Bakterium kompetenten *E. coli* Rosetta™(DE3) Rosetta Wirtstamm BL 21 exprimiert. Der Wirtstamm enthält neben inaktiven Proteasen zusätzliche Basentriplets der tRNAs, um seltene Codonsequenzen auszugleichen. Für eine effiziente Proteinproduktion unterliegt die T7 RNA Polymerase einem lacUV5 Promotor. Dieser wird durch die Zugabe von IPTG aktiviert (Kottwitz 2005; Merck 2004).

Zunächst wird das jeweilige Plasmid (250 ng) in die kompetenten Zellen transformiert. Dafür wird die DNA zu den Bakterien gegeben. Nach einer Inkubation von 25 min auf Eis erfolgt für 1 min ein Hitzeschock bei 42 °C im Thermoblock. Direkt nach der Behandlung werden die Bakterien für 3 min auf Eis abgekühlt und 1 ml LB⁰ Medium hinzugefügt. Nach der Inkubation werden die Bakterien für 45 min bei 37 °C unter ständigem Schütteln (800 rpm) inkubiert. Anschließend werden die Bakterien bei 5.000 rpm für 1 min bei RT zentrifugiert und auf einer bereits vorbereiteten LB Platte mit entsprechendem Antibiotikum zur Selektion ausgestrichen. Bei 37 °C erfolgt die Inkubation im Wärmeschrank über Nacht. Das Antibiotikum dient der Selektion der resistenten Bakterien, denen nach erfolgreicher Transformation eine Antibiotikaresistenz vermittelt wird.

10.8.1 Plasmidpräparation

Nachdem die Bakterien auf der jeweiligen Platte gewachsen sind, werden einzelne Kolonien gepickt und in Flüssigkulturen mit entsprechendem Selektionsmedium (LB + Antibiotikum) überimpft. Die Kulturen wachsen bei 37 °C üN. Für die Gewinnung geringer DNA Mengen (Mini-Präparation) werden 1 ml, für die Gewinnung von großen Mengen DNA (Midi-Präparation) 50 ml Bakteriensuspension benötigt. Die Isolierung der DNA durch die Mini-Präparation wird mit den Materialien und nach dem Protokoll von Macherey-Nagel, Düren durchgeführt. Die Midi-Präparation wird mit den Materialien und nach dem Protokoll von Invitrogen, Carlsbad durchgeführt

10.9 Proteinexpression und Reinigung

10.9.1 Proteinexpression

Von einer ÜN bewachsene LB-Platte wird eine Kolonie gepickt und in eine LB Vorkultur 100 ml mit entsprechendem Antibiotikum überführt. Die Kulturflüssigkeit wächst bis zu einer optischen Dichte (OD 600 nm) von 0,4 im Inkubator bei 37 °C; 220 rpm. Anschließend wird 100 ml Vorkultur in 1 l 2-YT-Medium mit entsprechendem Antibiotikum überführt. Die Kultur wächst bei 37 °C; 220 rpm bis zu einer OD von 0,8 an. Es folgt ein 5-minütiger Kälteschock auf Eis. Anschließend wird die Proteinexpression mit 1 mM IPTG induziert. Die Bakterienkultur wird bei 20 °C ÜN; 220 rpm inkubiert. Am Folgetag werden die Bakterien bei 5.000 rpm (~ 3500 g); 20 min; 4 °C zentrifugiert. Das Bakterienpellet wird in eiskaltem 1x PBS gewaschen und anschließend in Lysepuffer überführt (ca. 20 ml). Die Bakterien werden mittels Ultraschall lysiert (70 % ;5 x 5 min mit Inkubation zwischendurch auf Eis). Das Homogenisat wird bei 18.000 rpm (40.000 g) für 25 min bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand enthält das Protein und wird gesammelt.

Um die Effizienz der Proteinexpression zu ermitteln werden, jeweils folgende SDS-Proben während der Proteinexpression und dem Lysat genommen. Die erste Probe wird direkt vor der Proteininduktion mit IPTG genommen. Die erfolgreiche Induktion wird mit der zweiten Probe nach der Inkubation, kurz vor dem Ernten der Bakterien genommen. Nach dem Ultraschallaufschluss und anschließender Zentrifugation des Bakterienlysates werden Proben 3 und 4, Überstand und Pellet genommen. Um die Proteinexpression mittels der SDS-Proben im Nachhinein zu vergleichen müssen die jeweiligen Mengen an die Ausgangs-OD bzw. die Volumina angeglichen werden.

10.9.2 Proteinreinigung

Mittels Affinitätsreinigung durch Glutathione Sepharose werden die GST-Tag Proteine aus der Proteinexpression (10.9.1) gereinigt. Es wird nach der Anleitung der Firma Thermo Fisher, Waltham in der Batch-Methode verfahren. Die gewonnenen Fraktionen, welche nach Elution das Zielprotein beinhalten, werden auf einem 10 % SDS-Gel kontrolliert (10 µl Probe Fraktion + 10 µl Probenpuffer). Die Fraktionen mit den meisten Proteinen werden gesammelt und dialysiert. Dafür werden die Proben in einen Dialyseschlauch überführt und dreimal über 12 h gegen den Dialysepuffer I dialysiert. Das Protein, welches sich im Dialyseschlauch befindet, wird gesammelt und in einem Proteinkonzentrator unter 4.000 x g konzentriert. Das finale Volumen sollte zwischen 0,8 – 1 ml betragen. Die Konzentrationen einer jeden Probe werden über einen BSA-Vergleich bestimmt.

Proteine die sich im Bakterienpellet (Einschlusskörperchen, inclusion bodies) befinden, werden mit Hilfe einer Elektrophorese gereinigt. Hierfür werden zunächst Teile des Pellets im 1:5 Verhältnis in Probenpuffer gelöst und gekocht. Im Anschluss wird ein präparatives 10 % SDS-Gel gefahren und dieses

danach für 3 min in 3 M eiskaltes Kaliumchlorid gelegt. Nach 2 min werden die Proteinbanden sichtbar. Die gewünschte Proteinbande wird ausgeschnitten und in einen Dialyseschlauch überführt. In der Elektrophoresekammer wird der Dialyseschlauch im Elektrophoresepuffer I μ N bei 12 V inkubiert. Am Folgetag wird der Puffer für 2 h bei 12 V durch den Elektrophoresepuffer II ersetzt. Nach der Inkubation befinden sich die Proteine im Überstand des Dialyseschlauches und können abgenommen werden. Die Proteine sind nun einsatzbereit für die Immunisierung von Kaninchen. Für Versuche im XEE müssen diese zunächst dreimal gegen den Dialysepuffer I dialysiert und ggf. konzentriert werden.

10.9.3 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Konzentration der gewonnenen Proteine aus 10.9.2 wird durch einen BSA Vergleich bestimmt. Die Intensität der Proteinbanden wird dabei direkt mit verschiedenen Mengen an BSA auf einem gemeinsamen SDS-Gel bestimmt. Die einzelnen Konzentrationen und Mengen der Probe sind im Anhang aufgeführt (**Tabelle 6**).

10.10 Antikörpergewinnung

10.10.1 Aufreinigung von Antikörpern mittels Affinitätschromatographie

Die Immunisierung der Kaninchen wird nach dem Protokoll der Firma Davids Biotechnologie oder Seramun mit 3 mg rekombinantem Protein durchgeführt (10.9). Es werden parallel zwei Kaninchen immunisiert. Das Blutserum der immunisierten Kaninchen wird zu drei Zeitpunkten getestet: vor der Immunisierung, nach drei Booster Immunisierungen und final nach einer weiteren Immunisierung. Die Aufreinigung der finalen Seren wird zunächst nach dem Protokoll der Firma Bio-Rad mit dem Affi-Gel 10 bzw. 15 durchgeführt, im Anschluss können weitere Schritte wie z. B. eine Konzentrationsanreicherung der Antikörper folgen. Zu diesem Zweck wird das Antigen der Antikörper mit den Aminogruppen an die Matrix gebunden. Anschließend wird das Serum 1:1 mit PBS verdünnt und auf die mit Antigen beladene Säulenmatrix gegeben. Die im Serum enthaltenen Antikörper binden nun an die Säulenmatrix. Das Serum wird nach der Kopplung aus der Säule gespült. Durch sauren Glycin-Puffer (pH 2,5) werden die nicht kovalent gebundenen Antikörper vom Antigen getrennt und von der Säule gespült, fraktioniert. Die einzelnen Fraktionen werden bei der Elution des Antikörpers in 500 μ l Fraktionen aufgeteilt. Um den pH der sauren Elutionslösung auszugleichen werden vorher 100 μ l TRIS/HCl pH 8,5 in jedes Reaktionsgefäß vorgelegt. Die Menge an Antikörper in jeder Fraktion wird zunächst über ein SDS-Gel bestimmt. Die Fraktionen mit den höchsten Konzentrationen an Antikörpern werden gepoolt und anschließend zur besseren Lagerung 1:1 mit Glycerin gemischt. Die

Konzentrationsbestimmung des Antikörpers erfolgt analog zu der Proteinbestimmung aus 10.9.3 mit BSA. Die Antikörper werden im Anschluss aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

10.11 Immunpräzipitation

Auf Änderungen in der Immunpräzipitation der hier angegebenen Menge wird an entsprechender Stelle im Ergebnisteil eingegangen.

Die Immunpräzipitation ermöglicht durch eine Protein-Protein-Interaktion, hier mittels Antikörper und Antigen, die gezielte Reduktion von Proteinen (Pulldown-Assay). Wird das Zielprotein vollständig entfernt, so spricht man von einer Depletion. Parallel zur Immunpräzipitation des gewünschten Antikörpers wird immer eine IgG Kontrolle mitgeführt. IgG binden in selber Weise an die später genannten Protein A Dynabeads. Im Gegensatz zu den eingesetzten Antikörpern binden die IgG Proteine nicht spezifische Antigene. Somit kann aus dem Vergleich IgG zu spezifischem Antikörper die Depletionseffizienz bestimmt werden.

Je Ansatz werden 50 µl magnetische Protein A Dynabeads jeweils dreimal mit dem doppelten Volumen an Waschpuffer gewaschen. Zwischen den einzelnen Schritten werden die Beads durch einen Magnetständer am Rand des Reaktionsgefäßes gesammelt, der Überstand wird abgenommen. Nach dem letzten Waschschrift werden die Beads im Ausgangsvolumen mit Waschpuffer aufgenommen. Es folgt die Kopplung mit dem jeweiligen Antikörper. Die Bindekapazität der hier verwendeten Protein A Dynabeads beträgt je 50 µg Protein A Beads maximal 10 µg Protein (IgG). Die Inkubation erfolgt bei 4 °C über Nacht auf dem Laborschüttler. Am Folgetag werden die Antikörperüberstände abgenommen und im 1:5 Verhältnis mit Probenpuffer versehen. Die Proben dienen der späteren Überprüfung der Bindekapazität an die Protein A Beads. Es folgen drei weitere Waschschrift mit Waschpuffer, um die ungebundenen Antikörper zu entfernen. Anschließend werden die Beads zweimal in doppelter Menge Extrakt Puffer (XB-CSF) gewaschen. Beim letzten XB-CSF Waschschrift werden die Beads in zwei Fraktionen zu je 25 µl aufgeteilt. Die Beads können jetzt im Versuch mit *Xenopus* Eiextrakt eingesetzt werden. Vor der Inkubation mit Extrakt wird der Puffer abgenommen und im Anschluss 50 µl Extrakt für 25 min auf die Beads gegeben. Der Ansatz wird alle sieben Minuten resuspendiert und die letzten 5 Minuten in den Magnetständer gestellt. Im Anschluss erfolgt die zweite Inkubationsphase mit der anderen Hälfte an gekoppelten Antikörper. Extraktproben können nach der Immunpräzipitation für Versuche verwendet werden. Bei frischen Extrakten können diese schockgefroren und bei -80 °C gelagert werden.

Die mit Extrakt inkubierten Beads werden nachfolgend dreimal mit je 1 ml XB-CSF gewaschen. Anschließend werden 5 % der Beads aus der ersten Depletion entnommen und separat gelagert. Diese

Beads können in weiteren Experimenten wieder zu dem immunpräzipitierten Extrakt hinzugefügt werden, um einen Rettungseffekt in den behandelten Extrakten zu erzielen. Die übrigen Beads werden einmal in 1 ml ddH₂O gewaschen. Anschließend wird das Wasser abgenommen und die Beads in 20 µl einer 0,5 % SDS-Lösung für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubation werden die Beads in 20 µl ddH₂O aufgenommen und können über ein SDS-Gel analysiert werden.

Um die Effizienz der Immunpräzipitation zu testen, werden bei nachfolgenden Schritten SDS-Proben genommen, bei 99 °C für 5 min gekocht und wie folgt auf das Gel aufgetragen (**Tabelle 4**).

Tabelle 4: Probenvorbereitung SDS-Page Immunpräzipitation

Um die Bindekapazität, sowie die Effizienz der Immunpräzipitation zu analysieren und später zu quantifizieren werden folgende Proben im Versuchsablauf an entsprechender Stelle im Immunpräzipitationsexperiment entnommen und wie beschrieben auf ein SDS-Gel aufgetragen. Die Menge des eingesetzten XEE beträgt im Versuch 50 µl. Die Beads 50 µl Starvolumen werden am Ende in zwei Fraktionen je 25 µl getrennt. Alle Proben werden dann im Anschluss jeweils einzeln untersucht.

<u>Arbeitsschritt</u>	<u>Probe/SDS-Probenpuffer</u>	<u>Menge/Analyse SDS-Gel</u>
Postinkubation mit Antikörpern	10 µl Überstand Antikörper + 40 µl Probenpuffer	10 µl
Postinkubation gekoppelte Antikörper im Extrakt, Inkubation 1	3 µl Extrakt + 27 µl Probenpuffer	10 µl
Postinkubation gekoppelte Antikörper im Extrakt, Inkubation 2	3 µl Extrakt + 27 µl Probenpuffer	10 µl
SDS-Probe aus Immunpräzipitation 1	20 µl SDS Probe + 20 µl Probenpuffer	10 µl
SDS-Probe aus Immunpräzipitation 2	20 µl SDS Probe + 20 µl Probenpuffer	10 µl
Beads aus Immunpräzipitation 1	20 µl Probe inkl. Beads + 20 µl Probenpuffer	10 µl
Beads aus Immunpräzipitation 2	20 µl Probe inkl. Beads + 20 µl Probenpuffer	10 µl

10.11.1 Injektion von Beads in das XEE

Die mit Antikörper gekoppelten und in XEE inkubierten Beads können erneut im XEE getestet werden. Dafür werden 5 % der Beads aus der ersten Kopplungsreaktion nach der dreimaligen Reinigung im CSF-Puffer entnommen und entweder in frischen oder im bereits depletierten Extrakt inkubiert. Eine gewohnte Fixierung kann nach 30 sowie 50 Minuten Inkubationszeit erfolgen. Die restlichen Beads werden wie im Kapitel zuvor auf dem SDS-Gel/Western Blot analysiert.

10.12 Vernetzung von IgGs

Die Vernetzung von IgGs an Dynabeads orientiert sich am Protokoll von Liu, et al 2019. Die Antikörper werden zunächst wie beschrieben an die Protein A Dynabeads gebunden und inkubiert. Zum Entfernen der Überstände werden die Reaktionsgefäße in Magnetständer gehalten.

Je Ansatz werden 150 µl Dynabeads in 500 µl PBS-T zweimal gewaschen. Anschließend werden 6,25 µg des zu testenden Antikörpers und Kontroll-IgG zu den Beads gegeben und diese für mindestens eine Stunde bei 4 °C inkubiert. Nach der Inkubation werden die Überstände abgenommen und mit Probenpuffer versehen. Die Effizienz der Bindung kann später auf einem SDS-Gel überprüft werden, s. **Tabelle 4**. Die Dynabeads werden zunächst mit Waschpuffer und anschließend mit Na-Boratpuffer (je 1 ml) gewaschen. Für die eigentliche Vernetzung wird das DMP 30 min vor Gebrauch auf Raumtemperatur gebracht. Anschließend kann die DMP-Reaktionslösung angesetzt und für 30 min bei RT zu den Beads gegeben werden. DMP wird zur Quervernetzung der Proteine gebraucht. Es werden Amidbindungen, Quervernetzungen, durch freie Aminogruppen der AS und der Dynabeads gebildet. Die Reaktion wird beendet, indem die DMP-Reaktionslösung zweimal durch 0,5 ml Ethanolamin Puffer ersetzt wird. Die funktionellen Gruppen des DMPs werden durch das Ethanolamin abgesättigt. Es erfolgt eine 30-minütige Inkubation in Ethanolamin Puffer. Der Puffer wird abgenommen und anschließend die Beads zweimal mit 100 µl Glycin Puffer (100 µl) pH 2,5 innerhalb von zwei Minuten gewaschen. Die Überstände werden jeweils mit 20 µl TRIS/HCl (pH 7,5) versetzt und dienen gemischt mit Probenpuffer zur späteren Kontrolle der nicht gebundenen Antikörper auf dem Gel. Die Beads werden erneut einmal in PBS und Waschpuffer gewaschen und sind danach bereit für die Aufreinigung des gewünschten Proteins. Alternativ können die Beads in 100 µl Waschpuffer mit 1 mM Natriumazid bis zum weiteren Einsatz gelagert werden.

10.13 Reinigung von Gamma-Tubulin-Ring-Komplexe

Um weitere Versuche und Analysen mit dem γ -TuRC durchzuführen werden die im Versuch vernetzten IgGs verwendet. Die γ -TuRCs werden dabei aus dem *Xenopus*-Ei-Extrakt isoliert. Für jede Aufreinigung werden 375 µl XEE und 50 µg γ -Tubulin Antikörper, die an 180 µl magnetische Dynabeads gebunden

haben, verwendet. Das präparierte und eingefrorene XEE wird bei Raumtemperatur aufgetaut und ein beschriebener Funktionstest durchgeführt. Sofern sich Spindeln formieren, kann das Extrakt auch im weiteren Verlauf für Spindelversuche verwendet werden. Bilden sich keine Spindelstrukturen, so kann das Extrakt noch zur Reinigung von γ -TuRC verwendet werden. Nach verschiedenen Wasch-/Reinigungs- und Elutionsschritten werden Proben genommen, die in der Polyacrylamid-Gelelektrophorese analysiert werden. Die einzelnen Proben und Mengen werden im Ergebnisteil beschrieben.

Die quervernetzten Dynabeads werden mit PBS, 0,1 % Triton X-100 mit 0,5 M NaCl bei Raumtemperatur gewaschen. Im Anschluss werden die Beads dreimal mit γ -TuRC -XB-CSF Puffer auf Eis gewaschen, um so eine physiologische Umgebung für das XEE zu bekommen. Im weiteren Verlauf erfolgt die Inkubation unter regelmäßigem Resuspendieren im XEE für 30 min. Im Anschluss werden die Beads im Magnetständer zunächst gesammelt und dreimal mit γ -TuRC - XB-CSF Puffer gewaschen. Drei Waschschriffe mit Triton XB-CSF Puffer und zwei mit HB 100 Puffer folgen. Danach erfolgt die Inkubation mit dem γ -TuRC-Elutionspuffer. Zunächst werden die Beads in 12,5 μ l Elutionspuffer aufgenommen und in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Im Anschluss wird das ursprüngliche Reaktionsgefäß mit den Beads erneut mit 12,5 μ l Elutionspuffer inkubiert und mit der ersten Fraktion Elutionspuffer vereinigt. Die eigentliche Elution erfolgt bei 4 °C über Nacht im Kühlraum auf dem Kipp-Schwenktisch. Am nächsten Tag wird die Elutionslösung abgenommen und die Beads können für eine erneute Reinigung wiederhergestellt werden. Dafür werden die Beads in kurzer Zeit (2 min) dreimal in Glycin Puffer (pH 2,5) gewaschen. Es folgt ein Waschschriff mit PBS und zwei weitere mit PBS, 0,1 % Triton X-100. Die Beads werden in PBS Puffer, 0,03 % Natriumazid aufgenommen und bei 4 °C gelagert. Die Beads können aus dem PBS Puffer, 0,03 % Natriumazid recycelt und erneut verwendet werden. Dieser Vorgang kann mit denselben Beads zweimal wiederholt werden.

10.14 *In Vitro* MT Funktionsversuch

Um den Einfluss verschiedener Proteine auf die Aktivität sich polymerisierenden MT direkt zu untersuchen, werden mit gereinigtem Tubulin Funktionsversuche durchgeführt. Sofern andere Mengen im Versuch verwendet werden, wird an gegebener Stelle daraufhin verwiesen. Das Protokoll richtet sich nach der Beschreibung von Liu et al 2019 aus.

Es werden 48 μl gereinigtes Tubulin (100 μM) mit 2 μl Cy3-Tubulin (0,2 μM) gemischt und 50 μl zweifach BRB80-Puffer hinzugegeben. Anschließend werden 12,5 % (w/v) Glycerin hinzugegeben. Die Probe wird bei 353.000 g im TLA-100 Rotor für 5 min bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wird abgenommen und kann bei 4 °C für einige Tage aufbewahrt werden. Vom Überstand werden 2,5 μl mit 2,5 μl γ -TuRC-Mixtur gemischt. Der Ansatz wird für 30 min auf Eis inkubiert und anschließend in ein 37 °C Wasserbad überführt. In zweiminütigen Abständen werden 2 μl Proben genommen und mit Fixierlösung (2 μl) auf einem Objektträger mit Deckglas fixiert. Die Proben können im Anschluss unter dem Mikroskop qualitativ und quantitativ analysiert werden.

Alternativ kann nach dem Ansatz von 2,5 μl Überstand mit 2,5 μl γ -TuRC-Mixtur die Probe für 30 min auf Eis inkubiert werden, sodass die MT depolymerisieren. Je nach Versuchsaufbau können Proteinfragmente in die Mixtur hinzugegeben werden, mit 0,1 μM finale Konzentration. Als Kontrolle der Proteinfragmente wird die γ -TuRC-Mixtur ohne den γ -TuRC eingesetzt. Im Anschluss wird der Reaktionsansatz für 5 min in einem 37 °C Wasserbad inkubiert. Die Probe wird mit einer Glutaraldehyd-Lösung für 5 min fixiert. Anschließend wird die Fixierung mit 1 ml kalten BRB80 Puffer gestoppt. 50 μl der Probe werden auf ein 2 ml 10 % Glycerol BRB80 Kissen überführt und bei 23.530 g für 1 h auf ein Deckglas zentrifugiert (JS-13.1). Nach der Zentrifugation wird das Kissen abgenommen und das Deckglas mit Fluoromount-G auf einem Objektträger fixiert.

Um den Einfluss bestimmter Proteine auf das Mikrotubuliwachstum zu testen werden, diese in die γ -TuRC-Mixtur in der im Ergebnisteil angegebenen Konzentration hinzugegeben.

10.15 Immunfluoreszenz

10.15.1 Zellimmunfluoreszenz

Durch die Immunfluoreszenz können bestimmte Zell- bzw. Gewebekompartimente/-strukturen indirekt durch Antikörperdetektion visuell lokalisiert werden. In dieser Arbeit werden nur Zellenlinien und keine Gewebeproben betrachtet. Einen Tag vor der Fixierung wird die Zellzahl bestimmt und je nach Zelllinie eine bestimmte Zellzahl in einer 24-Well-Platte mit Deckglas ausgesät. Ziel ist bei der Fixierung eine Zielzellzahl von etwa 50.000 Zellen/Well zu erhalten. Auf die Einzelheiten und Besonderheiten wird an entsprechender Stelle im Ergebnisteil eingegangen.

Nachdem das Nährmedium abgenommen wurde, erfolgt die Fixierung mittels eiskalten Methanols, Methanol & Aceton (1:1) oder 4 % Formaldehyd für 5 min. Nach der Inkubationszeit wird das Fixiermedium abgenommen und durch ImmunoBlock (30 min bei RT) ersetzt. Es folgt die Inkubation mit einem primären Antikörper. Sofern nicht anders beschrieben, wird der Antikörper 1:500 in ImmunoBlock verdünnt. Nach 60 min Inkubationszeit wird der primäre Antikörper abgenommen und die Deckgläser zweimal mit PBS gewaschen. Sekundärantikörper werden mit einer Spezifität gegen den primären Antikörper in einer Konzentration von 1:10.000 für 30 min inkubiert. Es folgen erneut ein Waschschrift mit PBS und eine Inkubation mit PBS + DAPI (1,5 µg/ml für 5 min) zur späteren Lokalisierung der Zellkerne. Im Anschluss wird das nicht gebundene DAPI durch einen erneuten PBS Waschschrift abgewaschen, bevor das Deckglas mit den Zellen und einem Tropfen Fluoromount-G auf einem Objektträger fixiert wird. Nach 12 Stunden Trocknung sind die Objektträger analysebereit zur Auswertung an einem Immersionsfluoreszenzmikroskop.

10.15.2 Zelllysate

Für Protein-Zelllysate werden zunächst die adherent wachsenden Zellen mit PBS gewaschen und anschließend mit Trypsin EDTA (0,05 %) abgelöst. Mit Hilfe der Zählkammer nach Neubauer wird eine Menge von 10^7 Zellen bestimmt und in 100 µl Probenpuffer gelöst. Sofern nicht anders beschrieben wird, werden 20 µl Proben auf die SDS-Gele aufgetragen.

10.16 Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Für die Auftrennung von Proteinen nach ihrer Molekülmasse im elektrischen Feld wird die Polyacrylamid-Gelelektrophorese durchgeführt. Sammel- und Trenngel werden nach der in **Tabelle 5** angegebenen Mengen hergestellt und jeweils nacheinander in die Glaskammer gefüllt. Das Trenngel muss vor der Zugabe des Sammelgels auspolymerisiert sein. Die Gele werden bis zu ihrer weiteren Verwendung in einer feuchten Kammer bei 4 °C gelagert.

Die Gele werden in die Laufkammer eingespannt und mit den entsprechenden SDS-Proben beladen. Es wird immer der in **Abbildung 22** gezeigte Proteinmarker verwendet. Die Gele laufen zum Sammeln der geladenen Probe (Stackingeffekt) bei 90 V bis zum Erreichen des Trenngels, danach wird die elektrische Spannung auf 120 V gelegt. Die Proteine trennen sich der Größe nach auf. Beendet wird der Durchlauf, sobald die Lauffront aus dem Gel tritt.

Die Gele können im weiteren Verlauf für 30 min in der Färbelösung InstantBlue inkubiert werden. Um auch schwache Signale zu detektieren, kann es hilfreich sein im Anschluss das Gel in VE-Wasser für 30 min zu waschen.

Tabelle 5: Zusammensetzung von Sammel- und Trenngel

	Sammelgel	Trenngel			
		<u>6,0 %</u>	<u>8,5 %</u>	<u>10 %</u>	<u>12,5 %</u>
Wasser	2,5 ml	8,3 ml	7 ml	6,3 ml	4,95 ml
Sammelgellösung/Trenngellösung	1 ml	3,8 ml			
Acrylamid	0,8 ml	3 ml	4,2 ml	5 ml	6,3 ml
APS 25 %	15 µl	30 µl			
TEMED	6 µl	6 µl			

10.17 Coomassie Färbung

Die Coomassie Färbungen der Proteine in den Gelen werden mit der Färbelösung InstantBlue der Firma Abcam durchgeführt. Nach wenigen Minuten (max. 30 min) ist bereits eine Färbung der Proteinbanden zu erkennen. Eine Fixierung ist nicht mehr notwendig. Für eine nachfolgende Silberfärbung kann das Gel mit der Entfärbelösung behandelt werden.

10.18 Silberfärbung

Zur sensitiveren Detektierung von Proteinbanden kann eine Silberfärbung, der Protein beladenen Gele, durchgeführt werden. Hierbei können auch Gele benutzt werden, die zuvor Coomassie gefärbt werden. Ist das Gel vorher Coomassie gefärbt, muss dieses zunächst in mehreren Schritten mit der Entfärbelösung gewaschen werden (5 x 30 min). Anschließend wird das Gel für mindestens 1 h, max. 24 h in Lösung 1 inkubiert. Anschließend wird das Gel 3-mal für 10 min. in Lösung 2 gewaschen. Es folgt eine Inkubation für 1 min in Lösung 3. Das Gel wird 3-mal für 20 sek. in Wasser gewaschen. Die Inkubation in der Silbernitratlösung erfolgt für 20 min, anschließend wiederholen sich die Waschschriffe mit Wasser. Die Entwicklung der Membran (Lösung 7) ist abhängig von der Bandenintensität und sollte 5-10 min. beanspruchen. Sobald die gewünschte Bandenintensität erreicht ist, wird das Gel 2-mal mit Wasser gewaschen und anschließend die Reaktion mit der Lösung 8 abgestoppt. Das Gel kann danach in dH₂O gelagert werden. Alle Arbeitsschritte werden bei Raumtemperatur durchgeführt.

10.19 Western Blot

Um den Nachweis einzelner Proteine zu erbringen kann das Gel (10.16) ohne die Inkubation in InstantBlue geblottet werden. Es wird mit dem Wet/Tank Blotting System von Bio-Rad gearbeitet. Auf Besonderheiten im Blot-Verlauf wird im Ergebnisteil an gegebener Stelle eingegangen. Die Proteine werden bei konstant 0,4 A für zwei Stunden bei RT oder bei konstant 20 V für 10 h bei 4 °C geblottet. Danach wird die Membran für fünf Minuten in Ponceau S Färbelösung inkubiert. Proteinbanden werden sichtbar und erlauben einen ersten Eindruck über die Effizienz des Blotvorgangs. Danach wird die Membran in TBS-T mit 5 % Milchpulver für 30 min blockiert. Es folgt die Inkubation der Membran mit dem jeweiligen angegebenen primären Antikörper in TBS-T in der Konzentration 1:1000. Danach wird die Membran zweimal in TBS-T gewaschen. Der sekundäre Antikörper wird in einer Konzentration von 1:10.000 für 30 min spezifisch für den primären Antikörper inkubiert. Im Anschluss wird die Membran erneut zweimal mit TBS-T gewaschen. Vor der Entwicklung der Membran wird die Luminol und Peroxid Lösung (A+B- Lösung) gemischt und gleichmäßig auf der Membran verteilt. Die Membran

wird in dem jeweiligen angegebenen Zeitraum am LAS entwickelt. Die graphische Darstellung erfolgt durch Adobe Photoshop, die Analyse und Quantifizierung über ImageJ.

11 Materialien

11.1 Chemikalien/Reagenzien (2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)- ethansulfonsäure) HEPES	Carl Roth, Karlsruhe (GER)
(Ethyldiamintetraessigsäure) (EDTA)	Merck, Darmstadt (GER)
(Ethylen glycol-bis(aminoethylether)- N,N,N',N'-tetraessigsäure) (EGTA)	Carl Roth, Karlsruhe (GER)
2-YT-Medium (gebrauchsfertig)	Carl Roth, Karlsruhe (GER)
4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	SouthernBiotech, Birmingham (USA)
Aceton	Carl Roth, Karlsruhe (GER)
Acrylamid	Roth, Karlsruhe (GER)
Affi-Gel 10 and 15 Gel	Bio-Rad, Feldkirchen (GER)
Agar	Invitrogen, Carlsbad (USA)
Amersham start Western Blotting detection reagent	GE Healthcare Life Sciences, Freiburg (GER)
Ammoniumperoxodisulfat (APS) 25 %	Merck, Darmstadt (GER)
Ampicillin	Carl Roth, Karlsruhe (GER)
Borsäure	AppliChem, Darmstadt (GER)
Bromphenolblau	Waldeck, Münster (GER)
Cy3	Thermo Fischer Scientific, Waltham (USA)
Cytochalasin D/B	Merck, Darmstadt (GER)
Dimethylpimelimidate (DMP)	Carl Roth, Karlsruhe (GER)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth, Karlsruhe (GER)
Dinatriumhydrogenphosphat Dihydrat	AppliChem, Darmstadt (GER)
Dithiothreitol (DTT)	Carl Roth, Karlsruhe (GER)
Dynabeads® Protein A	Thermo Fischer Scientific, Waltham (USA)
ECL™ Western Blotting-Detektionsreagenzien	GE Healthcare, Solingen (GER)
Essigsäure	Carl Roth, Karlsruhe (GER)
Ethanol	VWR, Darmstadt (GER)
Ethanolamin	Carl Roth, Karlsruhe (GER)
Fetales Kälberserum (FCS)	Gibco Carlsbad (USA)

Fluoromount-G®	SouthernBiotech, Birmingham (USA)
Flüssigstickstoff	Universität Bonn, Bonn (GER)
Formaldehyd	Carl Roth, Karlsruhe (GER)
Formaldehyd (HCOH)	Merck, Darmstadt (GER)
Gel Loading Dye, Blue (6x)	New England Biolabs, Frankfurt a. M. (GER)
Gentamicin	Carl Roth, Karlsruhe (GER)
Glutamate	Merck, Darmstadt (GER)
Glutaminsäure	Gibco, Carlsbad (USA)
Glutaraldehyd	AppliChem, Darmstadt (GER)
Gluthation Sepharose	Merck, Darmstadt (GER)
Glycin	Roth, Karlsruhe (GER)
Glyzerin	Carl Roth, Karlsruhe (GER)
Guanosintriphosphat (GTP)	GTP Solutions GmbH, Niederkrüchten (GER)
Hefeextrakt	VWR, Darmstadt (GER)
InstantBlue	Abcam, Berlin (GER)
Intergonan	MSD Tiergesundheit, Unterschleißheim (GER)
Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Carl Roth, Karlsruhe (GER)
Kaliumchlorid (KCl)	Carl Roth, Karlsruhe (GER)
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt (GER)
Kaliumhydroxid (KOH)	Carl Roth, Karlsruhe (GER)
Kalziumchlorid (CaCl ₂)	Merck, Darmstadt (GER)
Kanamycin	Carl Roth, Karlsruhe (GER)
L-Cystein	Carl Roth, Karlsruhe (GER)
Leibovitz's L-15 Medium	PAN, Eidenbach (GER)
L-Glutamin	PAN, Eidenbach (GER)
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Merck, Darmstadt (GER)
Methanol	VWR, Darmstadt (GER)
N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	AppliChem, Darmstadt (GER)
Natrium Borat	Carl Roth, Karlsruhe (GER)
Natriumazid	Fluka, Buchs (CHE)

Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth, Karlsruhe (GER)
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck, Darmstadt (GER))
Natriumkarbonat (Na ₂ CO ₃)	Merck, Darmstadt (GER)
Natriumlaurylsulfat (SDS)	Serva, Heidelberg (GER)
Natriumthiosulfat (Na ₂ S ₂ O ₃)	Merck, Darmstadt (GER)
Ni-NTA Agarose	Jena Bioscience, Jena (GER)
Nukleotide (dNTPs)	Thermo Fischer Scientific, Waltham (USA)
Ovogest 1000 I.E./ml	MSD Tiergesundheit, Unterschleißheim (GER)
PBS für Zellfixierung und -kultur	PAN, Eidenbach (GER)
Penicillin Streptomycin	PAN, Eidenbach (GER)
Piperazine-N,N'-bis(2-Ethansulfonsäure) (PIPES)	Carl Roth, Karlsruhe (GER)
Poly-L-Lysin	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Ponceau S Staining	Amresco, Darmstadt (GER)
ROTI®ImmunoBlock	Carl Roth, Karlsruhe (GER)
Saccharose	Carl Roth, Karlsruhe (GER)
Salzsäure (HCl)	Carl Roth, Karlsruhe (GER)
Silbernitrat (AgNO ₃)	Carl Roth, Karlsruhe (GER)
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS)	Carl Roth, Karlsruhe (GER)
Triton X-100	Merck, Darmstadt (GER)
Trypsin EDTA	PAN, Eidenbach (GER)
Trypton	VWR, Darmstadt (GER)
Tubulin	ZMBH Universität Heidelberg (GER)
Tween	AppliChem, Darmstadt (GER)

11.2 Proteine

Cy3-markiertes Tubulin	AG Gruss, Bonn (GER)
gereinigtes Tubulin	AG Schiebel (GER)
RanGTP	AG Gruss, Bonn (GER)

11.3 Verbrauchsmaterialien

0,2 ml Thick Beckmann Ultracentrifugation Tubes	Beckman, Krefeld (GER)
24-Well-Platte	Sarstedt, Nümbrecht (GER)
Aquatic 3 Froschfutter	Special Diets Services, Limburgerhof (GER)
Beckman Zentrifugationsröhrchen (7/16 x 13/8 in (11 x 34 mm) Saccharose Gradient	Beckman, Krefeld (GER)
Beckman Zentrifugationsröhrchen Eiextrakt	Beckman, Krefeld (GER)
Deckglas eckig 20 x 20 mm	Carl Roth, Karlsruhe (GER)
Deckglas rund für Zellkultur Durchmesser	VWR, Darmstadt (GER)
Dialyseschlauch	Spectrum Labs, Piraeus (GRC)
Einmalnadeln 0,90 x 40 mm	Braun, Melsenburg (GER)
Einmalnadeln für Insulinspritzen	Braun, Melsenburg (GER)
Einwegpipette	Sarstedt, Nümbrecht (GER)
Einwegspritzen für Insulin	Braun, Melsenburg (GER)
Nitrocellulose Membran	GE Healthcare Life Sciences, Freiburg (GER)
Objektträger	VWR, Darmstadt (GER)
Parafilm	Bemis, Neenah (GER)
PCR-Reaktionsgefäß	Sarstedt, Nümbrecht (GER)
Petrischalen	Sarstedt, Nümbrecht (GER)
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht (GER)

Plastikküvetten	Sarstedt, Nümbrecht (GER)
Plastikpipetten div. Größen	Sarstedt, Nümbrecht (GER)
Protein Konzentrator	Sartorius, Göttingen (GER)
Reaktionsgefäß 0,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht (GER)
Reaktionsgefäß 1,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht (GER)
Reaktionsgefäß 2,0 ml	Sarstedt, Nümbrecht (GER)
Schwerkraftsäulen	Bio-Rad, Feldkirchen (GER)
TLA-100 Fixed Angle Rotor	Beckman, Krefeld (GER)
11.4 Labor Kits	
Activated Immunoaffinity	Bio-Rad, Feldkirchen (GER)
DNA Purification Kit	Genetics, Düren (GER)
First Strand cDNA Synthesis Kit	Roche, Basel (CHE)
Gluthation Sepharose	Thermo Fisher, Waltham (USA)
Midi-Plasmidpräparation	Invitrogen, Carlsbad (USA)
Mini-Plasmidpräparation	Macherey-Nagel, Düren (GER)

11.5 Geräte

Adaptorenröhrchen	Beckman, Brea (USA)
Axiophot fluorescent microscope	Zeiss West Germany, Oberkochen (GER)

Objektive

Vergrößerung	Objektivtyp	NA	Medium
10x	Plan-Neofluar	0,30	Luft
40x	Plan-Neofluar	0,75	Luft
63x	N-Achroplan	0,85	Luft
63x	Plan-Achromat	1,40	Öl
100x	Plan- Neofluar	1,30	Öl

Bechergläser div. Größen	Simax, Aachen (GER)
Beckmann J2-J21 Zentrifuge	Beckmann Culture Diagnostics, Brea (USA)
Brutschrank B6120	Heraeus, Hanau (GER)
Corex Glasröhrchen 15 ml	Thermo Fisher, Waltham (USA)
Einzelbox Frösche	Schwarz Aquaristik, Göttingen (GER)
Elektrophoresegeräte & Zubehör	Hoefer, Massachusetts (USA)
Elektrophoresesysteme (Polyacrylamidgelelektrophorese und Western Blot)	Bio-Rad, Feldkirchen (GER)
Flockeneisbereiter	Scotsman, Berlin (GER)
Fluoreszenz-. Hellfeld- und Phasenkontrastmikroskop BZ-X800	Keyence, Neu-Isenburg (GER)

Objektive

Vergrößerung	Objektivtyp	NA	Medium
4x	Plan-Apo	0,2	Luft
10x	Plan-Apo	0,45	Luft
20x	Plan-Apo	0,75	Luft
20x	Plan-Fluor	0,45	Luft
40x	Plan-Fluor	0,6	Luft
60x	Plan-Apo VC	1,4	Öl

Glaspipetten div. Größen	Hirschmann, Eberstadt (GER)
Gummiadaptor für Corex Glasröhrchen	Corning, New York (USA)
Heraeus Multifuge 3 S-R Benchtop Zentrifuge (Zellkultur)	Heraeus, Hanau (GER)
JS-13.1	Beckman, Krefeld (GER)
Kipp-Schwenktisch Duomax 1030	Heidolph, Schabach (GER)
Labornetzteil (Power supply), Spannungsquelle Power Pac 200	Bio-Rad, Feldkirchen (GER)
Laborschüttler, Plattformschüttler Polymax 1040	Heidolph Schwabach (GER)
LAS 4000	GE Healthcare Life Science, Freiburg (GER)
Magnetständer	AG Gruss, Bonn (GER)
Mikroskop Zellkultur	Wilovert, Wetzlar (GER)
Mikrozentrifuge 5415 R	Eppendorf, Hamburg (GER)
NanoVue Plus Spectrophotometer	GE Healthcare Life Sciences, Freiburg (GER)
New Brunswick Innova 4230 Refrigerated Incubator Shaker	Marshall Scientific, New Hampshire (USA)
New Brunswick Innova 4300 Incubator Shaker	Marshall Scientific, New Hampshire (USA)
Pinzette groß (spitz)	DuMont, Köln (GER)
Pinzette groß (stumpf)	DuMont, Köln (GER)
Pinzette klein (stumpf)	DuMont, Köln (GER)
Pipetten div. Größen (pipetman)	Gilson, Middleton (USA)
Sammelbox Frösche	Schwarz Aquaristik, Göttingen (GER)
Schikanekolben div. Größen	Schott Duran, Mitterteich (GER)
SDS Page Laufkammer & Zubehör	Bio-Rad, Feldkirchen (GER)

Shaking incubators, multitron standard	Infors HAT, Surrey (UK)
Sonoplus Ultraschall-Homogenisator HD 2070	Bandelin, Berlin (GER)
Test-Tube-Rotator 34528	Snijders, Tilburg (NL)
Thermoblock, Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg (GER)
Thermocycler	Bio-Rad, Feldkirchen (GER)
TischzentrifugeSPROUT	Biozym scientific, Hessisch Oldendorf (GER)
TLA-120.2	Beckman, Krefeld (GER)
Ultratiefkühlschrank	Thermo Fisher, Waltham (USA)
Ultrazentrifuge Optina MAX XP	Beckman, Krefeld (GER)
UV Spektralphotometer, UV-1600PC	VWR, Darmstadt (GER)
Vortex REAX2000	Heidolph Instruments, Schwalbach (GER)
Western Blot Kammer & Zubehör	Bio-Rad, Feldkirchen (GER)

11.6 Bakterien, Zellen und Versuchstiere

Bakterien

Bakterium *Escherichia Rosetta™(DE3) Rosetta* AG Gruss (GER)

Wirtsstamm BL 21 (*E. coli*)

DH5α Kompetente Zellen (*E. coli*) AG Gruss (GER)

M15 (*E. coli*) AG Gruss (GER)

TG1 (*E. coli*) AG Gruss (GER)

Zelllinien

IMR Zelllinie AG Gruss (GER)

XL177 Zelllinie AG Gruss (GER)

Versuchstiere

Xenopus laevis ♀ Nasco education, Wisconsin (USA)

Xenopus laevis ♀ European Xenopus Resource Center,
Portsmouth (UK)

11.7 Antikörper

Kommerzielle Antikörper

Alexa Fluor 488 (Maus) Life Technologies, Carlsbad (USA)

Alexa Fluor 594 (Kaninchen) Life Technologies, Carlsbad (USA)

anti mouse, Peroxidase gekoppelt (Maus) Jackson immunoresearch, West Grove (USA)

anti rabbit, Peroxidase gekoppelt (Kaninchen) Jackson immunoresearch, West Grove (USA)

Centrin (Maus) Merck, Darmstadt (GER)

IgG (Kaninchen) Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)

α-Tubulin (Maus) Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)

γ-Tubulin (Kaninchen) AG Gruss (GER)

γ-Tubulin (Maus) Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)

Synthetisierte Antikörperseren

Cdk5rap2 (Kaninchen 247_19)	Seramun Diagnostic GmbH (GER)
Cdk5rap2 (Kaninchen 248_19)	Seramun Diagnostic GmbH (GER)
Cdk5rap2 (Kaninchen)	Dauids Biotechnologie (GER)
Cdk5rap2 (Kaninchen)	Dauids Biotechnologie (GER)
MEL-28 FJE6 (Kaninchen)	AG Gruss (GER)
Nme7 (Kaninchen 33_20)	Seramun Diagnostic GmbH (GER)
Nme7 (Kaninchen 34_20)	Seramun Diagnostic GmbH (GER)

11.8 Vektoren, Oligonukleotide, und Enzyme

Oligonukleotide		
Benennung (Temperatur)	Sequenz (5'-3')	Firma
cDNA-Cep215 AS 1-220 <i>X. l. forw.</i> (56 °C)	ACGTGGATCCATGAAAGATTTTGAGAAGC	Eurofins (GER)
cDNA-Cep215 AS 1-220 <i>X. l. rev.</i> (60 °C)	GCATCGTCTGCAGGTGACCTTGATCTGTAAGTCCG	Eurofins (GER)
cDNA-Cep215 AS 1-187 <i>X. l. rev.</i> (62 °C)	ACTGGTCGACCATACCAAGGTCGTCTTTTGAATTA AGTAG	Eurofins (GER)
cDNA-Cep215 AS 1-139 <i>X. l. rev.</i> (61 °C)	ACTGGTCGACTTTGTTCTCCAAGCCGATCTTTGC	Eurofins (GER)
cDNA-Cep215 AS 1-77 <i>X. l. rev.</i> (61 °C)	ACTGGTCGACCCCCAGCCAGATTTTCTAACGC	Eurofins (GER)
cDNA-Cep215 AS 1-27 <i>X. l. rev.</i> (56 °C)	ACTGGTCGACTTCTCCAAAAATATATCCGCAATTT TAAG	Eurofins (GER)
cDNA-Cep215 AS 1-139 +N193 <i>X. l. forw.</i> (60 °C)	ATGCGGATCCATGGTAGGATCACATGACCGTGAC	Integrated DNA Technologies (BE)
cDNA-Cep215 F16A <i>X. l. forw.</i> (42 °C)	AAGAGAATGCTAACTTAAAATTGCG	Integrated DNA Technologies (BE)
cDNA-Cep215 F16A <i>X. l. rev.</i> (43 °C)	TTAAGTTAGCATTCTCTTTCTTCAGATC	Integrated DNA Technologies (BE)

Enzyme

BamH1-HF	New England Biolabs, Frankfurt a. M. (GER)
Dpn1	New England Biolabs, Frankfurt a. M. (GER)
Q5 [®] High-Fidelity DNA Polymerase	New England Biolabs, Frankfurt a. M. (GER)
Sal1-HF	New England Biolabs, Frankfurt a. M. (GER)
T4 DNA Ligase	New England Biolabs, Frankfurt a. M. (GER)

Vektoren

pGEX-6P1 Leervektor	AG Gruss (Bonn)
pGEX-6P1-cep215-1-139-WT (<i>X. l.</i>)	Eigenklonierung
pGEX-6P1-cep215-1-139-WT+193AS-N-ter. (<i>X. l.</i>)	Eigenklonierung
pGEX-6P1-cep215-1-187-WT (<i>X. l.</i>)	Eigenklonierung
pGEX-6P1-cep215-1-220-F16A (<i>X. l.</i>)	Eigenklonierung
pGEX-6P1-cep215-1-220-F75A (<i>H. s.</i>)	AG Schiebel (Heidelberg)
pGEX-6P1-cep215-1-220-WT (<i>H. s.</i>)	AG Schiebel (Heidelberg)
pGEX-6P1-cep215-1-220-WT (<i>X. l.</i>)	Eigenklonierung
pGEX-6P1-cep215-1-27-F16A (<i>X. l.</i>)	Eigenklonierung
pGEX-6P1-cep215-1-27-WT (<i>X. l.</i>)	Eigenklonierung
pGEX-6P1-cep215-1-77-WT (<i>X. l.</i>)	Eigenklonierung
pGEX-6P1-cep215-51-100-WT (<i>H. s.</i>)	AG Schiebel (Heidelberg)

11.9 Puffer, Lösungen und Medien

Allgemeine Medien

BRB80-Puffer 3x	240 mM PIPES/KOH
pH 6,8	3 mM MgCl ₂
	3 mM EGTA
BSA Stammlösung	10 µl BSA (10 mg/ml)
	145 µl ddH ₂ O
	145 µl Probenpuffer
Dialysepuffer I	100 mM KCl
	2 mM MgCl ₂
	10 mM HEPES
Elektrophoresepuffer I	25 mM TRIS -HCl
pH 8,3	192 mM Glycin
	0,1 % SDS
Elektrophoresepuffer II	25 mM TRIS -HCl
pH 8,3	192 mM Glycin
Lysepuffer (Ultraschall)	
PBS 10 x pH 7,4	1,4 M NaCl
	26,2 mM KCl
	101,7 mM Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O
	17,6 mM KH ₂ PO ₄
TAE 50 X pH 8,0	8 M
(1 l)	57,1 ml AcOH
	50 mM EDTA
TBS 10 x	500 mM TRIS

pH 8,0

1,5 M NaCl

Markiertes Cy3 Tubulin

10x Injektionspuffer

500 mM K-Glutamate

5 mM MgCl₂

2 M K-Glutamate

2 M Glutaminsäure pH 7 KOH

- 20 °C

HEPES

1 M HEPES (NaOH)

pH 8,6; - 20 °C

High pH Kissen

0,1 M NaHEPES

pH 8,6

1 mM MgCl₂

1 mM EGTA

60 % v/v Glycerin

Low pH Kissen

60 % v/v Glycerin in 1x BRB80-Puffer

Markierungspuffer

0,1 M NaHEPES

pH 8,6

1 mM MgCl₂

1 mM EGTA

40 % v/v Glycerin

Quenchlösung

2x BRB80-Puffer

100 mM K-Glutamate

40 % v/v Glycerin

Silberfärbung

Entfärbelösung

10 % AcOH

10 % Methanol

	80 % dH ₂ O
Lösung 1	50 % Methanol
	12 % AcOH
	0,5 ml 37 % HCOH/l
Lösung 2	50 % EtOH
	50 % dH ₂ O
Lösung 3	0,2 g/l Na ₂ S ₂ O ₃
	Add dH ₂ O
Lösung 4/6	dH ₂ O
Lösung 5	2 g/l AgNO ₃
	0,75 ml 37 % HCOH/l dH ₂ O
Lösung 7	0,2 g/l Na ₂ CO ₃ (60 g/l)
	0,5 ml 37 % HCOH/l
	Na ₂ S ₂ O ₃ 4 mg/l in H ₂ O
Lösung 8	10 % EtOH
	10 % AcOH
	80 % H ₂ O

Polyacrylamidgelelektrophorese und Western Blot

Sammelgellösung	vgl. Tabelle 5
Trenngellösung	vgl. Tabelle 5
Laufpuffer/Probenpuffer	60 mM TRIS
	2% SDS
	10% Glycin

	100 mM DTT
	0,01% Bromphenolblau
Blottingpuffer 10 x	1,9 M Glycin
	4 M TRIS
SDS Probenpuffer/Ladepuffer	8% SDS
pH 6,8	20% Glycerol
	0,01% Bromphenolblau
	400mM DTT
	250mM TRIS
TBS-T	1x TBS
	0,5 % Tween
Bakterienmedien	
2-YT-Medium	Ggf. Kanamycin (50 mg/l)
(pH 7)	Ggf. Ampicillin (100 mg/ml)
Agarplatten	Hefeextrakt (5 g/l)
(pH 7)	Trypton (10 g/l)
	Natriumchlorid (0,5 – 10 g/l)
	Agar (15 g/l)
	Ggf. Kanamycin (50 mg/l)
	Ggf. Ampicillin (100 mg/ml)
LB-Medium	Hefeextrakt (5 g/l)
(pH 7)	Trypton (10 g/l)
	Natriumchlorid (0,5 – 10 g/l)
	Ggf. Kanamycin (50 mg/l)
	Ggf. Ampicillin (100 mg/ml)

Zellmedien

XL177

Leibovitz's L-15 Medium

15 % FCS

1 % L-Glutamin

1 % Penicillin Streptomycin

Medien Präparation *Xenopus*-Ei-Extrakt

1x MMR

0,1 M NaCl

(pH 7,8; 18 °C)

0,2 mM KCl

1 mM MgCl₂

2 mM CaCl₂

0,1 mM EDTA

5 mM HEPES

1x XB (pH 7,7; 18 °C)

1x XB Salze-Grundlösung

50 mM Saccharose

10 mM HEPES

1x XB-CSF (pH 7,7; 18 °C)

1x XB Salze-Grundlösung

50 mM Saccharose

10 mM HEPES

1 mM MgCl₂

5 mM EGTA

20x XB Salz-Grundlösung

2 M KCl

20 mM MgCl₂

2 mM CaCl₂

Cytochalasin D/B	10 mg/ml in DMSO
Degelierungslösung (pH 7,8; 18 °C)	0,25 MMR 165,3 mM L-Cystein
Fixierlösung	0,25% Glutaraldehyd (aus 10 % Stock) 0,1 % Triton X 100 (aus 10 % Stock) 30 % Glycerin (aus 87 % Stock) 1 x BRB80-Puffer DAPI

(Quer-) Vernetzung an Dynabeads

Na-Borat Puffer (pH 9,0)	0,2 M Na-Borat
Ethanolamin Puffer (pH 8,0)	0.2 M Ethanolamin
Glycin Puffer (pH 2,5)	100 mM Glycin
PBS-T	1x PBS 0,65 % Tween
DMP-Reaktionslösung (pH 9,0)	20 mM DMP 0,2 M Na-Borat

Immunpräzipitation

Waschpuffer	1x PBS 0,05 % Triton X-100
-------------	-------------------------------

Reinigung von Gamma-Tubulin-Ring-Komplexen

1x HB 100 GTP Puffer (pH 8; 4 °C)	50 mM Na-HEPES 1 mM EGTA 1 mM MgCl ₂
--------------------------------------	---

	0,1 mM GTP
	100 mM KCl
1x HB 100 Puffer	50 mM Na-HEPES
(pH 8; 4 °C)	1 mM EGTA
	1 mM MgCl ₂
	1 mM GTP
	100 mM KCl
1x γ-TuRC - XB-CSF	1x XB Salze-Grundlösung
(pH 7,7; 4 °C)	50 mM Saccharose
	10 mM HEPES
	2 mM MgCl ₂
	5 mM EGTA
	100 mM KCl
	0,1 mM CaCl ₂
Abstopplösung	1x BRB80 (kalt)
	add H ₂ O
Fixierlösung	1 % Glutaraldehyd
	1x BRB80
	add H ₂ O
Glycerolkissenlösung	10 % Glycerol
	1x BRB80
	add H ₂ O
Kontrollpuffer/Puffer für Proteinfragmente	1 mM GTP
	12,5 % (w/v) Glyzerin
	1x BRB80-Puffer,

	add ddH ₂ O
Triton XB-CSF Puffer	1x γ -TuRC - XB-CSF
(pH 7,7; 4 °C)	0,3 % Triton X-100
	250 mM KCl
γ -TuRC-Elutionspuffer	1x HB 100 Puffer
(pH 8; 4 °C)	0,1 mg/ml Peptid
	0,02 % Tween
γ -TuRC-Mixtur	0,2 μ l γ -TuRC oder IgG Elution
IgG-Mixture	1 mM GTP
	12,5 % (w/v) Glyzerin
	1x BRB80-Puffer,
	add ddH ₂ O

Klonierung

5x Q5 Reaktionspuffer	New England Biolabs (GER)
CutSmart	New England Biolabs (GER)
T4 DNA Ligasepuffer	New England Biolabs (GER)

11.10 Programme

Adobe Photoshop	Bildbearbeitung
ImageJ	Bildbearbeitung und Quantifizierung
Keyence Analysesoftware	Analyse von Mikroskopierbildern
Office 2016-2019	Texte, Präsentationen, Statistiken
OneNote 2016	Laborbuchführung
snapGene	Gen-/Proteinanalyse

11.11 Externe Firmen

Antikörperproduktion

Davids Biotechnologie (GER)

Antikörperproduktion

Seramun Diagnostic GmbH (GER)

Primer

Integrated DNA Technologies (BEL)

Sequenzierung

Microsynth (CHE)

Tandem MS/MS

Zentrum für molekulare Biologie (GER)

12 Literaturverzeichnis

- Adam, Ning, Reina und Hunter. „NME/NM23/NDPK and Histidine Phosphorylation.“ *International Journal of Molecular Sciences*, 08 2020: 1-26.
- Alberts, et al. *Molecular Biology of THE CELL (Sixth Edition)*. New York: Garland Science, Taylor & Francis Group, LLC, an informa business, 2015.
- Alfares, et al. „A new association between CDK5RAP2 microcephaly and congenital cataracts.“ *Annals of Human Genetics*, 12 2017: 165-170.
- Alfaro-Aco, und Petry. „How TPX2 helps microtubules branch out.“ *Cell Cycle*, 06 2017: 1560-1561.
- Alfaro-Aco, Raymundo, Thawani, und Petry. „Structural analysis of the role of TPX2 in branching microtubule nucleation.“ *Journal of Cell biology*, 03 2017: 083-997.
- Alvarado-Kristensson, Rodriguez, Silió, Valpuesta und Carrera. „SADB phosphorylation of γ -tubulin regulates centrosome duplication.“ *nature cell biology*, 08 2009: 1081-1092.
- Aziz, et al. „Mosaic-variegated aneuploidy syndrome mutation or haploinsufficiency in Cep57 impairs tumor suppression.“ *The Journal of Clinical Investigation*, 08 2018: 3517-3534.
- Baron, Tammy, Bazinet und Salisbury. „Centrin is a component of the pericentriolar lattice.“ *Biology of the cell*, 09 1992: 383-388.
- Barrera, Kao, Hammer, Seemann, Fuchs und Megraw. „CDK5RAP2 Regulates Centriole Engagement and Cohesion in Mice.“ *National Institut of Health*, 06 2010: 913-926.
- Bell „Polygenic disease.“ *Genetic & Development*, 06 1993: 466-469.
- Berl, Oakley, Vitoria und Yixian. „ γ -Tubulin complexes in microtubule nucleation and beyond.“ *Molecular biology of the cell*, 09 2015: 2957-2962.
- Binarová und Tuszynski. „Tubulin: Structure, Functions and Roles in Disease.“ *cells*, 10 2019: 1294 1-7.
- Boehmer, Enninga, Dales, Blobel und Zhong. „Depletion of a single nucleoporin, Nup107, prevents the assembly of a subset of nucleoporins into the nuclear pore complex.“ *PNAS*, 02 2003: 981-985.
- Borisy, Marcum, Olmsted, Murphy und Johnson. „Purification of tubulin and associated high molecular weight proteins from porcine brain and characterization of microtubule assembly *in vitro*“ *Annals of the New York Academy of Sciences*, 06 1975: 107-132.
- Boydjiev, et al. „A novel dysmorphic syndrome with open calvarial sutures and sutural cataracts maps to chromosome 14q13-q21.“ *Hum Genet*, 11 2002: 1-9.
- Boydjiv, et al. „Cranio-lenticulo-sutural dysplasia is caused by a SEC23A mutation leading to abnormal endoplasmic-reticulum-to-Golgi trafficking.“ *nature genticis*, 09 2006: 1192-1197.
- Brouhard, et al. „XMAP215 is a processive microtubule polymerase.“ *Cell*, 01 2008: 79-88.
- Campbell, Neil, und Jane Reece. *Biologie*. München: Pearson Studium, 2011.
- Castoldi und Popov. „Purification of brain tubulin through two cycles of polymerization-depolymerization in a high-molarity buffer.“ *Protein Expression and Purification*, 11 2003: 83-88.

- Yuk-Kwan, Liu, Kwan Sze, Dai und Qi. „CDK5RAP2 stimulates microtubule nucleation by the γ -tubulin ring complex.“ *Journal of cell biology*, 12 2010: 1089-1095.
- Clever, Funakoshi, Mimura, Takagi und Imamoto. „The nucleoporin ELYS/Mel28 regulates nuclear envelope subdomain formation in HeLa cells.“ *Nucleus*, 03 2012: 187-199.
- Conde und Caceres. „Microtubule assembly, organization and dynamics in axons and dendrites.“ *Nature Reviews Neuroscience* , 06 2009: 319-332.
- Conduit „Microtubule organization: A complex solution.“ *JCB Spotlight*, 02 2019: 609-612.
- Consolati, et al. „Microtubule Nucleation Properties of Single Human γ TuRCs Explained by Their Cryo-EM Structure.“ *Developmental Cell*, 06 2020: 603-617.
- Cuello, et al. „Activation of Heterotrimeric G Proteins by a High Energy Phosphate Transfer via Nucleoside Diphosphate Kinase (NDPK) B and G β Subunits: complex formation of NDPK B with G β dimers and phosphorylation of His-266 in G β .“ *Journal of Biological Chemistry*, 02 2003: 7220-7226.
- Dechecchi, Tamanini und Cabrini. „Molecular basis of cystic fibrosis: from bench to bedside.“ *Annals of Translational Medicine*, 06 2018: 1-33.
- Engelhardt und Rochais. „G Proteins More Than Transducers of Receptor-Generated Signals?“ *Circulation Research*, 04 2007: 10091111.
- Farache, Laurent, Laurence und Merdes. „Assembly and regulation of γ -tubulin complexes.“ *Open Biology (The Royal Society of Publishing)*, 03 2018: 2046-2441.
- Fletcher und Mullins. „Cell mechanics and the cytoskeleton.“ *Nature*, 01 2010: 485-492.
- Foland, Dentler, Suprenant, Gupta, und Himes. „Paclitaxel-induced microtubule stabilization causes mitotic block and apoptotic-like cell death in a paclitaxel-sensitive strain of *Saccharomyces cerevisiae*.“ *Yeast*, 09 2005: 971-978.
- Fong, Rattner und Qi. „CDK5RAP2 Is a Pericentriolar Protein That Functions in Centrosomal Attachment of the γ -Tubulin Ring Complex.“ *Molecular Biology of the Cell*, 10 2007: 115-125.
- Franz, et al. „Mel28/ELYS is required for the recruitment of nucleoporins to chromatin and postmitotic nuclear pore complex assembly.“ *EMBO reports* , 02 2007: 165-172.
- Fu, Bian, Jiang, und Zhang. „Roles of Aurora Kinases in Mitosis and Tumorigenesis.“ *Molecular Cancer Research*, 01 2007: 10.1158/1541-7786.
- Galey, Askjaer, Franz, Lopez-Iglesias und Mattaj. „MEL-28, a novel nuclear-envelope and kinetochore protein essential for zygotic nuclear-envelope assembly in *C-elegans*.“ *Current Biology*, 09 2006: 1748-1756.
- Gard und Kirschner. „A microtubule-associated protein from *Xenopus* eggs that specifically promotes assembly at the plus- end.“ *The journal of cell biologie*, 11 1987: 2203-2215.
- Garrido, und Vernos. „Non-centrosomal TPX2-Dependent Regulation of the Aurora A Kinase: Functional Implications for Healthy and Pathological Cell Division.“ *frontiers in Oncology*, 2016. 2016: 1-8.
- Gaspar und Löwe. „Das bakterielle Zytoskelett.“ *BIOSpektrum* , 09 2011: 396-398.

- Gombos, et al. „GTP regulates the microtubule nucleation activity of γ -tubulin.“ *nature cell biology*, 11 2013: 1317-1327.
- Gomez-Ferreria, et al. „Novel NEDD1 phosphorylation sites regulate γ -Tubulin binding and mitotic spindle assembly.“ *Journal of Cell Science*, 08 2012: 3745-3751.
- Gómez-Saldivar, et al. „Identification of Conserved MEL-28/ELYS Domains with Essential Roles in Nuclear Assembly and Chromosome Segregation.“ *PLOS Genetics*, 06 2016: 1006131 1-27.
- Graser, Stierhof und Nigg. „Cep68 and Cep215 (Cdk5rap2) are required for centrosome cohesion.“ *Journal of Cell Science*, 09 2007: 4321-4330.
- Gressner und Arndt. *Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik 3. Auflage*. Berlin: Springer, 2019.
- Gruss *WBIO-B-02 Zellteilung*. Praktikumsskript, Bonn: Insitut für Genetik, 2019.
- Gruss, et al. „Ran Induces Spindle Assembly by Reversing the Inhibitory Effect of Importin α on TPX2 Activity.“ *Cell*, 01 2001: 83-93.
- Gruss und Vernos. „The mechanism of spindle assembly: functions of Ran and its target TPX2.“ *Journal of Cell Biology*, 09 2004: 949-955.
- Haren, Remy, Bazin, Callebaut, Wright, und Merdes. „NEDD1-dependent recruitment of the γ -tubulin ring to the centrosome is necessary for centriole duplication and spindle assembly.“ *The journal of cell biology*, 04 2013: 505-515.
- Honore, Pasquier und Braguer. „Understanding microtubule dynamics for improved cancer therapy.“ *Cellular and Molecular Life Sciences*, 07 2005: 3039-3056.
- Horejsí, et al. „Nuclear γ -Tubulin Associates With Nucleoli and Interacts With Tumor Suppressor Protein C53.“ *Journal of Cellular Physiology*, 03 2011: 367-382.
- Hutchins, et al. „Systematic Analysis of Human Protein Complexes Identifies Chromosome Segregation Proteins.“ *Science*, 04 2010: 593-599.
- Hutchins, Moore, und Clarke. „Dynamic localisation of Ran GTPase during the cell cycle.“ *BMC Cell Biology*, 09 2009: 1-10.
- Jahns „Die Rolle des CDK5RAP2 in autosomal-rezessiver primärer Mikrozephalie (MCPH).“ *Dissertation Charité Berlin, Freie Universität Berlin*, 11 2014: 1-52.
- Jaiswal, Kasera, Jain, Khandelwal, und Singh. „Centrosome: A Microtubule Nucleating Cellular Machinery.“ *Jorunal of the Indian Institute of Science*, 01 2021: 101 5-18.
- Jensen, und Schekman. „COPII-mediated vesicle formation at a glance.“ *Journal of cell science*, 12 2010: 1-4.
- Kim, und Kunsoo. „Importance of the Cep215-Pericentrin Interaction for Centrosome Maturation during Mitosis.“ *PLOS*, 01 2014: e87016.
- Kinoshita, Habermann und Hyman. „XMAP215: a key component of the dynamic microtubule cytoskeleton.“ *CellPress*, 06 2002: 267-273.
- Kollman, Merdes, Mourey und Agard. „Nature Reviews Molecular Cell Biology Microtubule nucleation by γ -tubulin complexes.“ *Nature reviews Molecular cell biology*, 10 2011: 709-721.

- Kollman et al. „The structure of the γ -Tubulin Small Complex: Implication of Its Architecture and Flexibility for Microtubule Nucleation.“ *Molecular Biology of the Cell*, 01 2008: 207-215.
- Kollman et al. „Ring closure activates yeast γ TuRC for species-specific microtubule nucleation.“ *nature structural & molecular biology*, 01 2015: 132-137.
- Kost und Chua. „The Plant Cytoskeleton.“ *cell*, 01 2002: 9-12.
- Kost, und Chua. „The Plant Cytoskeleton: Vacuoles and Cell Walls Make the Difference.“ *Cell*, 01 2002: 9-12.
- Kottwitz „Heterologe Expression und strukturelle Charakterisierung der intrazellulären Domäne der δ -Untereinheit des nikotinischen Acetylcholinrezeptors.“ *Dissertation*, 09 2005: 1-177.
- Kufer, Silljé, Körner, Gruss, Meraldi und Nigg. „Human TPX2 is required for targeting Aurora-A kinase to the spindle.“ *Journal of Cell Biology*, 08 2002: 617-623.
- Kufer, „Regulation der humanen Aurora-A Kinase und Identifikation potentieller Interaktionspartner.“ *Dissertation*, 04 2004: 15.
- Li und Zheng. „Phosphorylation of RCC1 in mitosis is essential for producing a high RanGTP concentration on chromosomes and for spindle assembly in mammalian cells.“ *Genes & Development*, 03 2004: 512-527.
- Liang, und MacRae. „Molecular chaperones and the cytoskeleton.“ *Journal of Cell Science*, 07 1997: 1431-1440.
- Lin, Neuner, Schlosser, Scharf, Weber und Schiebel. „Cell-cycle dependent phosphorylation of yeast pericentrin regulates γ -TuSC-mediated microtubule nucleation.“ *e-Life*, 04 2014: eLife 2014;3:e02208.
- Lin, et al. „MOZART1 and γ -tubulin complex receptors are both required to turn γ -TuSC into an active microtubule nucleation template.“ *The journal of cell biology*, 11 2016: 823-840.
- Liu, et al. „Insights into assembly and activation of the microtubule nucleator γ -TuRC.“ *nature*, 12 2019: 467-471.
- Liu, Choi, und Qi. „NME7 Is a Functional Component of the γ -tubulin Ring Complex.“ *Mol Biol Cell*, 07 2014: 2017-2025.
- Lohninger, Fröhlich, Mizaikoff und Rosenberg. *Teach/Me Instrumentelle Analytik*. Berlin: Springer-Verlag GmbH & Co. KG, 2003.
- Lyon, et al. „Higher-order oligomerization of Spc110p drives γ -tubulin ring complex assembly.“ *MBoC*, 05 2016: 2245-2258.
- Matamoros und Baas. „Microtubules in health and degenerative disease of the nervous system.“ *Brain Resear Bulletin (Autor Manuscript)*, 09 2017: 217-225.
- Merck. *Novagen Competent Cells Merck Biosciences*. Darmstadt, 07 2004.
- Michalczyk und Ziman. „Nestin structure and predicted function in cellular cytoskeletal organisation.“ *Histology and Histopathology (Cellular and Molecular Biology)*, 04 2005: 665-671.
- Mounier und Arrigo. „Actin cytoskeleton and small heat shock proteins: how do they interact.“ *Cell Stress Chaperons*, 04 2002: 167-176.

- Muroyama, Seldin und Lechler. „Divergent regulation of functionally distinct γ -tubulin complexes during differentiation.“ *Journal Cell Biology*, 06 2016: 679-692.
- Nakamura, et al. „Arabidopsis GCP3-interacting protein 1 MOZART 1 is an integral component of the γ -tubulin-containing microtubule nucleating complex.“ *the plant journal*, 03 2012: 216-225.
- Neumayer, Belzil, Gruss und Nguyen. „TPX2: of spindle assembly, DNA damage response, and cancer.“ *Cellular and Molecular Life Sciences*, 02 2014: 3027-3047.
- Orjalo, et al. „The Nup107-160 Nucleoporin Complex Is Required for Correct Bipolar Spindle Assembly.“ *Molecular biology of the cell*, 06 2006: 3806-3818.
- Paulin und Li. „Desmin: a major intermediate filament protein essential for the structural integrity and function of muscle.“ *Experimental Cell Research*, 09 2004: 1-7.
- Peloquin, Komarova und Borisy. „Conjugation of fluorophores to tubulin.“ *Nature Publishing Group*, 04 2005: 299-303.
- Pereira. „Cytoskeleton and Consciousness: An Evolutionary Based Review.“ *NeuroQuantology*, 05 2015: 232-239.
- Petry, Groen, Ishihara, Mitchison und Vale. „Branching Microtubule Nucleation in Xenopus Egg Extracts Mediated by Augmin and TPX2.“ *Cell*, 02 2013: 768-777.
- Petry, Pugieux, Nédélec und Vale. „Augmin promotes meiotic spindle formation and bipolarity in Xenopus egg extracts.“ *PNAS*, 07 2011: 14473-14478.
- Piehl, Tulu, Wadsworth und Cassimeris. „Centrosome maturation: Measurement of microtubule nucleation throughout the cell cycle by using GFP-tagged EB1.“ *PNAS*, 09 2004: 1584-1588.
- Pihan, „Centrosome Dysfunction Contributes to Chromosome Instability, Chromoanagenesis, and Genome Reprogramming in Cancer.“ *frontiers in Oncology*, 11 2013: 1-26.
- Rale, Kadzik und Petry. „Phase Transitioning the Centrosome into a Microtubule Nucleator.“ *Biochemistry*, 01 2018: 30-37.
- Rasala, Orjalo, Shen, Briggs, und Forbes. „ELYS is a dual nucleoporin/kinetochore protein required for nuclear pore assembly and proper cell division.“ *PNAS*, 11 2006: 17801-17806.
- Rasala, Orjalo, Shen, Briggs und Forbes. „ELYS is a dual nucleoporin/kinetochore protein required for nuclear pore assembly and proper cell division.“ *PNAS*, 11 2006: 17801-17806.
- Reish, et al. „A Homozygous Nme7 Mutation Is Associated with Situs Inversus Totalis.“ *Human Mutation*, 05 2016: 727-731.
- Roostalu und Surrey. „Microtubule nucleations: beyond the template.“ *nature reviews molecular cell biology*, 08 2017: 702-710.
- Russo, et al. „Mutational spectrum in congenital dyserythropoietic anemia type II: Identification of 19 novel variants in SEC23B gene.“ *American Journal of Hematology*, 08 2010: 915-920.
- Sahu, Ghosh, Fujita und Bandyopadhyay. „Live visualizations of single isolated tubulin protein self-assembly via tunneling current: effect of electromagnetic pumping during spontaneous growth of microtubule.“ *Scientific Reports*, 12 2014: 7303.
- Salisbury, Suino, Busby und Springett. „Centrin-2 is required for centriole duplication in mammalian cells.“ *Current Biology*, 08 2002: 1287-1292.

- Sauer, Roy-Chowdhury und Roy-Chowdhury. „Monogenic Liver Diseases.“ *Biomedical Sciences*, 08 2014: 1857-1865.
- Schiebel und Pereira. „The role of the yeast spindle pole body and the mammalian centrosome in regulating late mitotic events.“ *Current Opinion in Cell Biology*, 12 2001: 762-769.
- Sir, et al. „A primary microcephaly protein complex forms a ring around parental centrioles.“ *Nature Genetic*, 10 2011: 1147-1153.
- Stein Alvarez und McKee. „Chronic traumatic encephalopathy: a spectrum of neuropathological changes following repetitive brain trauma in athletes and military personnel.“ *Alzheimer's Research & Therapy*, 01 2014: 1-11.
- Tamura, Fukao, Iwamoto, Haraguchi, und Hara-Nishimura. „Identification and Characterization of Nuclear Pore Complex Components in *Arabidopsis thaliana*.“ *The plant cell*, 12 2010: 4084-4097.
- Tann und Moore. *The Golgi Apparatus and Centriole; MTOC Organization and Competition During Neuron Differentiation*. Zürich, Schweiz: Springer, Cham, 2019.
- Thawani, et al. „The transition state and regulation of the γ -TuRC-mediated microtubule nucleation revealed by single molecule microscopy.“ *eLife*, 06 2020: 2020;9:e54253.
- Thawani, Kadzik und Petry. „XMAP215 is a microtubule nucleation factor that functions synergistically with the gamma-tubulin ring complex.“ *Nature Cell Biology*, 05 2018: 575-585.
- Tovey, und Conduit. „Microtubule nucleation by γ -tubulin complexes beyond.“ *Essays in Biochemistry*, 10 2018: 765-780.
- Vaughan und King. *Dyneins; Kapitel 20 Roles of Cytoplasmic Dynein During Mitosis (522-535)*. Amsterdam, Niederlande: Elsevier, 2012.
- Wang, et al. „A shRNA functional screen reveals Nme6 and Nme7 are crucial for embryonic stem cell renewal.“ *Stem Cells*, 10 2012: 2199-2211.
- Wang, et al. „Conserved Motif of CDK5RAP2 Mediates Its Localization to Centrosomes and the Golgi Complex.“ *The Journal of Biological Chemistry*, 07 2010: 22658-22665.
- Weberruss und Antonin. „Perforating the nuclear boundary – how nuclear pore complexes assemble.“ *Journal of cell science*, 12 2016: 4439-4447.
- Wieczorek, Bechstedt, Chaaban und Brouhard. „Microtubule-associated proteins control the kinetics of microtubule nucleation.“ *nature cell biology*, 06 2015: 907-916.
- Wieczorek, Urnavicius, Ti, Molloy, Chait, und Karpoor. „Asymmetric Molecular Architecture of the Human γ -Tubulin Ring Complex.“ *Cell*, 12 2019: 165-175.
- Wiese, und Zheng. „Microtubule nucleation: γ -tubulin and beyond.“ *Journal of Cell Science*, 08 2006: 4143-4153.
- Wiese und Zheng. „A new function for the γ -tubulin ring complex as a microtubule minus-end cap.“ *Nature Cell Biology*, 06 2000: 358-364.
- Wilde und Zheng. „Stimulation of Microtubule Aster Formation and Spindle Assembly by the Small GTPase Ran.“ *Science*, 05 1999: 1359-1362.

- Winey, Yarar, Giddings und Mastronarde. „Nuclear Pore Complex Number and Distribution throughout the *Saccharomyces cerevisiae* Cell Cycle by Three-Dimensional Reconstruction from Electron Micrographs of Nuclear Envelopes.“ *Molecular Biology of the Cell*, 11 1997: 2119-2132.
- Wittmann, Wilm und Vernos. „TPX2, A novel xenopus MAP involved in spindle pole organization.“ *Journal of Cell Biology*, 06 2000: 1405-1428.
- Wolanin, Thomason und Stock. „Histidine protein kinases: key signal transducers outside the animal kingdom.“ *Genome Biology*, 09 2002: reviews3013.1–reviews3013.8.
- Woods, Bond und Enard. „Autosomal recessive primary microcephaly (MCPH): a review of clinical, molecular, and evolutionary findings.“ *Am J. Hum. Genet.*, 05 2005: 717-728.
- Yang, et al. „Mutations in the coat complex II component SEC23B promote colorectal cancer metastasis.“ *cell death & disease*, 02 2020: 157 1-15.
- Yokoyama, et al. „The nucleoporin MEL-28 promotes RanGTP-dependent γ -tubulin recruitment and microtubule nucleation in mitotic spindle formation.“ *nature communications*, 02 2014: 1-9.
- Zhang, Roostalu, Surrey und Nogales. „Structural insight into TPX2-stimulated microtubule assembly.“ *eLife*, 11 2017: 6:e30959.
- Zhang, Roostalu, Surrey und Nogales. „Structural insight into TPX2-stimulated microtubule assembly.“ *Biochemistry and Chemical Biology Structural Biology and Molecular Biophysics*, 11 2017: 1-22.
- Zhu, et al. „The mammalian SPD-2 ortholog Cep192 regulates centrosome biogenesis.“ *cell press*, 01 2008: 136-141.
- Zong, et al. „TRAPPC9 Mediates the Interaction between p150 and COPII Vesicles at the Target Membrane.“ *PLOSOne*, 01 2012: e29995.

13 Anhang

13.1 Marker



Abbildung 22: NEB Protein Marker

Farbgefärbter Proteinstandard, Bereich MW 11–245 kDa. Der Proteinmarker wird für alle Polyacrylamid-Gelelektrophoresen und Western Blots verwendet.

13.2 Proteinkonzentrationen

Tabelle 6: Proteinkonzentration durch BSA-Vergleich

Aufgelistet sind die Mengen (Volumen) an BSA und Protein die je Bahn auf dem SDS-Gel aufgetragen werden. Das zu bestimmende Protein wird zunächst in einem Ansatz von 2 μl Protein mit 18 μl Probenpuffer verdünnt. Anschließend werden 2, 5 und 10 μl je Bahn aufgetragen. Die Konzentration lässt sich nach einer Färbung des Gels mit InstantBlue im Vergleich der eingesetzten Menge an BSA und dem Volumen des synthetisierten Proteins (Da) bestimmen.

BSA-Stammlösung/Bahn	1 μl	2 μl	4 μl	6 μl	8 μl	10 μl
Menge BSA/Bahn	0,25 μg	0,5 μg	1 μg	1,5 μg	2 μg	2,5 μg

Ansatz Probe: 2 μl Protein und 18 μl Probenpuffer

Aufgetragener Ansatz/Bahn (Proteinmenge/Bahn)	2 μl	5 μl	10 μl
	(0,2 μl)	(0,5 μl)	(1 μl)

13.3 Polymerase Kettenreaktion

Tabelle 7: Komponenten und Ablauf der Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Gezeigt sind die Reagenzien der PCR (a + c) sowie das Programm zur DNA-Synthese (b + d). Die Menge der eingesetzten DNA ist weniger als 1,0 ng (a). Die Temperatur der Primer richtet sich nach den in 11.8 angegebenen Primer. Die Amplifikationszeit beträgt 30 sek./kb, bei der normalen Polymerasekettenreaktion (b). Ansatz (c) für Mutations-PCR. Zu beachten ist, dass je Reaktionsansatz nur ein Primerpaar hinzugefügt wird. Die unterschiedlichen Reaktionsansätze werden bei einer geringeren Annealingtemperatur nach einer ersten PCR bestehend aus 15 Zyklen vereinigt (d). Es erfolgt eine Standard-PCR mit 35 Zyklen bei nach 11.8 bestimmten Annealingtemperaturen. Im Anschluss erfolgt ein Verdau mit Dpn1 zur Beseitigung der DNA Vorlage.

a) Standard-Reaktionsmix PCR

Komponenten	25 µl Reaktionsansatz	Finale Konzentration
5x Q5 Reaktionspuffer	5 µl	1 x
10 mM dNTPs	0,5 µl	200 µM
10 µM Forward Primer	1,25 µl	0,5 µM
10 µM Reverse Primer	1,25 µl	0,5 µM
Template DNA	variabel	< 1,0 ng
Q5 Polymerase	0,25 µl	0,02 U/µl
ddH ₂ O	Add 25 µl	

b) Standard-Reaktionsbedingungen PCR

Ablauf	Temperatur	Zeit
Anfangstemperatur	98 °C	30 sek.
25-35 Zyklen	98 °C	5-10 sek.
	50-72 °C (vgl Primer 11.8)	10-30 sek.
	72 °C	20-30 sek.
Finale Extension	72 °C	120 sek.
Ende	4 °C	∞

c) Mutation-Reaktionsmix PCR (je ein Ansatz mit Forward bzw. Reverse Primer)

Komponenten	25 µl Reaktionsansatz	Finale Konzentration
5x Q5 Reaktionspuffer	5 µl	1 x
10 mM dNTPs	0,5 µl	200 µM
10 µM Forward oder Reverse Primer	1,25 µl	0,5 µM
Template DNA	variabel	< 1,0 ng
Q5 Polymerase	0,25 µl	0,02 U/µl
ddH ₂ O	Add 25 µl	

d) Mutation-Reaktionsbedingungen PCR (zunächst je ein Ansatz mit Forward bzw. Reverse Primer)

Ablauf	Temperatur	Zeit
Anfangstemperatur	98 °C	30 sek.
15 Zyklen	98 °C	5-10 sek.
	55 °C	10-30 sek.
	72 °C	20-30 sek.
Finale Extension	72 °C	120 sek.
Pause	4 °C	∞

PCR Ansatz aus Forward und Reverse Primer vereinigen

Anfangstemperatur	98 °C	30 sek.
25-35 Zyklen	98 °C	5-10 sek.
	50-72 °C (vgl. Primer 11.8)	10-30 sek.
	72 °C	20-30 sek.
Finale Extension	72 °C	120 sek.
Ende	4 °C	∞

13.4 Mess- und Analyseergebnisse

Tabelle 8: Übersicht der Quantitativen Auswertungen von Sec23, NME7, Mel-28 und CDK5RAP2

Ergebnisse der quantitativen Auswertung der Box-Blot Auswertung aus **Abbildung 3, Abbildung 5, Abbildung 7, Abbildung 10 und Abbildung 16**. Anzahl der durchgeführten Versuche = 3. Angegeben ist die Anzahl der Ausgewerteten Zellen, Minimal- und Maximalwert, unter und oberes Quartil, Standardabweichung, Mittelwert, TTEST (unabhängig und ungepaart), Signifikanz nach Bonferroni-Korrektur

Mitosephasen	N	Min	Q1	Median	Q3	Max	Mean	SD	TTEST	* 0,00625
Centrin Abbildung 3 b										
Interphase	73	65	86	95	112	199	100	23	1,00E+00	
Prophase	47	35	72	87	106	175	91	27	5,72E-02	
Metaphase	78	64	95	107	135	218	118	35	3,04E-04	*
Anaphase	53	60	82	93	120	269	105	37	3,54E-01	
Telophase	85	51	78	91	112	191	96	28	3,71E-01	
γ-Tubulin Abbildung 5 b (aus Sec23 Datensatz)										
Interphase	129	45	84	96	107	188	100	24	1,00E+00	
Prophase	47	87	151	175	200	230	171	36	9,63E-19	*
Metaphase	148	99	173	194	218	272	193	33	2,43E-78	*
Anaphase	72	74	130	171	205	321	170	53	1,72E-17	*
Telophase	106	41	96	109	130	245	116	32	6,21E-05	*
Sec23A Abbildung 5 c										
Interphase	130	18	64	97	126	223	100	41	1,00E+00	
Prophase	55	34	73	100	136	181	103	40	6,09E-01	
Metaphase	161	23	77	104	160	273	123	56	1,03E-04	*
Anaphase	72	31	64	102	152	320	114	59	8,23E-02	
Telophase	106	30	68	79	933	159	80	23	4,02E-06	*
γ-Tubulin Abbildung 7 b (aus NME7 Datensatz)										
Interphase	120	54	86	96	110	157	100	22	1,00E+00	
Prophase	102	90	131	163	185	288	164	42	2,29E-28	*
Metaphase	213	95	146	167	198	327	176	44	1,23E-61	*
Anaphase	44	84	118	142	160	286	150	44	4,08E-09	*
Telophase	182	56	91	106	129	234	114	34	3,03E-05	*
Nme7 Abbildung 7 c										
Interphase	118	13	46	81	141	346	100	70	1,00E+00	
Prophase	102	12	49	75	129	406	96	67	6,60E-01	
Metaphase	207	18	64	108	222	758	164	145	1,51E-07	*
Anaphase	42	14	34	66	165	501	121	127	3,22E-01	
Telophase	151	13	28	46	82	956	82	110	1,11E-01	
γ-Tubulin Abbildung 10 b (aus Mel-28 Datensatz)										
Interphase	56	43	69	94	130	172	100	37	1,00E+00	
Prophase	65	29	119	168	227	685	195	127	1,79E-07	*
Metaphase	86	38	138	182	240	663	205	113	1,54E-12	*
Anaphase	45	0	54	141	246	429	165	122	1,14E-03	*
Telophase	117	0	37	71	129	495	96	92	6,97E-01	
Mel-28 Abbildung 10 c										
Interphase	120	25	73	101	122	187	100	38	1,00E+00	
Prophase	92	13	68	125	163	341	126	73	2,10E-03	*
Metaphase	139	11	27	34	52	320	48	47	2,26E-19	*
Anaphase	54	28	47	64	90	299	76	43	6,24E-04	*
Telophase	124	14	54	84	114	241	90	46	7,02E-02	
γ-Tubulin Abbildung 16 b (aus CDK5RAP2 Datensatz)										
Interphase	126	237	781	977	1213	1846	100	328	1,00E+00	
Prophase	69	600	1009	1255	1612	12524	1629	1771	4,64E-03	*
Metaphase	173	217	1357	1663	2025	9370	1839	1010	2,86E-20	*
Anaphase	77	845	1098	1306	1686	2445	1411	417	1,67E-11	*
Telophase	105	244	880	1073	1532	3929	1287	663	8,45E-05	*
Cdk5rap2 Abbildung 16 c										
Interphase	126	0	68	101	145	359	100	73	1,00E+00	
Prophase	60	0	185	288	365	1256	301	213	1,07E-09	*
Metaphase	138	0	272	383	489	118	407	196	1,48E-39	*
Anaphase	73	100	160	248	381	787	284	172	1,52E-13	*
Telophase	105	0	0	82	160	470	113	116	3,37E-01	

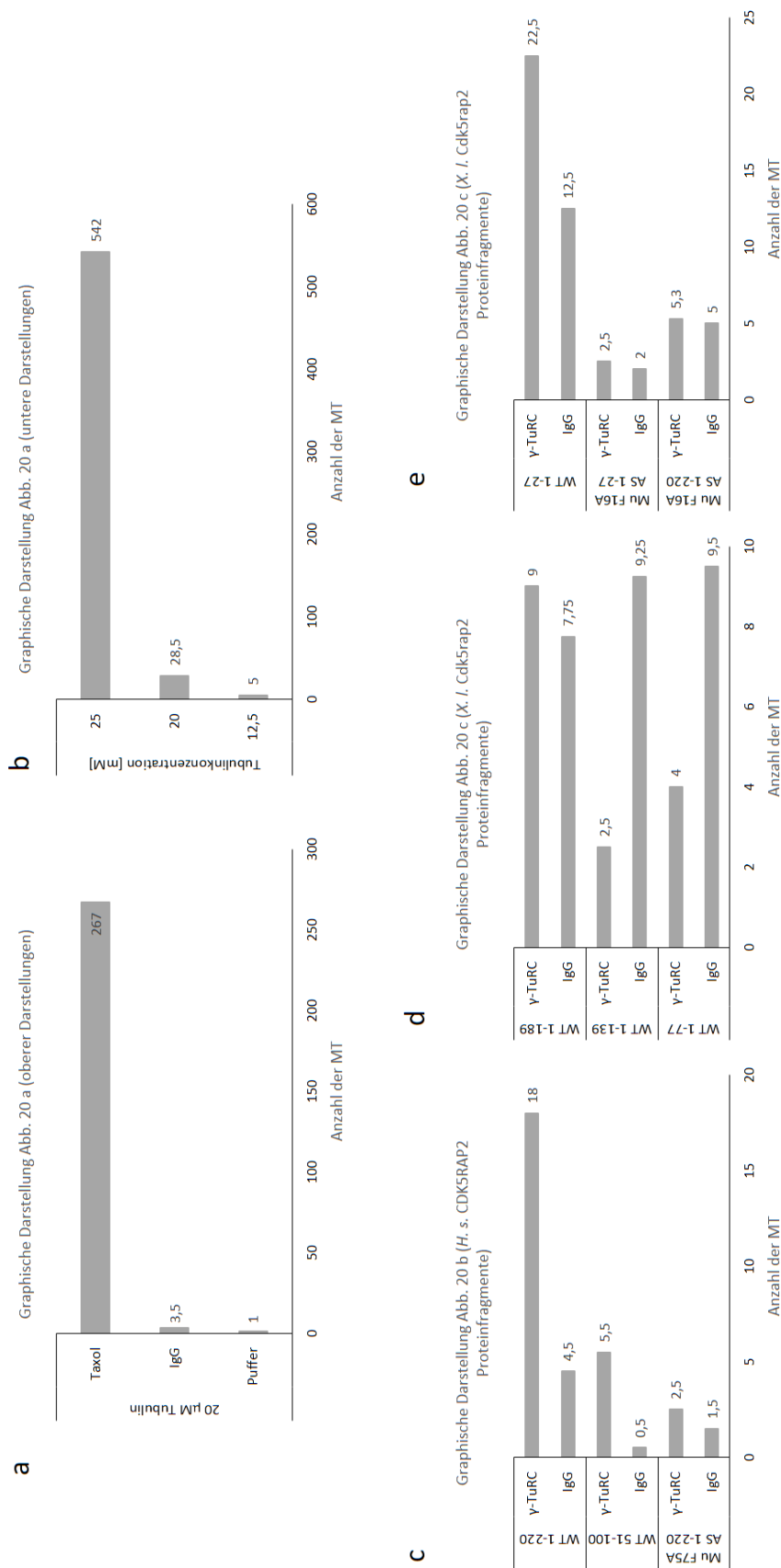


Abbildung 23: Graphische Darstellung der aus Abbildung 20 ermittelten Daten

Graphisch dargestellt sind die absoluten Durchschnittszahlen der jeweils ermittelten MT aus der **Abbildung 20 a-e** im Säulendiagramm

Tabelle 9: Tandem MS/MS Daten der Immunpräzipitation mit γ -Tubulin Antikörper (niedrige Salzkonzentration)

Aufgelistet ist absteigend die Summe der Fragmente die mit einem γ -Tubulin bzw. IgG Antikörper präzipitiert wurden. Die Differenz der Detektierten Fragmente ergibt sich aus der Σ der Kontrolle - Σ Protein von Interesse. Aufgelistet sind die Proteine bis einschließlich einer Differenz von -9. Die vorletzte Spalte gibt den Proteinnamen an. Grau hinterlegt sind Proteine des γ -TuRC, COPII Vesikel und des NPC. (eigene Auswertung, Experiment durch Peng Liu Zentrum für Molekulare Biologie (Heidelberg))

Σ Fragmente Immunpräzipitat mit γ - Tubulin Antikörper (n = 3)	Σ Fragmente Immunpräzipitat mit IgG Antikörper (Kontrolle) (n = 3)	Differenz Spalte 2 – Spalte 1	Protein
81	3	-78	Dnm2
81	5	-76	Myof
89	19	-70	TubGCP3
69	1	-68	Tjp3
55	2	-53	Sec23B
66	13	-53	TubG1
51	0	-51	Cep192
58	16	-42	Tubg1
39	1	-38	TubGCP4
38	3	-35	Sec24A
36	1	-35	Zfr
34	0	-34	Sec16A
34	0	-34	hypothetical Protein LOC734528
39	5	-34	Mgc80941 Protein
40	11	-29	Pabpn1L
25	3	-22	Atxn2L
32	10	-22	Dhx36
32	11	-21	Ilf3
26	6	-20	Elf4G1
20	3	-17	Syncrip
16	0	-16	Nup160
16	0	-16	Prrc2A
18	2	-16	TubGCP2
18	3	-15	Hnrnpd
27	12	-15	Ncl
18	4	-14	Fxr1
14	0	-14	Sec23B
17	4	-13	Mel-28

Niedrige Salzkonzentration

22	9	-13	CDCdc5L
37	24	-13	Ddx6
13	0	-13	Elavl1
17	4	-13	Ilf2
13	0	-13	Sec24B
12	0	-12	TubGCP3
11	0	-11	AurkB
11	0	-11	Unknown (protein for IMAGE:7681019)
17	7	-10	AurkA
10	0	-10	Fubp3
10	0	-10	Sec23A
10	0	-10	LOC398646 protein
11	2	-9	Dhx5
9	0	-9	Hnrnpr
22	13	-9	Nup205
9	0	-9	Nup98
9	0	-9	Pabpc1
10	1	-9	Strbp

Tabelle 10: Tandem MS/MS Daten der Immunpräzipitation mit γ -Tubulin Antikörper (hohe Salzkonzentration)

Aufgelistet ist absteigend die Summe der Fragmente die mit einem γ -Tubulin bzw. IgG Antikörper präzipitiert wurden. Die Differenz der Detektierten Fragmente ergibt sich aus der Σ der Kontrolle - Σ Protein von Interesse. Aufgelistet sind die Proteine bis einschließlich einer Differenz von -9. Die vorletzte Spalte gibt den Proteinnamen an. Grau hinterlegt sind Proteine des γ -TuRC, COPII Vesikel und des NPC. (eigene Auswertung, Experiment durch Peng Liu Zentrum für Molekulare Biologie (Heidelberg))

Σ Fragmente Immunpräzipitat mit γ - Tubulin Antikörper (n = 3)	Σ Fragmente Immunpräzipitat mit IgG Antikörper (Kontrolle) (n = 3)	Differenz Spalte 2 – Spalte 1	Protein
90	1	-89	Dnm2
86	1	-85	TubGCP3
85	0	-85	hypothetical Protein LOC734528 [<i>Xenopus laevis</i>]
68	3	-65	TubGCP6
60	5	-55	hypothetical Protein LOC495938 [<i>Xenopus laevis</i>]
54	2	-52	TubGCP2
47	0	-47	Tjp3
47	0	-47	Zfr
39	0	-39	Sec24A
35	0	-35	TubGCP4
33	0	-33	Cyfp1
32	1	-31	Sec23B
26	0	-26	Tjp1
25	0	-25	Nedd1
20	0	-20	Rad52
19	0	-19	Nme7
18	0	-18	TubGCP2
17	0	-17	Sec16A
16	0	-16	TubGCP3
19	4	-15	Pabp
14	0	-14	Rptor
11	0	-11	LOC398578 protein [<i>Xenopus laevis</i>]
11	0	-11	Atxn2L
10	0	-10	Ilf2
9	0	-9	Aurkb
9	0	-9	RipK1

Hohe
Salzkonzentration

Tabelle 11: Tandem MS/MS Daten der Immunpräzipitation mit NME7 Antikörper

Aufgelistet ist absteigend die Summe der Fragmente die mit einem Nme7 bzw. IgG Antikörper präzipitiert wurden. Die Differenz der Detektierten Fragmente ergibt sich aus der Σ der Kontrolle - Σ Protein von Interesse. Aufgelistet sind die Proteine bis einschließlich einer Differenz von -3. Die vorletzte Spalte gibt den Proteinnamen an. Grau hinterlegt sind Proteine des γ -TuRC, COPII Vesikel und des NPC.

Σ Fragmente Immunpräzipitat mit NME7 Tubulin Antikörper (n = 3)	Σ Fragmente Immunpräzipitat mit IgG Antikörper (Kontrolle) (n = 3)	Differenz Spalte 2 – Spalte 1	Protein
444	313	-131	Krt1
256	181	-75	Krt1
29	4	-25	Ndpk
23	1	-22	TubG
25	7	-18	Krt2
18	0	-18	TubG
12	0	-12	TubG
12	1	-11	Nme7
6	0	-6	TubG
6	1	-5	Krt1
5	0	-5	TubG
12	9	-3	Krt16
5	2	-3	Uncharacterized Protein
5	2	-3	Uncharacterized Protein
5	2	-3	GapDh

Tabelle 12: Tandem MS/MS Daten der Immunpräzipitation mit SEC24A Antikörper

Aufgelistet ist die Summe der Fragmente die mit einem Sec24A bzw. IgG Antikörper präzipitiert wurden. Die Differenz der Detektierten Fragmente ergibt sich aus der Σ der Kontrolle - Σ Protein von Interesse. Aufgelistet sind die Proteine bis einschließlich einer Differenz von -3. Die vorletzte Spalte gibt den Proteinnamen an. Grau hinterlegt sind Proteine des γ -TuRC, COPII Vesikel und des NPC.

Σ Fragmente Immunpräzipitat mit SEC24A Tubulin Antikörper (n = 3)	Σ Fragmente Immunpräzipitat mit IgG Antikörper (Kontrolle) (n = 3)	Differenz Spalte 2 – Spalte 1	Protein
34	0	-34	Cep152
28	0	-28	Arhgef7
23	0	-23	Git2L
20	0	-20	Sec24A
15	0	-15	Irf2Bpl
13	0	-13	Cep192
12	0	-12	Abcd1
11	0	-11	Git1
10	28	18	Hsc70
10	1	-9	Pk
9	0	-9	LOC397826
9	0	-9	Sec16
7	0	-7	KatnB1
7	0	-7	KatnA1
7	0	-7	XELAEV_18039250
7	0	-7	Abcd1
7	0	-7	Cep63
6	8	2	Alb Iso 1
6	0	-6	Irf2 BP
5	0	-5	Eef2
5	0	-5	Katana1
5	0	-5	RabGAP1
5	0	-5	ArhGEF1
5	0	-5	Sec23A

Tabelle 13: Froschfutter Aquatic 3 Elementenanalyse
Zusammensetzung Froschfutter der Firma Special Diets SeviceS

NUTRIENTS			Total	Supp (9)	NUTRIENTS			Total	Supp (9)
Proximate Analysis					Macro Minerals				
Moisture (1)	%		10.00		Glutamic Acid	%	6.67		
Crude Oil	%		6.49		Proline	%	2.14		
Crude Protein	%		39.00		Serine	%	1.61		
Crude Fibre	%		2.38		Hydroxyproline	%	0.21		
Ash	%		8.75		Hydroxylysine	%	0.05		
Nitrogen Free Extract	%		33.16		Alanine	%	1.24		
Digestibility Co-Efficients (7)					Micro Minerals				
Digestible Crude Oil	%		5.94		Calcium	%	2.23	0.95	
Digestible Crude Protein	%		35.75		Total Phosphorus	%	1.16	0.29	
Carbohydrates, Fibre and Non Starch Polysaccharides (NSP)					Phytate Phosphorus				
Total Dietary Fibre	%		5.81		Available Phosphorus	%	0.18	0.29	
Pectin	%		0.67		Sodium	%	0.16		
Hemicellulose	%		2.86		Chloride	%	0.20		
Cellulose	%		2.00		Potassium	%	0.81		
Lignin	%		0.33		Magnesium	%	0.14	0.01	
Starch	%		24.61		Micro Minerals				
Sugar	%		4.08		Iron	mg/kg	174.64	31.61	
Energy (5)					Copper	mg/kg	18.22	6.26	
Gross Energy	MJ/kg		16.82		Manganese	mg/kg	67.90	45.08	
Digestible Energy (15)	MJ/kg		14.72		Zinc	mg/kg	82.24	52.03	
Metabolisable Energy (15)	MJ/kg		13.50		Cobalt	µg/kg	459.18	399.15	
Atwater Fuel Energy (AFE) (8)	MJ/kg		14.51		Iodine	µg/kg	835.15	279.08	
AFE from Oil	%		16.83		Selenium	µg/kg	234.57	0.17	
AFE from Protein	%		44.95		Fluorine	mg/kg	6.33		
AFE from Carbohydrate	%		38.22		Vitamins				
Fatty Acids					β-Carotene (2)	mg/kg	3.58		
Saturated Fatty Acids					Retinol (2)	µg/kg	6162.00	4500.19	
C12:0 Lauric	%		0.09		Vitamin A (2)	iu/kg	20483.76	15000.62	
C14:0 Myristic	%		0.17		Cholecalciferol (3)	µg/kg	96.56	60.00	
C16:0 Palmitic	%		1.31		Vitamin D (3)	iu/kg	3862.57	2400.00	
C18:0 Stearic	%		0.24		α-Tocopherol (4)	mg/kg	152.75	140.95	
Monounsaturated Fatty Acids					Vitamin E (4)	iu/kg	168.03	155.05	
C14:1 Myristoleic	%		0.01		Vitamin B ₁ (Thiamine)	mg/kg	12.02	9.81	
C16:1 Palmitoleic	%		0.14		Vitamin B ₂ (Riboflavin)	mg/kg	13.84	11.76	
C18:1 Oleic	%		2.32		Vitamin B ₆ (Pyridoxine)	mg/kg	17.04	13.73	
Polyunsaturated Fatty Acids					Vitamin B ₁₂ (Cyanocobalamin)	µg/kg	84.95	75.00	
C18:2(ω6) Linoleic	%		1.34		Vitamin C (Ascorbic Acid) (16)	mg/kg	52.33	52.33	
C18:3(ω3) Linolenic	%		0.14		Vitamin K (Menadiolone)	mg/kg	72.00	72.00	
C20:4(ω6) Arachidonic	%		0.20		Folic Acid (Vitamin B ₉)	mg/kg	4.79	2.94	
C22:5(ω3) Clupanodonic	%		0.06		Nicotinic Acid (Vitamin PP) (6)	mg/kg	62.12	27.54	
Amino Acids					Pantothenic Acid (Vitamin B ₃)	mg/kg	21.48	11.63	
Arginine	%		2.44		Choline (Vitamin B ₄)	mg/kg	1290.43	0.21	
Lysine (6)	%		2.23	0.11	Inositol	mg/kg	1117.03	6.30	
Methionine	%		0.80	0.04	Biotin (Vitamin H) (6)	µg/kg	429.82	230.42	
Cystine	%		0.58		Notes				
Tryptophan	%		0.38		1. All values are calculated using a moisture basis of 10%.				
Histidine	%		0.95		Typical moisture levels will range between 9.5 - 11.5%.				
Threonine	%		1.55		2. a. Vitamin A includes Retinol and the Retinol equivalents of β-carotene				
Isoleucine	%		1.79		b. Retinol includes the Retinol equivalents of β-carotene.				
Leucine	%		3.70		c. 0.48 µg Retinol = 1 µg β-carotene = 1.6 iu Vitamin A activity				
Phenylalanine	%		2.03		d. 1 µg Retinol = 3.33* iu Vitamin A activity				
Valine	%		1.91		e. 1 iu Vitamin A = 0.3 µg Retinol = 0.6 µg β-carotene				
Tyrosine	%		1.47		f. The standard analysis for Vitamin A does not detect β-carotene				
Taurine	%				3. 1 µg Cholecalciferol (D ₃) = 40.0 iu Vitamin D				
Glycine	%		3.35		4. 1 mg all-rac-α-tocopherol = 1.1 iu Vitamin E activity				
Aspartic Acid	%		2.75		1 mg all-rac-α-tocopherol acetate = 1.0 iu Vitamin E activity				
					5. 1 MJ = 239.23 Kcalories = 239.23 Calories = 239,230 calories				
					6. These nutrients coming from natural raw materials such as cereals may have low availabilities due to the interactions with other compounds.				
					7. Based on in-vitro digestibility analysis.				
					8. AF Energy = Atwater Fuel Energy = ((CO%/100)*9000)+((CP%/100)*4000)+((NFE%/100)*4000)/239.23				
					9. Supplemented nutrients from manufactured and mined sources.				
					15. Calculated.				
					16. Supplemented Vit. C as Ascorbyl Polyphosphate.				

14 Danksagung

Der Erste Dank geht an alle die, die mich auf dem Weg zur Doktorarbeit begleitet und unterstützt haben.

Ein besonderer Dank gilt Herrn Professor Doktor Gruß, der mir die Möglichkeit gegeben, hat in seiner Arbeitsgruppe diese Arbeit anzufertigen. Sie standen mir die ganze Zeit mit Rat und Tat zur Seite und haben mir für diese Arbeit immer wieder neue Ideenansätze und Möglichkeiten gegeben. Sie haben mir gezeigt, dass man verschiedene Blickwinkel braucht, um die eigenen und die Ergebnisse anderer Wissenschaftler richtig zu deuten und zu verstehen.

Bedanken möchte ich mich auch bei Herrn Professor Doktor Witke für die Zweitbegutachtung meiner Arbeit.

Danken möchte ich auch der ganzen Arbeitsgruppe um Professor Gruß. Ein so angenehmes Arbeits- und Lernklima ist nicht selbstverständlich. Die Art und Weise der Unterstützung durch Teamarbeit gibt allen die Möglichkeit, nicht nur seine eigenen Großprojekte zu verwirklichen, sondern auch in anderen Themengebiete mit zu arbeiten. Namentlich genannt werden soll hier Gerd Landsberg, mit dem ich über unsere Ergebnisse diskutiert habe und der mir immer im Labor zur Seite stand. Nicht zu vergessen ist Alina Lapp, die mir geholfen hat die große Anzahl an Versuchen zu bewältigen.

An dieser Stelle möchte ich auch meine Kommilitonen nennen. Mit Freunden zu studieren macht aus einem anspruchsvollen Studium eine zu schaffende Aufgabe. Ich danke allen meinen Freunden, die Verständnis für mich und meine Arbeit in den letzten Monaten hatten. Neben der anstrengenden Arbeit ist es wichtig abschalten zu können und Weggefährten zu haben, die einen im täglichen Leben begleiten.

Der letzte und größte Dank gilt meiner Familie rund um die Welt und meiner Freundin Carina. Auch wenn es während der Arbeit einen schweren Schicksalsschlag gab, haben wir alle zusammengehalten und gezeigt, wie stark man sein kann, wenn man zusammenhält. Namentlich nennen möchte ich hier unbedingt meine Geschwister Michael, Martin und Caroline. Zu den wichtigsten Personen in meinem Leben gehören meine Eltern. Der Dank kann nicht groß genug sein.