

# 1 ZUSAMMENFASSUNG

## 1.1 Deutsche Zusammenfassung

Der Basalapparat der einzelligen Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* besteht aus den beiden geißeltragenden Basalkörpern sowie aus zwei Probasalkörpern und assoziierten Fibrillen und Mikrotubuli. Der ultrastrukturelle Aufbau der Basalkörper stimmt weitgehend mit dem der Centriolen tierischer Centrosomen überein: Neun ringförmig angeordnete Mikrotubulitriplets bilden einen Zylinder von ca. 400 nm Länge. In Querschnitten lassen sich verschiedene Strukturen wie das „cartwheel“ im proximalen Bereich der Basalkörper oder die Sternstruktur in der Übergangsregion zur Geißel unterscheiden. Die beiden Basalkörper sind miteinander über Verbindungsfibrillen verbunden und durch die „transitional fibers“ an der Plasmamembran angeheftet. Ausgehend von den Basalkörpern verlaufen die sogenannten Geißelwurzeln ins Zellinnere. Sie verbinden den Basalapparat mit verschiedenen Zellorganellen und sind somit an der inneren Organisation der gesamten Zelle beteiligt. Da über die Proteinzusammensetzung der Basalapparate bisher wenig bekannt war, sollte in dieser Arbeit das Proteom der Basalapparate von *C. reinhardtii* näher charakterisiert werden.

Zur Identifikation der Proteine wurde zunächst eine Reinigungsmethode für Basalapparate von *C. reinhardtii* entwickelt. Die gereinigten Basalapparate wurden anschließend elektrophoretisch in einem 1D-SDS-PAGE aufgetrennt, das komplette Gel in 51 Banden zerschnitten und die Banden massenspektrometrisch analysiert. Dieser erste Ansatz lieferte insgesamt 1123 unterschiedliche Peptide. Die Peptide konnten 124 Genmodellen, aber auch EST-Einträgen sowie genomischen Positionen, an denen sich bisher keine Genmodelle befanden, zugeordnet werden. In einem 2. Ansatz wurde ein Basalapparat-Pellet nach dem MudPIT-Verfahren („multidimensional protein identification technology“) direkt – ohne vorherige elektrophoretische Auftrennung – untersucht. In diesem Ansatz wurden 450 Peptide in 295 Genmodellen identifiziert. Darüber hinaus wurden Basalapparate reproduzierbar mittels 2D-PAGE in ca. 60-75 Spots aufgetrennt.

Da zu diesem Zeitpunkt bereits eine Veröffentlichung des Proteoms der Basalkörper von *C. reinhardtii* vorlag (ebenfalls durch MudPIT ermittelt), war ein direkter Vergleich der jeweils identifizierten Genmodelle möglich. Der Vergleich der 295 mit dem MudPIT-Verfahren identifizierten Genmodelle mit dieser Veröffentlichung lieferte eine Liste von

35 z.T. bekannten (wie z.B.  $\alpha$ - und  $\beta$ -Tubulin, Centrin) und neuen, potentiellen Basalapparatproteinen.

Im Folgenden wurden fünf dieser neuen, potentiellen Basalapparatproteine, die bei den unterschiedlichen Ansätzen (1D-Gel-Ansatz und MudPIT-Verfahren) mit mehreren Peptiden identifiziert worden waren, näher charakterisiert. Einer dieser Kandidaten ist fälschlicherweise als mitochondrialer Translationsfaktor annotiert; hier wurden vermutlich zwei unterschiedliche Gene zu einem Modell zusammengefaßt. Für diesen Kandidaten wurde eine genomische Sequenzlücke geschlossen. Für die vier anderen Kandidaten wurden partielle cDNAs kloniert und zunächst sequenziert. Der Vergleich dieser Sequenzen mit den Genmodellen führte bei Kandidat 90 zur Entdeckung von zwei neuen Exons. Bei Kandidat 27 stellte sich heraus, dass Exon 6 um 42 bp länger ist als im Genmodell angegeben. Die cDNAs wurden in *E. coli* überexprimiert und die rekombinanten Proteine zur Erzeugung von polyklonalen Antikörpern in Kaninchen verwendet. In Western-Blots reagierten die Antikörper sowohl mit dem rekombinanten Protein der Bakterien als auch mit entsprechenden Proteinen in isolierten Basalapparaten. Drei der Proteine konnten mit Hilfe der Antikörper in der Immunfluoreszenzmikroskopie im Bereich des Basalapparates lokalisiert werden.

## 1.2 Englische Zusammenfassung/Abstract

The basal apparatus of the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii* consists of the two flagella-bearing basal bodies, two probasal bodies and numerous associated fibers and microtubules. The ultrastructure of the basal bodies bears resemblance to the centrioles found in animal centrosomes: nine microtubular triplets are arranged in a ring and form a cylinder with a length of about 400 nm. In cross-sections different structures like the cartwheel in the proximal region of the basal bodies or the stellate structure in the transition region towards the flagellum can be identified. The basal bodies are connected by connecting fibers and anchored to the plasmamembrane via the transitional fibers. From the basal bodies the so-called microtubular roots extend into the interior of the cell. They link the basal apparatus to different cell organelles and thus are involved in the internal organization of the entire cell. As rather little was known so far about the protein composition of the basal apparatus, the work presented here aimed at characterizing the proteome of the basal apparatus of *C. reinhardtii*.

To identify the proteins a purification method for the basal apparatus of *C. reinhardtii* was developed in a first step. The purified basal apparatus were then electrophoretically separated on a 1D-SDS-PAGE, the complete lane was cut into 51 slices and all slices were analyzed by mass spectrometry. This first approach resulted in 1123 different peptides. The peptides could be assigned to 124 gene models but also to EST-entries and genomic positions for which no gene models existed so far. In a second approach a basal apparatus pellet was directly analyzed by MudPIT (multidimensional protein identification technology) – without prior electrophoretic separation. In this approach 450 peptides in 295 gene models were identified. Furthermore basal apparatus were reproducibly separated into 60-75 spots via 2D-PAGE.

At this timepoint there was already a publication of the basal body proteom of *C. reinhardtii* (also determined by MudPIT) and therefore a direct comparison of the identified gene models was possible. Comparing the 295 gene models from the MudPIT-approach with this publication resulted in a list of 35 already known (like  $\alpha$ - and  $\beta$ -tubulin, centrin) and new potential basal body proteins.

In the following five of these potential basal body proteins that had been identified with several peptides in the different approaches (1D-gel-approach and MudPIT-approaches) were further characterized. One of these candidates is wrongly annotated as mitochondrial translation factor; here two different genes were probably combined into one model.

For this candidate a genomic sequence gap was closed. For the other four candidates partial cDNAs were cloned and sequenced. The comparison of these sequences with the predicted gene models led – in the case of candidate 90 – to the identification of two new exons. Exon 6 of candidate 27 was found to be 42 bp longer than predicted in the gene model. The cDNAs were overexpressed in *E. coli* and the recombinant proteins were used to generate polyclonal antibodies in rabbits. In Western-Blot-analyses these antibodies not only detected the recombinant protein from the bacteria but also gave a signal on isolated basal apparatus. Three of the proteins could be localized to the basal apparatus in immunofluorescence-microscopy.

## 2 EINLEITUNG

### 2.1 *Chlamydomonas reinhardtii* als Modellorganismus

*Chlamydomonas reinhardtii* ist eine zweigeißelige, einzellige Grünalge mit einer Länge von ca. 10 µm. Sie besitzt einen großen becherförmigen Chloroplasten mit Pyrenoid, und ihre Zellwand besteht hauptsächlich aus Hydroxyprolin-reichen Glykoproteinen (Harris, 2001). Aufgrund der folgenden Vorteile ist *C. reinhardtii* als Modellorganismus mittlerweile gut etabliert:

1. *C. reinhardtii* wächst leicht in Massenkulturen heran. Die Kulturen können sowohl photoautotroph als auch heterotroph (mit Acetat als Kohlenstoffquelle) angezogen werden.
2. Die vegetativen Zellen sind in der Regel haploid und kommen in zwei unterschiedlichen Paarungstypen vor (bezeichnet mit  $mt^+$  und  $mt^-$ ). Bei Stickstoffmangel entwickeln sich Gameten aus den vegetativen Zellen. Zwei Gameten unterschiedlichen Paarungstyps können zu einer Zygote verschmelzen, die anschließend unter Reduktionsteilung auskeimt. Alle vier Meioseprodukte können in einer Tetradenanalyse untersucht werden, was *C. reinhardtii* für genetische Untersuchungen interessant macht.
3. Es sind zahlreiche Mutanten bekannt, deren Analyse bei der Aufklärung von Stoffwechselwegen helfen kann. Besonders auf dem Gebiet der Photosynthese erwies sich *C. reinhardtii* als geeigneter Modellorganismus (Levine, 1960; de Vitry und Vallon, 1999; Cahoon und Timko, 2000).
4. Das Genom ist sequenziert und über das „Joint Genome Institute“ (JGI) im Internet frei verfügbar (für Version 2.0: <http://genome.jgi-psf.org/chlre2/chlre2.home.html>). Die Größe des Genoms umfaßt ca.  $1 \times 10^8$  bp (Harris, 1989). Neben den genomischen Daten existieren auch EST-Datenbanken (z.B.: <http://www.kazusa.or.jp/en/plant/chlamy/EST/>).
5. Die gängigen molekularbiologischen Methoden sind bei *C. reinhardtii* anwendbar. Sowohl das Kerngenom (Kindle et al., 1989; Kindle, 1990) als auch das Chloroplasten- (Boynton et al., 1988) und Mitochondriengenom (Randolph-Anderson et al., 1993) sind transformierbar. Außerdem lassen sich Gene durch

„RNA silencing“ ausschalten (Übersichtsartikel: Schroda, 2006). Lokalisationsstudien mit *Chlamydomonas*-adaptierten GFP-Konstrukten sind ebenfalls möglich (Fuhrmann et al., 1999; Lehtreck et al., 2002; Ruiz-Binder et al., 2002).

Auch für Forschungen am Cytoskelett ist *C. reinhardtii* bestens geeignet. So wurde z.B. der „intraflagellar transport“ (IFT), der für den Aufbau und Erhalt der Geißeln verantwortlich ist, ursprünglich in dieser Alge entdeckt (Kozminski et al., 1993; Cole et al., 1998; Rosenbaum et al., 1999). Die Proteinzusammensetzung eukaryotischer Geißeln wird ebenfalls schon seit einiger Zeit mit Hilfe dieser Alge erforscht (Piperno et al., 1977; Luck 1984). Erleichtert werden diese Untersuchungen durch die Tatsache, dass sich die Geißeln von *C. reinhardtii* leicht durch pH-Schock und anschließende Zentrifugation von den Zellkörpern trennen lassen und man somit hochreine Geißelpräparationen erhalten kann. Eine weitere Auftrennung isolierter Geißeln in Membran- und Axonemenfraktion ist mit Hilfe nichtionischer Detergenzien möglich (Witman et al., 1972).

Die Veröffentlichung des Geißelproteoms (Pazour et al., 2005) zeigte, dass *C. reinhardtii* auch als Modellorganismus für die Erforschung menschlicher Krankheiten nützlich sein kann. So wurden z.B. Homologe für Polycystin und Fibrocystin gefunden, die bei bestimmten Formen von „polycystic kidney disease“ (PKD) mutiert sind (Pazour, 2004). Des Weiteren fanden sich Homologe für Hydin und Napa, die – wenn sie mutiert sind – einen Wasserkopf (Hydrocephalus) bei Mäusen hervorrufen (Davy und Robinson, 2003; Chae et al., 2004; Hong et al., 2004). Darüber hinaus wurden mehrere Homologe für Proteine identifiziert, die für männliche Sterilität bei Mäusen verantwortlich gemacht werden.

## 2.2 Centrosomen und Centriolen

Schon vor über 100 Jahren wurden Centrosomen von Theodor Boveri betrachtet und intensiv studiert (Boveri, 1901). Benannt wurden diese etwa 1 µm großen Strukturen aufgrund ihrer zentralen Lage innerhalb von Interphase-Zellen. Sie organisieren die räumliche Anordnung der Mikrotubuli nicht nur während der Interphase, sondern auch während der Mitose und können daher auch als wichtigstes mikrotubuliorganisierendes Zentrum (MTOC) der Zelle bezeichnet werden (Kellog et al., 1994). Der Centrosomenzyklus ist strikt mit dem Zellzyklus koordiniert (Doxsey, 2001). Vor der

Mitose verdoppeln sich die Centrosomen, und die beiden Tochtercentrosomen wandern zu entgegengesetzten Polen. Dort sorgen sie für die Ausbildung der bipolaren Mitosespindel und schließlich für die korrekte Verteilung der Chromosomen während der Mitose. Kommt es zu Störungen innerhalb dieses Zyklus, so können Spindeln mit mehreren bzw. mit nur einem Pol entstehen (Doxsey, 1998). Bei monopolaren Spindeln ist eine korrekte Verteilung der Chromosomen nicht mehr gewährleistet, was zu einem Stop der Zellteilung führen kann. Als Folge von multipolaren Spindeln können ganze Chromosomen „verloren“ gehen, weil diese evtl. auf mehr als eine Tochterzelle verteilt werden. Darüber hinaus ist es denkbar, dass es durch die aus mehreren Richtungen auf das Chromosom einwirkenden Kräfte zu Chromosomenbrüchen kommt. Durch all diese Szenarien würden Tochterzellen mit unterschiedlichen Chromosomenzahlen entstehen, was letztendlich zu genetischer Instabilität führt (Doxsey, 1998; Marshall, 2001). Abnormale Centrosomen, die Aneuploidie und genetische Instabilität hervorrufen können, wurden in vielen Krebszellen beobachtet (Übersichtsartikel: Salisbury et al., 1999).

Trotz ihrer konservierten Funktion (der Nukleation von Mikrotubuli) zeigen Centrosomen aus unterschiedlichen Organismen große Unterschiede bezüglich ihrer Morphologie. Acentrioläre Centrosomen findet man beim Schleimpilz *Dictyostelium discoideum* (den sogenannten kernassoziierten Körper oder „nucleus-associated body“; Kalt und Schliwa, 1993) und auch bei *Saccharomyces cerevisiae* (Spindelpolkkörper oder „spindle pole body“; Winey und Byers, 1992). Der Spindelpolkkörper (SPB) der Hefe ist eine mehrschichtige Struktur, die in die Kernmembran eingebettet ist (Byers et al., 1978).

Bei pflanzlichen Zellen gibt es kein klar strukturiertes Centrosom oder MTOC (Lambert, 1993). Viel eher scheint es sich um ein „flexibles Centrosom“ (Mazia, 1987) zu handeln, das seine Struktur während des Zellzyklus verändert. Außerdem wurde gezeigt, dass die Kernoberfläche das aktivste MTOC der Pflanze ist (Lambert, 1993).

Bei der Mehrzahl der tierischen Organismen besteht das Centrosom aus einem Centriolenpaar, das in pericentrioläres Material (PCM) eingebettet ist. Das PCM ist eine dynamische Region, die röhrenartig rund um die Centriolen strukturiert ist. Es wird vermutet, dass das PCM eine gewisse Polarität aufweist und dass die Stabilität der an unterschiedlichen Regionen des PCM gebildeten Mikrotubuli mit dem Zellzyklus variiert (Ou et al., 2004). Die Organisation des PCM wird durch das Vorhandensein der Centriolen beeinflusst. Werden die Centriolen z.B. experimentell entfernt, so löst sich das PCM – und mit ihm das Centrosom – auf (Bobinnec et al., 1998). Die meisten Mikrotubuli der

Interphase und des Spindelapparates werden nicht an den Centriolen, sondern im PCM nukleiert (Gould und Borisy, 1977). Hierbei spielt  $\gamma$ -Tubulin, das ursprünglich in dem filamentösen Pilz *Aspergillus nidulans* entdeckt wurde (Oakley und Oakley, 1989), eine wichtige Rolle. In *Drosophila*-Centrosomen ist  $\gamma$ -Tubulin in ringähnlichen Strukturen lokalisiert, die Kontakt zu Mikrotubulienden haben (Moritz et al., 1995 a,b). In Extrakten von *Xenopus*-Eiern formt  $\gamma$ -Tubulin – zusammen mit Pericentrin – einen großen Proteinkomplex, der mit seinem netzartigen Gitter die Basis für die Nukleation der Mikrotubuli bilden könnte (Dictenberg et al., 1998).

Centriolen sind zylindrische, polare Strukturen, die aus neun ringförmig angeordneten Mikrotubulitriplets aufgebaut sind. Das distale Ende ist durch die Plusenden der Mikrotubuli gekennzeichnet, wohingegen das proximale Ende eine wagenradförmige Struktur, das sogenannte „cartwheel“, enthält (Marshall, 2001). Entlang einer der beiden Centriolen finden sich besondere Strukturen. Dazu gehören die distalen Anhänge, die an alle neun Mikrotubulitriplets assoziiert sind (Paintrand et al., 1992) und die sogenannten Satelliten, die über keilförmige, filamentöse Strukturen mit dem Centriol verbunden sind. In Interphasezellen sind die meisten Mikrotubuli mit ihren Minusenden in diesen Satelliten eingebettet (Vorobjev und Chentsov, 1982).

Bei tierischen Zellen ist eines der beiden Centriolen am distalen Ende gelegentlich mit einer unbeweglichen, primären Geißel (9+0-Axonema) assoziiert. Dieses Centriol wird dann als reif oder ausgewachsen bezeichnet und das andere Centriol als unreif (Rieder und Borisy, 1982). Vor der Mitose wird in der Nähe des proximalen Endes beider Centriolen je ein neues Centriol (Procentriol) gebildet und das unreife Centriol wird in ein reifes umgewandelt (Lange und Gull, 1995). Die Verteilung der Centriolen während der Mitose erfolgt dann semikonservativ, d.h. jede Tochterzelle erhält ein altes und ein junges Centriol (Kochanski und Borisy, 1990). Mittlerweile ist die Abfolge der Schritte, die bei der Bildung der Tochtercentriolen und der anschließenden Zellteilung eine wichtige Rolle spielen, näher untersucht worden. Auch einige der dabei beteiligten Proteine sind inzwischen identifiziert worden (zusammenfassend: Marshall, 2001; Beisson und Wright, 2003). Der Aufbau neuer Centriolen beginnt, wenn die Zellen in die S-Phase kommen und scheint die Aktivität bestimmter Kinasen zu benötigen. Ist z.B. in *C. elegans* die mit dem Centrosom assoziierte Kinase ZYG-1 mutiert, so können die Centriolen nicht mehr verdoppelt werden (O’Connell et al., 2001). Als erste sichtbare Struktur des neuen

Centriols ist in *Paramecium* die sogenannte „generative Scheibe“ („generative disc“) beschrieben worden (Dippell, 1968). Als nächstes wird ein Ring aus 9 einzelnen A-Mikrotubuli angelegt. Durch die Addition der B- und schließlich C-Mikrotubuli entsteht dann die typische Struktur mit den 9 ringförmig angeordneten Mikrotubulitriplets, die im nächsten Schritt verlängert wird (Marshall, 2001). Vor der Mitose kommt es zur Trennung der beiden Centriolenpaare, was durch die Phosphorylierung von Centrin ausgelöst zu werden scheint (Lutz et al., 2001). Nach der Mitose lösen sich die jungen Centriolen von den alten. An diesem Prozess ist vermutlich Ubiquitin-abhängige Proteolyse beteiligt (Freed et al., 1999). Schließlich besteht in der G1-Phase die Möglichkeit, dass die Centriolen zu geißeltragenden Basalkörpern umgewandelt werden. Hierzu muss die sogenannte Übergangsregion angelegt werden (s.u.).

Centriolen können jedoch nicht nur in der Nähe bereits existierender Centriolen gebildet werden (s.o.), sondern es wurde auch eine de novo-Synthese beschrieben. Diese de novo-Synthese findet man bei Protisten (Fulton und Dingle, 1971; Grimes, 1973), unbefruchteten Seeigelleiern (Miki-Noumura, 1977; Kallenbach, 1985), niederen Pflanzen (Mizukami und Gall, 1966) und bei der Maus (Szollosi et al., 1972). Auch im Lebenszyklus von *C. reinhardtii* gibt es Stadien, wo es zu einer Neubildung von Centriolen kommt. In Zygoten lösen sich die Basalkörper und assoziierten Strukturen vollständig auf. Erst bei der Keimung der Zygosporangie, nachdem die Meiose begonnen hat, treten diese Strukturen wieder auf (Cavalier-Smith, 1974). Die genauen Mechanismen der de novo-Synthese sind bisher ungeklärt. Es wurde allerdings gezeigt, dass diese Synthese während der S-Phase des Zellzyklus stattfindet (Marshall et al., 2001). Die genauere Untersuchung von bestimmten *C. reinhardtii* Mutanten könnte bei der Aufklärung dieser Frage von Nutzen sein.

### **2.3 Der Basalapparat von *Chlamydomonas reinhardtii***

Der Basalapparat von *C. reinhardtii* besteht aus den beiden geißeltragenden Basalkörpern sowie aus 2 Probasalkörpern und einer ganzen Reihe assoziierter Mikrotubuli und Fibrillen (s. Abb. 1). Der ultrastrukturelle Aufbau der Basalkörper stimmt weitgehend mit dem der Centriolen tierischer Centrosomen überein (Burgos und Fawcett, 1956). Auch funktional übernehmen die Basalkörper die Rolle der Centriolen. Vor dem Eintritt in die Mitose resorbiert *C. reinhardtii* die beiden Geißeln (Johnson und Porter, 1968; Cavalier-Smith, 1974), und die Basalkörper werden an die Spindelpole verlagert (Gaffal, 1988; Marshall und Rosenbaum, 2000).