MATURARBEIT 2017, GYMNASIUM LIESTAL

EINFLUSS DER PLK4-KONZENTRATION AUF DIE ZENTROSOMENDUPLIKATION

Dominique Luder, Klasse 4Ba



betreut von PETER SCHOCHER Für dich, Papa, der du ewig mein Vorbild und grösste Inspiration sein wirst.

Inhaltsverzeichnis

1	Zusa	ammenfassung	3			
2	Einle	eitung	4			
3	Theo 3.1 3.2 3.3 3.4	Dretischer Teil Mikrotubuli als Zytoskelettfilament Struktur und Aufbau des Zentrosoms Funktion des Zentrosoms 3.3.1 Organisation des Mikrotubulinetzwerkes (MTOC) 3.3.2 Ausbildung von Flagellen und Zilien Zentrosomenzyklus	5 6 7 9 10			
	3.5	 3.4.1 Zentriolenduplikation Zentrosomale Defekte 3.5.1 Zentriolenamplifikation durch PLK4 Überexpression 	12 14 15			
	3.6	Auswirkungen zentrosomaler Defekte3.6.1Krebs3.6.2Weitere Krankheiten	17 19 20			
4	Prak 4.1	 Attischer Teil Material und Methoden 4.1.1 Die Methoden Western Blot und Massenspektrometrie 4.1.2 Titration von PLK4 zur Bestimmung der Toleranzgrenze 4.1.3 Western Blot zur Bestimmung der myc-PLK4 Menge 4.1.4 Zusatzexperiment: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme mitotischer Spindeln 	21 21 22 29 37			
	4.2 4.3 4.4	Resultate	42 42 45 46 47 49 51			
5	Disk	ussion	56			
6	Schl	lusswort	58			
Lit	-iteraturverzeichnis					
An	hang	J	69			

1 Zusammenfassung

In meiner Maturarbeit beschäftigte ich mich mit der Frage, wie sich unterschiedliche Konzentrationen des Proteins PLK4 auf die Zentrosomenanzahl menschlicher Zellen in Kultur auswirken.

Die verwendeten Zellen wiesen ein integriertes Plasmid auf, bei welchem mittels Doxycyclinzugabe myc-PLK4 Expression induziert werden konnte. Um die Auswirkungen unterschiedlicher PLK4 Konzentrationen zu untersuchen, wurden den Zellkulturen 6 unterschiedliche Doxycyclinkonzentrationen zugegeben (0, 0.05, 0.1, 0.5, 1, 10 ng/mL). Die Zellen wurden anschliessend fluoreszenzmikroskopisch, massenspektrometrisch und mittels Western Blot analysiert.

Die Ergebnisse bestätigen, dass eine erhöhte PLK4 Konzentration zu einer typischen Flower Amplifikation der Zentrosomen führt. Dabei führte eine um 880% erhöhte PLK4 Konzentration (0.5 ng/mL Doxycyclin) nicht zu einer vollständig ausgeprägten Zentriolenamplifikation, denn ca. 10% der Zellen begannen erst ab einer höheren PLK4 Konzentration zu amplifizieren (1, 10 ng/mL Doxycyclin). Die Konditionen, denen weniger Doxycyclin zugegeben wurde (0, 0.05, 0.1 ng/mL Doxycyclin), exprimierten die Zellen entweder kein myc-PLK4 oder die Expression war nicht konstant. Dies legt nahe, dass eine gewisse Doxycyclinkonzentration notwendig ist, um den Promotor zu aktivieren und die myc-PLK4 Expression zu starten.

Zusammengefasst kann gesagt werden, dass eine um 880% oder mehr erhöhte PLK4 Konzentration zu einer grossflächigen Amplifikation führt. Es kann jedoch keine Aussage über die kritische Konzentration gemacht werden, ab welcher es zu einer grossflächigen Zentriolenamplifikation kommt. Bis zur Überschusskonzentration von 980% kann PLK4 zumindest von einem Teil der Zellen toleriert werden und führt nicht zur Amplifikation in diesen Zellen. Dies bestätigt, dass die Zentriolenduplikation zur Prävention einer Amplifikation stark reguliert ist [Hinchcliffe et Sluder, 2001].

2 Einleitung

In Brust-, Prostata-, Dickdarm- und Pankreaskrebs als Beispiele, wird eine erhöhte Anzahl Zentrosomen in einem Grossteil der Zellen beobachtet. Daher stellt man sich in der Krebsforschung die Frage, ob eine Zentriolenamplifikation Ursache oder Konsequenz von Krebs ist [Nigg, 2002]. Bereits 1914 postulierte Theodor Boveri, dass zentrosomale und chromosomale Anomalien verknüpft sind und zu Tumorgenesis führen [Boveri, 1914]. Seither versucht man diese These zu bestätigen oder zu widerlegen. Die Forschungsergebnisse der letzten Jahre in Fliegen und Mäusen sprechen dabei für Boveris Theorie [Levine et al., 2017] [Basto et al., 2008] [Sabino et al., 2015] [Castellanos et al., 2008], aber nicht nur in Bezug auf Krebs konnten Zentrosomen in Verbindung mit der menschlichen Gesundheit gebracht werden, sondern auch im Bereich anderer Krankheiten wie Mikrozephalie, Ziliopathien und Kleinwuchs [Arquint, 2014]. Ziel aktueller Forschung ist ganz grundsätzlich das Erlangen des molekularbiologischen Verständnisses, wie Zentriolenamplifikation Krebs induzieren kann. Die übergeordnete Thematik aktueller Studien am Biozentrum in Basel ist das Verständnis der Wechselwirkungen zwischen duplikationsbeteiligten Proteinen und deren Einfluss auf den Duplikationszyklus des Zentrosoms. Meine Experimente wurden parallel zu diesen Studien durchgeführt und die Ergebnisse fliessen daher auch in diesen Bereich ein. Konkret lautet die Leitfrage meiner Arbeit: "Wie wirken sich unterschiedliche Konzentrationen des Enzyms myc-PLK4 auf die Zentrosomenduplikation einer U2OS-TREx Zellkultur aus?"

3 Theoretischer Teil

3.1 Mikrotubuli als Zytoskelettfilament

Das Zytoskelett einer eukaryotischen Zelle besteht aus Aktinfilamenten, intermediären Filamenten und Mikrotubuli [Becker et al., 2012, S. 34]. Aktinfilamente sind dabei an Bewegungsvorgängen beteiligt. Intermediäre Filamente verbinden Aktinfilamente und Mikrotubuli und tragen dadurch wesentlich zur Stabilität der Zelle bei [Schmidt et Thews, 1997, S.4] [Becker et al., 2012, S. 34]. Mikrotubuli gelten als hochdynamische Filamente, welche ebenso zur Stabilität der Zelle beitragen und zudem als Gleise für den Transport von Vesikeln und Zellorganellen dienen [Becker et al., 2012, S. 34] [Alberts et al., 1994, S. 803 ff.]. Des Weiteren werden Zilien, Flagellen, Zentriolen und die mitotische Spindel aus Mikrotubuli ausgebildet [Alberts et al., 1994, S. 803 ff.].



Abbildung 1: Aufbau eines Mikrotubulus aus $\alpha\text{-}$ und $\beta\text{-}$ Tubulin

Mikrotubuli sind aus dem Grundbaustein Tubulin aufgebaut. Insgesamt 13 Protofilamente, bestehend aus α - und β -Tubulin, lagern sich zu einer Röhre mit einem Durchmesser von 25nm aneinander [1, Chemgapedia].

Jeder Mikrotubulus weist ein positives und ein negatives Ende auf. Das Positive gilt dabei als das dynamische Ende, an welchem schnell Tubulineinheiten aufgebaut oder abgebaut werden können. Am Negativen werden die Tubulineinheiten langsam wieder abgebaut. Um einen Abbau zu verhindern ist das negative Ende im perizentriolären Material (kurz PCM=**p**eri**c**entriolar **m**aterial) oder an den subdistalen Anhängen des Zentrosoms stabilisiert [Alberts et al., 1994, S. 803 ff.] (*s. Kapitel 3.2 Struk*-

tur und Aufbau des Zentrosoms). Das positive Ende läuft ins Zytoplasma [Arquint, 2014]. In einer sternförmigen Anordnung erstrecken sich so Mikrotubuli vom Zentrosom aus über das gesamte Zytoplasma (*s. Abb. 4 Interphase MTOC*).

Das Zentrosom, welches in tierischen Zellen Organisationszentrum des Mikrotubuliapparates ist, wird fortan der Mittelpunkt dieser Arbeit sein.

3.2 Struktur und Aufbau des Zentrosoms



Abbildung 2: Schematische Darstellung eines Zentrosoms

Die Organisationszentren des Mikrotubulinetzwerkes (*s. Kapitel 3.3.1 Organisation des Mikrotubulinetzwerkes (MTOC)*) tierischer und pflanzlicher Zellen unterscheiden sich [Jan, 1997]. Ich werde mich in dieser Arbeit einzig mit dem MTOC tierischer Zellen, dem Zentrosom, befassen.

Das Zentrosom, meist nahe dem Zellkern lokalisiert [Alberts et al., 1994, S. 803 ff.], ist ein kleines Zellorganell (ca. 1 μ m Durchmesser) das sich hauptsächlich aus Mikrotubuli, aber auch aus verschiedensten anderen Proteinen zusammensetzt. Es be-

steht aus zwei Zentriolen, welche über Fasern miteinander verbunden sind (*s. Abb. 2, "in-terconnecting fibers"*) [Nigg, 2002] [Arquint, 2014]. Ein solches Zentriol ist etwa 500nm lang und 250-300nm breit [Arquint, 2014]. Die dem Zentriol zugrunde liegende Struktur gleicht der eines Wagenrades und wird deshalb auch *cartwheel* genannt. An jeder der 9 Speichen lagert sich ein Mikrotubuli Triplet an. Dies führt zu der typischen symmetrischen 9-eckigen Form jedes Zentriols [Guderian, 2010].



Abbildung 3: 3D Darstellung des Cartwheels aus Sicht des proximalen Endes des Zentrosoms. Skala entspricht 20nm.

Die Zentriolen umgibt das perizentrioläre Material, welches aus einer Vielzahl von unterschiedlichen Proteinen aufgebaut ist [Nigg, 2002]. Die beiden Zentriolen unterscheiden sich dadurch, dass das Ältere der beiden im Prozess der Zentrosomenreifung Proteine am distalen Ende erlangt (*s. Abb. 2, "distal, subdistal appendages"*) [Nigg, 2002]. Die distalen Anhänge dienen zur Andockung an der Zellmembran um Zilien und Flagellen auszubilden. Die subdistalen Anhänge sind essentiell zur Ausbildung des Mikrotubulinetzwerkes [Arquint, 2014].

3.3 Funktion des Zentrosoms

3.3.1 Organisation des Mikrotubulinetzwerkes (MTOC)

Als Organisationszentrum des Mikrotubulinetzwerkes (MTOC: **m**icro **t**ubule **o**rganizing **c**enter) einer tierischen Zelle übernimmt das Zentrosom viele Funktionen. Der Grossteil der Mikrotubuli einer Zelle ist im PCM oder am Zentrosom selbst verankert. Die Mikrotubuli werden entweder direkt am Zentriol nukleiert und über die subdistalen Anhänge verankert oder gehen vom PCM aus [Arquint, 2014].

Damit tragen Zentrosomen zu vielen Zellfunktionen wie Motilität und Stabilität, intrazellulärer Transport, Zellpolarität, Informationsübermittlung innerhalb der Zelle und der Cytokinese bei [Guderian, 2010] [Nigg, 2002]. (*s. Abb. 4: Interphase MTOC*)

Unter anderem sind es die Zentrosomen, die während der Mitose den Spindelapparat und die Spindelastern ausbilden [Nigg, 2002]. Daher nimmt auch die Dichte der von den Zentrosomen ausgehenden Mikrotubuli während der M- Phase des Zellzyklus zu (*s. Abb. 4 Mitotischer MTOC*). Während des Überganges von der G2- zur M-Phase des Zellzyklus trennen sich die beiden Zentrosomen (*s. Kapitel 3.4 Zentrosomenzyklus*), welche noch über Proteinfasern miteinander verbunden waren, voneinander und begeben sich jeweils an einen Pol der Zelle [Arquint, 2014]. Sie verankern sich über Spindelastern (*sog. microtubule aster*) an der Membran der Zelle, was die Positionierung und bipolare Ausrichtung der Spindel unterstützt [Nigg, 2002]. Von dort aus bilden die Zentrosomen nun den Spindelapparat aus und es kommt zur bipolaren Zellteilung.

Interphase MTOC

alpha tubulin + CP110



10X Zoom





Mitotischer MTOC

alpha tubulin + CP110



Abbildung 4: U2OS Zellen wurden nach 72h fixiert und mit Antikörpern gegen alpha-Tubulin und CP110 inkubiert. Alpha-Tubulin (Protein der Mikrotubuli) und CP110 (Protein welches sich am distalen Ende des Zentriols anlagert -> ein Punkt entspricht einer Zentriole) gezeigt in grau. Die Zellen wurden mittels Immunfluoreszenzmikroskopie aufgenommen. Die Skala entspricht 10μ M, im Zoom 1 μ M.

Oben: MTOC in der Interphase. Unten: MTOC in der Mitose(Metaphase). Man beachte die höhere Mikrotubulidichte um das mitotische MTOC

3.3.2 Ausbildung von Flagellen und Zilien

Eine weitere wichtige Funktion der Zentrosomen in tierischen Zellen ist das Ausbilden von Flagellen und Zilien. Flagellen dienen den eukaryotischen Zellen zur Fortbewegung. Sie unterscheiden sich von den Flagellen in prokaryotischen Zellen, welche nicht aus Mikrotubuli aufgebaut sind [2, Spektrum]. Zilien, auch Flimmerhaare genannt, kommen ausschliesslich bei Eukaryoten vor und dienen der Erzeugung von Flüssigkeitsströmen entlang von Zellverbänden oder zur Fortbewegung der Zelle in flüssiger Umgebung [3, Spektrum]. Zontrosomen sind zur Ausbildung dieser Strukturen essentiell [Pedersen et Rosenbaum, 2008]. Das älteste Zentriol kann mittels der distalen Anhänge an der Plasmamembran andocken und dient dort als Grundlage zur Ausbildung von Zilien und Flagellen [Arquint, 2014].



Abbildung 5: Schematische Darstellung einer eukaryotischen Zelle. Eine Zilie wird durch das ältere Zentriol ausgebildet.

3.4 Zentrosomenzyklus



Abbildung 6: Der Zentrosomenzyklus parallel zu den Phasen des Zellzyklus

Der Zentrosomenzyklus beginnt, analog zum Zellzyklus, mit der Teilung der Mutterzelle am Ende der M-Phase. Je ein Zentrosom befindet sich nun in den beiden neu gebildeten Tochterzellen. Die beiden orthogonal zusammenhängenden Zentriolen trennen sich in der G1 Phase, bleiben aber über Proteinfasern miteinander verbunden. Nur das ältere dieser Zentriolen weist Proteinanhänge am distalen Ende auf. In der S Phase des Zellzykluses findet die Zentriolenduplikation statt. Die Zentriolen, welche sich in G1 voneinander lösten, werden nun Mutterzentriolen genannt und dienen als Ansatzpunkt für die Tochterzentriolen. Jeweils am proximalen Ende bildet sich eine Prozentriole. Die Zentriolenverlängerung und die Zentrosomenreifung finden in der G2 Phase statt. Während der Zentrosomenreifung erlangt auch die jüngere der Mutterzentriolen Proteinanhänge am distalen Ende (s. Abb. 7). Zu dieser Zeit erhöht sich die MTOC Aktivität, da von den Zentrosomen zur Ausbildung der Spindel in der anschliessenden M Phase mehr Mikrotubuli nukleiert werden (s. Abb. 4, MTOC Interphase/ Mitose im Vergleich). Mit dem Übertritt von der G2 Phase in die Mitose lösen sich die zwei nun vollkommen ausgereiften Zentrosomen voneinander und bilden, ausgehend von den zwei Polen der Zelle, den Spindelapparat aus. Nach der Mitose weist jede Tochterzelle erneut ein vollständiges Zentrosom aus je einer Mutter- und Tochterzentriole auf [Nigg, 2002].



Abbildung 7: U2OS Zellen wurden nach 72h fixiert und anschliessend mit Antikörpern gegen alpha-Tubulin (grün), CP110 (rot) und Cep164 (blau) inkubiert. Alpha-Tubulin: Protein der Mikrotubuli, Cep164: Protein der distalen Anhänge, CP110: Protein welches sich am distalen Ende des Zentriols anlagert -> ein Punkt entspricht einer Zentriole. Die Zellen wurden mittels Immunfluoreszenzmikroskopie aufgenommen. Die Skala entspricht 10 μ M, im Zoom 1 μ M.

Oben: G1 Phase, nach Zytokinese, erkennbar dass nur Mutterzentriole Anhänge aufweist. **Mitte:** G2 Phase, Zentriolen haben sich bereits dupliziert, wobei die jüngere Mutterzentriole noch keine Anhänge hat. **Unten:** Mitose, Zentrosomen haben sich getrennt, beide Mutterzentriolen weisen Anhänge am distalen Ende auf

3.4.1 Zentriolenduplikation

Die Zentriolenduplikation und die daran beteiligten Proteine wurden im Fadenwurm C. elegans, in der Drosophila Fliege und im Menschen untersucht. Dabei zeigte sich, dass sowohl der Prozess der Zentriolenduplikation als auch die wenigen beteiligten Proteine, genannt Duplikationsfaktoren, über die Evolution konserviert wurden. Die Duplikation im Menschen ist zwar wesentlich komplexer als im Fadenwurm, die wichtigsten Proteine wurden jedoch als Analoge erhalten [Arquint, 2014]. Die Zentriolenduplikation ist durch den Zellzyklus sehr stark reguliert. Dadurch wird sichergestellt, dass nur eine Prozentriole per Mutterzentriole gebildet wird und die Zentriolen keine strukturellen Defekte aufweisen [Nigg, 2002] [Hinchcliffe et Sluder, 2001].

In C.elegans wurden fünf Duplikationsfaktoren identifiziert. Diese fünf Proteine wurden in den meisten menschlichen Zellen konserviert als die funktionellen Analoge Cep192, PLK4, STIL, SAS-6 und CPAP [Arquint, 2014].

Im Folgenden werde ich die Funktion dieser fünf Duplikationsfaktoren kurz erläutern, was in Abb. 8 visualisiert wurde. Es ist zu erwähnen, dass in tierischen Zellen noch weitere Proteine an der Zentriolenduplikation beteiligt sind und auch die fünf Erwähnten stets unter Wechselwirkungen mit anderen stehen.

Cep192 beteiligt sich an der Rekrutierung von PLK4 ans Zentrosom [Arquint, 2014]. Die Kinase PLK4 lagert sich nach der Aktivierung ringförmig am proximalen Ende des Mutterzentriols an. Man nimmt an, dass wiederum STIL von PLK4 zum Zentriol rekrutiert wird. Dort wird STIL von der Kinase PLK4 phosphoryliert und an einem Punkt gebunden. Einzig an diesem Punkt, an dem STIL gebunden wurde, bleibt PLK4 am Zentrosom erhalten [Arquint et Nigg, 2016]. Dies ist der spätere Ansatzpunkt der Tochterzentriole. SAS-6 bindet an STIL und bildet das Cartwheel der Prozentriole [Arquint et al., 2012]. Daran lagern sich Mikrotubulitriplets an, deren Protofilamente aus α - und β -Tubulin bestehen. Der wichtigste Duplikationsfaktor für die Verlängerung der Prozentriole ist CPAP [Arquint, 2014].

Wichtigste Duplikationsfaktoren

Seitenansicht





3.5 Zentrosomale Defekte

Gibt es Fehler oder Ungleichgewichte in der Zentrosomenduplikation kommt es zu zentrosomalen Defekten. Dabei unterscheidet man zwischen strukturellen und numerischen Defekten.

Strukturelle Defekte können in zwei Gruppen unterteilt werden: Defekte am Zentriol und Abweichungen der Menge an PCM. Wie strukturelle Defekte *in vivo* zustandekommen ist noch nicht vollends geklärt. Ein Ansatz ist, dass es durch Änderungen in der Expression von strukturbeeinflussenden Genen, zum Beispiel durch Mutationen, zu Defekten kommen könnte [Godinho et Pellman, 2014]. Dass die Über- oder Unterexpression zentrosomaler Proteine zu Strukturveränderungen, wie Beispielsweise der Verlängerung der Zentriolen, führt, wurde durch Modellsysteme belegt [Kirkham et al., 2013] [Kohlmaier et al., 2009].

Als numerischer Defekt werden Abweichungen in der Zentrosomenzahl der Zelle oder der Zentriolenzahl eines einzelnen Zentrosoms betrachtet. Diese können durch eine Vielzahl an Ereignissen entstehen. Dazu gehören Über- oder Unterexpression von Duplikationsfaktoren, Zytokinesefehler, de novo Formation von Zentrosomen und sonstige Fehler während der Mitose [Godinho et Pellman, 2014].

Gibt es mehr Zentriolen als vier bzw. mehr Zentrosomen als zwei in einer Zelle, spricht man von einer Amplifikation. Die Amplifikation ist der Defekt, der *in vivo* am häufigsten zu beobachten ist. Somit ist dies auch der Defekt, dessen Ursachen und Auswirkungen am Besten erforscht sind. Die Ursache ist häufig eine Überexpression von Duplikationsfaktoren, was dann wiederum die Zentriolenduplikation beeinflusst und dazu führen kann, dass sich mehrere Tochterzentriolen um die Mutterzentriole bilden [Kleylein-Sohn, 2007].

3.5.1 Zentriolenamplifikation durch PLK4 Überexpression

Experimentelle Daten weisen darauf hin, dass sich die Faktoren PLK4, STIL und SAS-6 in ihrer Menge und Aktivität gegenseitig beeinflussen. Veränderungen in der Expression eines dieser Faktoren führen zur Zentriolenamplifikation und beeinflussen die anderen Faktoren in ihrer Menge und Aktivität. Bei Überexpression ist eine typische "Flower" Struktur beobachtbar. Als Flower wird die zirkuläre Anordnung von Tochterzentriolen um die Mutterzentriole bezeichnet [Arquint et Nigg, 2016] [Arquint et al., 2012].

Bei der Zentriolenduplikation lagert sich PLK4 als erstes ringförmig am proximalen Ende der Mutterzentriole an. Es wird bis an jenem Punkt, an dem STIL gebunden wurde, wieder vom Zentriol abgebaut [Arquint et Nigg, 2016]. Wird PLK4 überexprimiert, so bindet auch STIL an mehreren Orten und PLK4 bleibt als Ring bestehen (*s. Abb. 9 und 11*). Dadurch, dass STIL nicht nur an einem Ort gebunden wurde, bilden sich auch mehrere Cartwheels. Dies führt zur Flower-ähnlichen Anordnung multipler Tochterzentriolen um die Mutterzentriole [Kleylein-Sohn, 2007] [Habedanck et al., 2005].

Normale Zentriolenanzahl

vor Zentriolenduplikation



nach Zentriolenduplikation



Nicht induzierte Zentriolenamplifikation



PLK4 induzierte Zentriolenamplifikation

Zentriolenansammlung nach PLK4 Überexpression

CP110 myc PLK4



Abbildung 9: U2OS-TREx Zellen wurden verwendet, in welchen myc-PLK4 Expression durch Doxycyclin induziert werden kann. Zwei Zellkonditionen, einer wurde nach 24h 10 ng/mL Doxycyclin zugegeben -> PLK4 Überexpression. Fixierung nach 48h und anschliessende Inkubation mit Antikörpern gegen CP110 (rot) und myc- PLK4 (grün). CP110: Protein welches sich am distalen Ende des Zentriols anlagert -> ein Punkt entspricht einer Zentriole, myc-PLK4: durch Induktion exprimiertes PLK4, welches mit einem myc-tag versehen ist. Die Zellen wurden mittels Immunfluoreszenzmikroskopie aufgenommen. Die Skala entspricht 1 μ M.

Oben: Normale Zentriolenanzahl vor der Duplikation, kein myc-Signal da kein Doxycyclin zugegeben wurde.

Mitte Oben: Nach Zentriolenduplikation, kein myc-Signal da kein Doxycyclin zugegeben wurde.

Mitte: Zentriolenamplifikation durch nicht bekannten Faktor, kein myc-Signal da kein Doxycyclin zugegeben wurde.

Mitte Unten: Induzierte Amplifikation, myc-Signal erkennbar.

Unten: "Flower" Ähnliche Anordnung der Tochterzentriolen um die Mutterzentriole, ringförmige Struktur von myc-PLK4 leicht erkennbar.

Multiple Tochterzentriolen pro Mutterzentriol ("Flower")



3.6 Auswirkungen zentrosomaler Defekte

Zentrosomale Defekte haben schwere Auswirkungen auf die betroffene Zelle. Das Zentrosom als Mikrotubulizentrum der Zelle dient für Motilität, Stabilität [Guderian, 2010], Polarität, Ausbildung von Cilien und Flagellen [Pedersen et Rosenbaum, 2008], Informationsübertragung innerhalb der Zelle und Ausbildung des Spindelapparates und der Spindelastern [Arquint, 2014]. Weisen die Zentrosomen Defekte auf, werden diese und allenfalls noch weitere Funktionen beeinträchtigt. Schon leichte Änderungen in der Expression eines duplikationsbeteiligten Gens können zu Defekten führen.

Weist die Zelle zu Beginn der Mitose weniger als zwei Zentrosomen auf, kann die Zellteilung abgebrochen werden und die Zelle begibt sich wieder in die Interphase. Allerdings ist sie dann Polyploid [Hinchcliffe et Sluder, 2001]. Die Zelle kann auch auf alternativem Wege ohne Zentrosomen eine Spindel formieren; zur Ausbildung der Spindelastern sind diese jedoch essentiell [Hinchcliffe et Sluder, 2001].

Die Zentriolenamplifikation, eine erhöhte Zahl an Zentriolen, ist der am häufigsten zu beobachtende Defekt *in vivo*. Der Spindelapparat einer mitotischen Zelle wird von ihren Zentrosomen ausgebildet [Nigg, 2002]. Weist die Zelle eine Amplifikation auf, kann es sein, dass sie während der Mitose nicht mehr bipolar sondern multipolar ist. Dazu reicht schon ein überzähliges Zentrosom welches auch Spindeln ausbildet. Das Erbgut als auch die physiologischen Bestandteile der Zelle werden ungleich segregiert und die Tochterzellen weisen eine Aneuploidie auf [Godinho et Pellman, 2014]. Diese sterben in den meisten Fällen ab. Es kann jedoch auch vorkommen, dass eine Mutation unerwartete Vorteile bietet für die Zelle und sie zu einer Krebszelle entartet [Godinho et Pellman, 2014].

Zellen haben aber auch Mechanismen, um mit einer Amplifikation umzugehen. Der wichtigste Mechanismus ist das Clustering. Mittels Clustering können überzählige Zentrosomen an einem Punkt gehäuft und so eine pseudobipolare Spindel ausgebildet werden. Trotz überzähliger Zentrosomenzahl weist die Zelle so während der Mitose nur zwei Pole auf. Die Fehlerrate einer pseudobipolaren Mitose ist jedoch erhöht [Arquint, 2014]. Überzählige Zentrosomen können auch deaktiviert oder verloren werden [Godinho et Pellman, 2014].

Bipolare Mitose (normale Zentriolenanzahl)

DAPI, CP110, alpha tubulin

CP110



Multipolare Mitose (Zentriolenamplifikation)



Pseudobipolare Mitose (Zentrosomen Clustering)



Abbildung 10: U2OS-TREx Zellen wurden verwendet, in welchen myc-PLK4 Expression durch Doxycyclin induziert werden kann. Zwei Zellkonditionen, einer wurde nach 24h 10 ng/mL Doxycyclin zugegeben -> PLK4 Überexpression. Fixierung nach 48h und anschliessende Inkubation mit Antikörpern gegen alpha-Tubulin (grün) und CP110 (rot). DNA gefärbt mit DAPI (blau). Alpha-Tubulin: Protein der Mikrotubuli, CP110: Protein welches sich am distalen Ende des Zentriols anlagert -> ein Punkt entspricht einer Zentriole. Die Zellen wurden mittels Immunfluoreszenzmikroskopie aufgenommen. Die Skala entspricht 10 µM, im Zoom 1 µM.

Oben: normale bipolare Spindelformation, je ein Zetrosom an den Polen. **Mitte:** multipolare Mitose, Spindel wird von mehr als 2 Zentrosomen ausgebildet und weist mehr als 2 Pole auf. **Unten:** pseudobipolare Mitose, Überzählige Zentriolen werden geclustert und es kommt trotz Amplifikation zu einer bipolaren Zellteilung.

3.6.1 Krebs

In Brust-, Prostata-, Dickdarm- und Pankreaskrebs als Beispiele, wird eine Zentriolenamplifikation in einem Grossteil der Zellen beobachtet. Daher stellt man sich in der Krebsforschung die Frage, ob eine Zentriolenamplifikation Ursache oder Konsequenz von Krebs ist [Nigg, 2002]. Als Ursache würde man es verstehen, wenn die durch Zentriolenamplifikation entstandene Aneuploidie (*s. Kapitel 3.6 Auswirkungen zentrosomaler Defekte*) Krebs hervorruft. Als Konsequenz, wenn es durch Mutationen im Genom der Zellen aufgrund von Krebs zu Zytokinese- oder sonstigen Fehlern kommt, welche eine Zentriolenamplifikation hervorrufen. Bereits 1914 postulierte Theodor Boveri, dass zentrosomale und chromosomale Anomalien verknüpft sind und zu Tumorgenesis führen [Boveri, 1914]. Seither versucht man diese These zu bestätigen oder zu widerlegen.

In vitro bietet eine Zentriolenamplifikation keinen grossen Vorteil für die Zelle und sie stirbt in den meisten Fällen nach der Teilung ab. *In vivo* muss die Amplifikation jedoch einen Vorteil darstellen, da sie in vielen invasiven Geweben beobachtet werden kann. In diesen Geweben können jedoch auch alternative Mechanismen zur Bildung einer pseudobipolaren Spindel, vor allem Clustering oder Inaktivierung überzähliger Zentrosomen, bei einem Grossteil der amplifizierten Zellen beobachtet werden [Nigg, 2002].

Anfangs 2017 wurde eine Reihe an Experimenten veröffentlicht, welche den Folgen von der aus PLK4 Überexpression resultierenden Zentriolenamplifikation *in vivo* nachging. Dabei konnte mittels eines Mäusemodells, in welchem PLK4 Überexpression induziert werden konnte, Boveris Aussage bestätigt werden.

Versuche mit diesen Mäusen bestätigten, dass chronische Zentriolenamplifikation zu gehäufter Aneuploidie in verschiedenen Geweben führt. In vielen Geweben wurde jedoch eine Amplifikation über einen längeren Zeitraum toleriert, mit Ausnahme der Haut. Die Überexpression führte innert kurzer Zeit zu Haarausfall bis zur kompletten Haarlosigkeit der Tiere. Die Überexpression im gesamten Organismus über einen langen Zeitraum führte in unterschiedlichen Geweben zu spontaner Tumorgenesis [Levine et al., 2017].

3.6.2 Weitere Krankheiten

Mutationen des Genoms im Bereich der Zilienbildung, welche einzig durch Zentrosomen ausgebildet werden können, werden unter dem Begriff Ziliopathien zusammengefasst und können zu unterschiedlichsten Krankheitssymptomen führen wie Zystenniere, Alström-Syndrom, Meckel-Syndrom etc. [4, Wikipedia].

Mutationen im Bereich zentrosomaler Proteine führen oft zu Kleinwuchs [Arquint, 2014]. Mikrozephalie ist eine weitere Erkrankung, welche auf Zentriolenamplifikation zurückzuführen ist. Dies wurde an Mäusen gezeigt, in welchen Zentriolenamplifikation im embryonalen Gehirn das Krankheitsbild hervorrief [Marthiens et al., 2013].

4 Praktischer Teil

4.1 Material und Methoden

4.1.1 Die Methoden Western Blot und Massenspektrometrie

Der Western Blot ist eine Methode, verschiedene Peptide aufzutrennen und anschliessend durch Reaktionen nachzuweisen. (*Ich werde einzig das für unsere Experimente verwendete Verfahren kurz erläutern.*)

Im ersten Schritt wird eine Gel-Elektrophorese durchgeführt. Bei dieser werden durch die Erzeugung eines elektrischen Feldes Peptidbruchstücke nach ihrem Molekülgewicht aufgetrennt. Beim anschliessenden Proteintransfer wird abermals ein elektrisches Feld erzeugt, durch welches die Peptide vom Gel auf eine Nitrocellulose Membran transferiert werden. Die Membran kann dann mit Primären und Sekundären Antikörpern behandelt werden, wobei der primäre an das zu detektierende Substrat bindet und der sekundäre an den primären Antikörper. Der Sekundäre kann dann durch eine Chemilumineszenzreaktion detektiert werden.

Bei der Massenspektrometrie werden Peptide in ein Magnetfeld geschossen und so die verschiedenen Peptide aufgetrennt. Je mehr Moleküle nach der Flugphase am selben Ort auftreffen, desto intensiver ist das detektierte Signal. Durch Integralrechnung kann die Fläche unter der sich aus den Messungen ergebenden Kurve berechnet werden. So kann man die relative Peptidkonzentration im Verhältnis zu einer 0-Kondition berechnen. (*Es ist zu erwähnen, dass weder die Experimente noch die Rechnungen von mir durchgeführt wurden. Da die massenspektrometrischen Messungen jedoch zusammenhängend mit den von mir durchgeführten Experimenten sind, wurden mir die Resultate freundlicherweise zur Verfügung gestellt.*)

4.1.2 Titration von PLK4 zur Bestimmung der Toleranzgrenze

Ziel des Experiments: Ziel des Experiments ist es, die Konzentration von PLK4 zu bestimmen, die zu einer Überduplikation von Zentrosomen in menschlichen Zellen führt. Dies wird dadurch erreicht, indem man die PLK4 Konzentration in einer stabilen Zelllinie (welche Doxycyclin-kontrollierte PLK4 Genexpression erlaubt) schrittweise erhöht (Titration), um die Toleranzgrenze ausfindig zu machen. Als nicht mehr tolerierbar gilt eine Konzentration, welche in einem Grossteil der Zellen zu einer Zentriolenüberduplikation führt.

Arbeitsschritte:

08.05.17: Zellen splitten 09.05.17: Induktion mit Doxycyclin, Zugabe von Thymidin 10.05.17: Methanolfixierung der Zellen 11.05.17: Immunfluoreszenzfärbung 13.05.17/18.05.17: Mikroskopieren

Benötigte Materialien

Zellen splitten, induzieren und arretieren

- stabile Zelllinie: U2OS TREX mit integriertem myc-PLK4 (Zelllinie auch B6 genannt)(myc-PLK4 ins Genom integriert mit einem Doxycyclin-induzierbaren Promotor vor codierender Sequenz. Endogene PLK4 Sequenz unverändert. Antibiotikaresistenzgen -> Aussortierung nicht transgener Zellen)
- Zell-Medium: DMEM (*Flüssigmedium der Zellen*) + Serum (PAA) (*Serum mit Wachs-tumsproteinen aus Kälberföten, die nicht mit Antibiotika wie Tetra- oder Doxycyclin behandelt wurden*) + Pen/Strep (*Penicillin/Streptomycin, zur Sterilhaltung der Zellkul-turen*)+ Antibiotika (G418/Hygromycin) (*Aussortierung von nicht transgenen Zellen*)
- Deckgläser
- 6-well Platten (*Platte mit 6 kleinen Petrischalen*)
- Zellzähler (Sceptor) (*Gerät zur Zählung der Zellen, so dass man die Zell-Konzentration bestimmen kann*)
- Doxycyclin
- Thymidin

Zellfixierung

- Eiskaltes Methanol 100%
- PBS (isotonische Kochsalzlösung)
- Blockierung: PBS + 2% BSA (Kochsalzlösung + Proteine)

Immunfluoreszenzfärbung

- Antikörper: anti-myc (mouse, gekoppelt mit Cy5, grün), anti-CP110 (rabbit, Alexa 555, rot), DAPI (DNA Färbung, blau).
- PBS + 2% BSA
- PBS
- Objektträger
- Befestigendes Medium (PPD) (Deckglas auf Objektträger kleben)
- Nagellack (Fixierung des Präparates)

Versuchsprotokoll

→Das ganze Experiment wurde zur Erhöhung der Aussagekraft 3x unabhängig durchgeführt.

Zellen splitten

- 15cm Platte mit Zellen aus Inkubator nehmen
- Medium entfernen, 1x mit PBS waschen (*entfernen des Mediums*), 3 mL Trypsin dazugeben (*lösen der Zellen von der Platte*)
- 10 min im Inkubator auf 37 ℃ inkubieren
- Deckgläser auf 6-Well Platten verteilen
- Zellen in 7 mL Medium aufnehmen (= 10 mL Totalvolumen)
- Zellzahl bestimmen: 20 µL Zellsupension in 280 µL PBS verdünnen (15x verdünnt), mit Sceptor Zellzahl messen.

Gemessener Wert: $2, 2x10^4$ Zellen/mL Gemessener Wert $x15 = 33x10^4$ Zellen/mL $\frac{3,3x10^5}{1,5x10^5} = 2, 2$ (*Verdünnungsfaktor*)

- Zellsuspension auf 1, 5x10⁵ Zellen/mL verdünnen (*siehe Verdünnungsfaktor*):
 10 mL Zellen + 12 mL Medium = 22 mL
- Zellen verteilen: 2 mL/Well = $3x10^5$ Zellen/Well $\rightarrow 12$ mL gesamt benötigt
- Zellen in Inkubator stellen, 24 h auf 37 °C und 5% CO₂ inkubieren

Zellinduktion

- Doxycyclin verdünnen (in Medium): Konzentration der Stocklösung: 50 mg/mL.
- Vorverdünnung (5 mL):
 D1: 0.1 mg/mL = 100 µg/mL (500x Verdünnung vo Stocklösung)
 →10 µL von der Stocklössung und 4990 µL Medium.
- Finale Verdünnung (10 mL):
 D2: 0.1 μg/mL = 100 ng/mL (500'000x Verdünnung von der Stocklösung, 1000x Verdünnung von Vorverdünnung D1).
 N10 μl von D1 und 0000 μl. Modium

 \rightarrow 10 μL von D1 und 9990 μL Medium.

Tabelle 1: 6-Well Platte mit Angaben zur Doxycyclin Konzentration und den zu pipettierenden Volumen:

A: 0 ng/mL	Β: 0.05 ng/mL	C: 0.1 ng/mL
-	1 μL D2	2 µL D2
D: 0.5 ng/mL	E: 1 ng/mL	F: 10 ng/mL
10 µL D2	20 μL D2	200 μL D2

Zellarretierung

Thymidin arretiert Zellen in S-Phase, weil hohe Thymidin Konzentrationen in der Zelle die DNA-Synthese inhibiert. Zellen bleiben deshalb in S-Phase arretiert solange Thymidin im Medium enthalten ist.

- Thymidin: 200 mM Konzentration der Stocklösung, Finale Konzentration: 2 mM (100X Verdünnung)
- 20 μ L in jedes Well verteilen (20 μ L auf 2 mL = 100x)
- Zellen 24h im Inkubator inkubieren



Abbildung 11: Arbeitsplatz zur sterilen Arbeit mit den Zellkulturen



Abbildung 12: Verwendete 6-Well Platte



Abbildung 13: Doxycyclin und Thymidin Stock



Abbildung 14: Induzierte und arretierte Zellkultur im Inkubator

Zellfixierung

- Zellmedium entfernen und eiskaltes Methanol dazugeben
- Zellen 10 min. auf -20 ℃ inkubieren
- Methanol entfernen, 2x mit PBS waschen
- 2 mL PBS+BSA dazugeben (*mit Proteinen, um alle Anheftungsstellen zu blockieren, so dass Antikörper nicht unspezifisch hängen bleiben*)
- Zellen über Nacht auf $4 \, ^{\circ}$ im Kühlschrank aufbewahren

Immunfluoreszenzfärbung

- Antikörper in PBS+BSA Lösung verdünnen (2 mL)
- \cdot anti-myc (mouse, gekoppelt mit Cy5, grün): 1:250 ightarrow8 μ L
- $\cdot\,$ anti-CP110 (rabbit, Alexa 555, rot): 1:1000 ${\rightarrow}$ 2 $\mu {\rm L}$
- $\cdot\,$ DAPI (DNA Färbung, blau): 1:1000 ${\rightarrow}$ 2 $\mu {\rm L}$
- Deckgläser mit Pinzette von der 6-Well Plate in Plastikbox (auf Parafilm) transferieren
- Antikörperlösung auf Deckgläser geben (ca. 250 μ L/Coverslip)
- 1.5 h Inkubieren
- Mit PBS waschen (3x), 5 min Inkubation während jedem Waschgang, Flüssigkeit mit Pumpe abziehen.
- Befestigen des Deckglases: einen Tropfen des befestigenden Mediums (PPD) auf den Glas-Objektträger geben und das Deckglas mit den Zellen nach unten darauf platzieren. Mit Nagellack versiegeln, trocknen

Mikroskopie

 Analyse der Pr\u00e4parate (Ausz\u00e4hlen der Zentriolen/Zellen) am Deltavision Fluoreszenzmikroskop.



Abbildung 15: Arbeitsplatz für nicht sterile Arbeit wie Zellfixierung und Immunfluoreszenzfärbung



Abbildung 16: 3 Experimente, nach der Zellfixierung



Abbildung 17: Inkubation mit Antikörperlösung



Abbildung 18: Zugedeckte Inkubation für 1.5h



Abbildung 19: Objektträger mit PPD

4.1.3 Western Blot zur Bestimmung der myc-PLK4 Menge

Ziel des Experiments: Ziel ist es, die Expression von myc-PLK4 in der B6 Zelllinie zu detektieren (parallel zu den massenspektrometrischen Messungen).

Arbeitsschritte:

- 13.05.17: Lyse der Proben
- 15.05.17: Laden und laufen lassen der Gele, blockieren und primäre Antikörperinkubation
- 17.05.17: Sekundäre Antikörperinkubation, Detektion der Chemilumineszenz

Benötigte Materialien

Lyse der Proben

- Lysis Buffer (1% Natriumdeoxycholat, 100 mM Ammoniumbicarbonat, 10 mM TCEP Reduktionsmittel)
- Vortexer
- Gerät zur Ultraschallbehandlung
- Herdplatte
- SDS Sample Buffer
- Zentrifuge

Laden und laufen lassen der Gele (*SDS-PAGE = Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese*)

- Vorrichtung zur Elektrophorese der Gele
- Gel mit 12 Taschen, 4-12% Bis-Tris (*Novex, Invitrogen*)
- MOPS Running Buffer
- Protein marker (precision plus protein standard, Biorad).

Transfer (Western Blotting)

- Nitrocellulose Membran
- Methanol
- Transfer Buffer

Blockieren

- Trockenmilchpulver

Primäre Antikörperinkubation

- Anti-myc (mouse, 1:1000)
- Anti-alphatubulin (mouse, 1:1000)
- PBS-Tween (*PBS* + 0.1% Tween-Detergenz)

Sekundäre Antikörperinkubation

- PBS-Tween
- Sekundärer Antikörper anti-mouse HRP (*Meerrettich-Peroxidase*)

Detektion der Chemilumineszenz

- Chemilumineszenz- Substrat (*Pieroe*)
- Gel Imaging Apparat (*Biorad*)

Versuchsprotokoll

→Das gesamte Experiment wurde zur Erhöhung der Aussagekraft 3x unabhängig durchgeführt.

Die Zellkulturen wurden bis und mit dem Schritt Zellinduktion analog zum Experiment "Titration von PLK4 zur Bestimmung der Toleranzgrenze"hergestellt (s. 4.1.2), wird hier nicht nochmals beschrieben.

Lyse der Proben

durchgeführt von Christian Arquint da auch benötigt für massenspektrometrische Experimente

- Zellpellet in 100 μ L Lysis Buffer aufnehmen und vortexen
- Ultraschallbehandlung
- Zelllysat 10min kochen bei 95°C (Zellen werden aufgebrochen, Proteine werden denaturiert)
- 40 μL Lysat (*verwendet f
 ür MassSpec*) und 10 μL 5x SDS Sample Buffer in Eppendorf Tube geben, kurz vortexen
- 5 min bei 95 ℃ kochen, kurz zentrifugieren

Laden und laufen lassen der Gele (*SDS-PAGE = Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese*)

- 3 Gele (je 12 Taschen) mit je 50 μ g Protein per Geltasche laden (*siehe Tabelle*)
- Protein Marker bei Experiment 1 in 1. Tasche, Experiment 2 in 1. und 2. Tasche, Experiment 3 in 1., 2. und 3. Tasche geben
- Gele laufen lassen für 1.5h (150V, 400 mA).

Tabelle 2: μL Probe zum laden von 50 μg Gel pro Tasche

	Probe	μ L
Experiment 1	CA15	15
	CA16	14
	CA17	12
	CA18	12
	CA19	15
	CA20	14
Experiment 2	CA21	15
	CA22	14
	CA23	14
	CA24	15
	CA25	13
	CA26	17
Experiment 3	CA27	15
	CA28	15
	CA29	16
	CA30	15
	CA31	18
	CA32	15



Abbildung 20: Verwendetes Gel



Abbildung 21: Vorrichtung zur SDS-PAGE

Transfer (Western Blotting)

- Entnehmen des vorhin verwendeten Gels aus der Plastikhülle
- "Sandwich "aus Schwämmen, Filterpapier, Gel und einer Nitrocellulose Membran (s. Abb. 22)
- Puffer: 150 ml Methanol, auf 750 mL auffüllen mit Transfer Buffer
- Transferieren während 1h 10 min (100V, 400 mA)

Blockieren

- 5% Milch (verdünnt mit PBS-Tween)
- Vor der Inkubation Proteinmarker auf Membran mit Kugelschreiber nachzeichnen
- Zur Nitrocellulose Membran dazugeben und 30min inkubieren (*Proteine der Milch blockieren alle Anheftungsstellen so dass Antikörper nicht unspezifisch hängen bleiben.*)

Primäre Antikörperinkubation

- Anti-myc (mouse, 1:1000), anti-alphatubulin (mouse, 1:1000)
- Antikörper verdünnt mit 5% Milch in PBS-Tween
- Nitrocellulosemembran so zerschneiden, dass die geblotteten Proteine mit dem spezifischen Antikörper inkubiert werden können
- Inkubation Übernacht

Sekundäre Antikörperinkubation

- 3x waschen mit PBS-Tween
- 1.5 h inkubieren mit sekundärem Antikörper (anti-mouse HRP, als Stocklösung vorhanden, c \approx 1:1000)
- 3x mit PBS-Tween waschen

Detektion der Chemilumineszenz

- Chemilumineszenz-Substrat mischen
- Membran mit Chemilumineszenz-Substrat bedecken, Detektion der Chemilumineszenz in Gel Imaging Apparat



Abbildung 22: Aufbau des Western Blottings (nach der Durchführung, farbiger Proteinmarker erkennbar)




Abbildung 23: Gerät zur Durchführung des Western Blot Transfers

Abbildung 24: Blockieren der Nitrocellulose Membran in 5% Milch



Abbildung 25: Zerschnittene Nitrocellulose Membranen



Abbildung 26: Inkubation mit Antikörpern gegen myc und $\alpha\text{-}$ Tubulin (Detektion von STIL nicht Teil meiner Experimente)

4.1.4 Zusatzexperiment: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme mitotischer Spindeln

Ziel des Experiments:

Ziel ist es, bipolare und multipolare mitotische Spindeln im Fluoreszenzmikroskop aufzunehmen. Durch Überexpression von PLK4 in einer Zelllinie, welche Doxycyclin-kontrollierte PLK4 Genexpression erlaubt, soll es zur Zentriolenamplifikation und folglich zu multipolaren Spindeln in mitotischen Zellen kommen. Diese sollen dann, ebenso wie die Zellen, denen kein Doxycyclin zugegeben wurde, mittels des Fluoreszensmikroskops aufgenommen werden. Es sollen dabei die Auswirkungen einer Zentriolenamplifikation auf die einzelne Zelle und deren Teilung veranschaulicht werden.

 \rightarrow Bei diesem Experiment wird kein wissenschaftliches Resultat erzielt, es geht einzig um die fluoreszenzmikroskopische Aufnahme der Auswirkungen einer Zentriolenamplifikation auf das MTOC einer Zelle.

Arbeitsschritte

15.05.17: Zellen splitten16.05.17: Zellen induzieren18.05.17: Zellen fixieren und Immunfluoreszenzfärbung, Aufnahme mit Fluoreszenzmikroskop

Benötigte Materialien

Zellen splitten und induzieren

- stabile Zelllinie: U2OS TREX mit integriertem myc-PLK4 (Zelllinie auch genannt B6)(*myc-PLK4 ins Genom integriert mit einem Doxycyclin-induzierbaren Promotor vor codie-render Sequenz. Endogene PLK4 Sequenz unverändert. Antibiotikaresistenzgen -> Aussortierung nicht transgene Zellen*)
- Zell-Medium: DMEM (*Flüssigmedium der Zellen*) + Serum (PAA) (*Serum mit Wachs-tumsproteinen aus Kälberföten, die nicht mit Antibiotika wie Tetra- oder Doxycyclin behandelt wurden*) + Pen/Strep (*Penicillin/Streptomycin, zur Sterilhaltung der Zellkul-turen*)+ Antibiotika (G418/Hygromycin) (*Aussortierung von nicht transgenen Zellen*)
- Deckgläser
- 6-well Platten (*Platte mit 6 kleinen Petrischalen*)
- Zellzähler (Sceptor) (Gerät zur Zählung der Zellen, so dass man Zell-Konzentration bestimmen kann)
- Doxycyclin

Zellfixierung

- Eiskaltes Methanol 100%
- PBS (isotonische Kochsalzlösung)
- Blockierung: PBS + 2% BSA (Kochsalzlösung + Proteine)

Immunfluoreszenzfärbung

- Primäre Antikörper: anti-alpha-Tubulin (mouse), anti-CP110 (rabbit, Alexa 555, rot), anti-Cep164 (rabbit, blau)
- Sekundäre Antikörper: anti-mouse Antikörper (goat, Alexa 488, grün)
- DAPI (DNA Färbung, blau)
- PBS + 2% BSA
- PBS
- Objektträger
- Befestigendes Medium (PPD) (Deckglas auf Objektträger kleben)
- Nagellack (*Fixierung des Präparates*)

Versuchsprotokoll

Zellen splitten

- 15cm Platte mit Zellen aus Inkubator nehmen
- Medium entfernen, 1x mit PBS waschen (*entfernen des Mediums*), 3 mL Trypsin dazugeben (*lösen der Zellen von der Platte*)
- 5 min im Inkubator auf 37 ℃ inkubieren
- Deckgläser auf 4 Wells einer 6-Well Platte verteilen
- Zellen in 7 mL Medium aufnehmen = 10 mL Totalvolumen)
- Zellzahl bestimmen: 20 µL Zellsupension in 280 µL PBS verdünnen (15x verdünnt), mit Sceptor Zellzahl messen.
 →verdünnen auf 1x10⁵ Zellen/mL
- − Zellen verteilen: 2 mL/Well = $2x10^5$ Zellen/Well $\rightarrow 8$ mL gesamt benötigt
- Zellen in Inkubator stellen, 24 h auf 37 °C und 5% CO₂ inkubieren

Zellinduktion

- Doxycyclin verdünnen (in Medium): Konzentration der Stocklösung: 50 mg/mL.
- Vorverdünnung (5 mL): D1: 0.1 mg/mL = 100 ug/mL (500x Verdünnung vo Stocklösung) →10 μL von der Stocklössung und 4990 μL Medium.
- Finale Verdünnung (10 mL):
 D2: 1 μg/mL = 1000 ng/mL (50'000x Verdünnung von der Stocklösung, 100x Verdünnung von Vorverdünnung D1).

 \rightarrow 100 μ L von D1 und 9900 μ L Medium.

Tabelle 3: 6-Well Platte mit Angaben zur Doxycyclin Konzentration und den zu pipettierenden Volumen:

A: 0 ng/mL	B: 0 ng/mL
-	-
D: 10 ng/mL	E: 10 ng/mL
20 µL D2	20 µL D2

Zellfixierung

- Zellmedium entfernen und eiskaltes Methanol dazugeben
- Zellen 10 min. auf -20℃ inkubieren
- Methanol entfernen, 2x mit PBS waschen
- 2 mL PBS+BSA dazugeben (*mit Proteinen um alle Anheftungsstellen zu blockieren,* so dass Antikörper nicht unspezifisch hängen bleiben)
- Zellen 30 min auf 4℃ im Kühlschrank aufbewahren

Immunfluoreszenzfärbung

- Antikörper in PBS+BSA Lösung verdünnen
 - 1. Antikörperlösung (1 mL):
 - \cdot anti-alpha-Tubulin (mouse) 1:1000 \rightarrow 1 μ L
 - 2. Antikörperlösung (1 mL):
 - \cdot anti-CP110 (rabbit, Alexa 555, rot): 1:1000 ightarrow1 μ L
 - $\cdot\,$ DAPI (DNA Färbung, blau): 1:1000 ${\rightarrow}1~\mu{\rm L}$
 - · Anti-mouse (goat, grün): 1:1000 \rightarrow 1 μ L
- \cdot Anti-Cep164 (rabbit, blau): 1:1000 \rightarrow 1 μ L
- Deckgläser mit Pinzette von der 6-Well Plate in Plastikbox (auf Parafilm) transferieren
- 1. Antikörperlösung auf Deckgläser geben (ca 250 μ L/Coverslip)
- 1.5 h Inkubieren
- Mit PBS waschen. 3x, 5 min Inkubation während jedem Waschgang, Flüssigkeit mit Pumpe abziehen.
- 2. Antikörperlösung auf Deckgläser geben (ca 250 μ L/Coverslip)
- 1.5 h Inkubieren
- Mit PBS waschen (3x), 5 min Inkubation während jedem Waschgang, Flüssigkeit mit Pumpe abziehen.

 Befestigen des Deckglases: einen Tropfen des befestigenden Mediums (PPD) auf den Glas-Objektträger geben und das Deckglas mit den Zellen nach unten darauf platzieren. Mit Nagellack versiegeln, trocknen.

Mikroskopie

- Analyse der Präparate am Deltavision Fluoreszenzmikroskop.

4.2 Resultate

4.2.1 Titration von PLK4 zur Bestimmung der Toleranzgrenze

Von jeder der 6 Zellkonditionen eines Experiments wurden die Zentrosomen von je 100 Zellen gezählt. Dabei wurde zwischen folgenden Fällen unterschieden:

(Hier nicht aufgeführt ist der Fall, bei dem nur eine Zentriole pro Zelle gezählt werden konnte.)



Abbildung 27: U2OS-TREx Zellen wurden verwendet, in welchen myc-PLK4 Expression durch Doxycyclin induziert werden kann. Zwei Zellkonditionen, einer wurde nach 24h 10 ng/mL Doxycyclin zugegeben -> PLK4 Überexpression. Fixierung nach 48h und anschliessende Inkubation mit Antikörpern gegen CP110 (rot) und myc- PLK4 (grün). DNA gefärbt mit DAPI (blau) CP110: Protein welches sich am distalen Ende des Zentriols anlagert -> ein Punkt entspricht einer Zentriole, myc- PLK4: durch Inkubation exprimiertes PLK4 welches mit einem myc-tag versehen ist. Die Zellen wurden mittels Immunfluoreszenzmikroskopie aufgenommen. Die Skala entspricht 10 μ M, im Zoom 1 μ M.

Oben: Normale Zentriolenanzahl vor der Duplikation, kein myc-Signal, da kein Doxycyclin zugegeben wurde. **Mitte Oben:** Normale Zentriolenanzahl nach der Duplikation, kein myc-Signal, da kein Doxycyclin zugegeben wurde. **Mitte Unten:** Zentriolenamplifikation, myc-Signal erkennbar. **Unten:** Flower Amplifikation, myc-Signal erkennbar



Abbildung 28: 6 Zellkonditionen welchen nach 24h unterschiedliche Doxycyclinmengen zugegeben wurden (s. ng/mL DOX). Die Analyse der Zentrosomenanzahl wurde mittels Immunfluoreszenzmikroskopie durchgeführt, Zentrosomenanordnungen zwischen welchen unterschieden wurde siehe Abb. 27. Rohdaten siehe Tabelle 8 im Anhang. Mittelwerte umgerechnet in Prozent, 100% entspricht 100 Zellen. Fehlerindikatoren zeigen die Standardabweichung.



Abbildung 29: 6 Zellkonditionen welchen nach 24h unterschiedliche Doxycyclinmengen zugegeben wurden (s. ng/mL DOX). Analyse der Zentrosomenanzahl wurde mittels Immunfluoreszenzmikroskopie durchgeführt, Zentrosomenanordnungen zwischen welchen unterschieden wurde siehe Abb. 27. Rohdaten siehe Tabelle 8 im Anhang. Mittelwerte umgerechnet in Prozent, 100% entspricht 100 Zellen. Fehlerindikatoren zeigen die Standardabweichung.

Die Zellen, welche weniger als 2 Zentriolen aufwiesen, blieben die ganzen Zählungen in der Zahl konstant. Ebenso die Zellen mit zerstreuten Amplifikationen. Zwischen den Konditionen A und B gibt es eine Erhöhung von 7.3% der Zellen, welche zerstreute Amplifikationen aufweisen. Es ist jedoch kein konstanter Trend auszumachen, da die Konditionen E und F bloss eine Erhöhung von 2, bzw. 3.5% aufweisen. Die Zahl der Flower Amplifikationen ist in den Konditionen C, D, E und F erhöht, wobei im t-Test nur die Zunahmen in D, E und F statistisch signifikant sind. Die Erhöhung bei C, welche lediglich um 4.3% zur Gesamtzahl der Zellen erhöht ist, könnte durch die grosse Streuung auch rein zufällig zustande gekommen sein.

4.2.2 Western Blot zur Bestimmung der myc-PLK4 Menge



Abbildung 30: U2OS-TREx Zellen wurden verwendet, in welchen myc-PLK4 Expression durch Doxycyclin induziert werden kann. 6 Zellkonditionen welchen nach 24h unterschiedliche Doxycyclinkonzentrationen zugegeben wurden (s. ng/mL Dox). Inkubiert mit Antikörpern gegen myc und alpha-Tubulin. Proteinmarker zeigt das Molekülgewicht in kDa.

Exp. 1-3: Abgebildet sind die im Gel Imaging Apparat aufgenommenen Chemilumineszenzdetektionen. Analysiert wurde wurde die myc-PLK4 Konzentration mittels Detektion des myc Anhangs, die Detektion von alpha-Tubulin diente als Ladekontrolle.

In den Konditionen D, E und F (0.5, 1 und 10 ng/mL) wurde ein Signal detektiert. Es wurde von D nach F stufenweise intensiver, was auf eine höhere Proteinkonzentration schliessen lässt.

(Es ist zu erwähnen, dass sich myc-PLK4 und endogenes PLK4 einzig darin unterscheiden, dass myc-PLK4 einen Proteinanhang aufweist, welcher dann in Versuchen wie z.B. dem Western Blot detektiert werden kann. Dieser myc Proteinanhang beeinflusst jedoch keineswegs die Aktivität oder den Wirkmechanismus des Enzyms PLK4. Myc-PLK4 ist dasjenige, dessen Expression durch Doxycyclinzugabe induziert werden kann.)

4.2.3 Zusatzexperiment: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme mitotischer Spindeln

Bei diesem Experiment wurde kein wissenschaftliches Resultat erzielt, es ging einzig um die fluoreszenzmikroskopische Aufnahme der Auswirkungen einer Zentriolenamplifikation auf das MTOC einer Zelle. Dieses Experiment wird daher nicht in den Resultaten aufgeführt. Das Resultat ist in den Abbildungen bei welchen fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen des MTOC oder von Cep164 gezeigt werden ersichtlich.

4.2.4 Massenspektrometrische Analyse der PLK4 Konzentration

Dieser Versuch ist nicht in Material und Methoden aufgeführt, da er nicht von mir selbst durchgeführt wurde. Er wurde parallel und zusammenhängend mit meinen Versuchen durchgeführt und die für meine Fragestellung relevanten Ergebnisse wurden mir freundlicherweise von C. Arquint zur Verfügung gestellt.

Es wurden dazu dieselben Zellkonditionen verwendet wie im Experiment "Titration von PLK4 zur Bestimmung der Toleranzgrenze" (*s. Kapitel 4.1.2*).

Ziel dieses Experiments war es, die relativ erhöhte PLK4 Konzentration zu ermitteln. (*Zur Methode Massenspektrometrie s. 4.1.1*)

In diesem Versuch wurden zwei unabhängige Peptide von PLK4 detektiert. Durch Integralrechnung konnte die Fläche unter der sich aus den Messungen ergebenden Kurve berechnet werden. Die relative PLK4 Konzentration wurde berechnet im Verhältnis zu Kondition A, der kein Doxycyclin zugegeben wurde. Für diese legte man den Wert 1, bzw. 100% fest. Als Wert für die relative PLK4 Konzentration einer Kondition wurde der Durchschnitt der relativen Menge der zwei detektierten Peptide verwendet. (*Es ist anzumerken, dass diese Rechnungen nicht von mir durchgeführt wurden, sondern mir lediglich die Endresultate, also die relativen PLK4 Konzentrationen, zur Verfügung gestellt wurden. Deshalb werden diese hier auch nicht weiter aufgeführt.)*



Abbildung 31: 6 Zellkonditionen welchen nach 24h unterschiedliche Doxycyclinmengen zugegeben wurden (s. ng/mL DOX). 0 ng/mL entspricht 100%. Daten siehe Tabelle 9 im Anhang, umgerechnet in Prozent. Fehlerindikatoren zeigen die Standardabweichung.



Abbildung 32: 6 Zellkonditionen welchen nach 24h unterschiedliche Doxycyclinmengen zugegeben wurden (s. ng/mL DOX). Daten siehe Tabelle 9 im Anhang, relative erhöhte PLK4 Konzentration wobei Kondition A 0% entspricht. Formel zur Berechnung der relativen Erhöhung:

 $Konzentration_{erhoeht}\% = Konzentration\% - 100\%$

Die PLK4 Konzentration ist in den Konditionen C, D, E und F erhöht, wobei im t-Test nur die Zunahme in D, E und F statistisch signifikant ist. Die Erhöhung in Kondition C ist nicht signifikant. Dieser Wert könnte also zufällig und nicht durch Zugabe von Doxycyclin gemessen worden sein.

4.3 Diskussion der Resultate

Beim ersten Versuch "Titration von PLK4", wurden die Zellkulturen 3 Mal unabhängig voneinander ausgewertet. Die Streuung, erkennbar an den Fehlerindikatoren in Abb. 28, variiert. Teils ist sie sehr klein, teils gross. Es wurden jeweils 100 Zellen pro Kondition pro Versuch und somit 300 Zellen pro Kondition gezählt. Ob diese Zahl aussagekräftig genug ist oder ob man mehr Zellen hätte zählen sollen ist fraglich. Wahrscheinlich ist sie ausreichend um eine korrekte Aussage über die Ergebnisse machen zu können, um jedoch durchgehend signifikante Ergebnisse zu erhalten hätte man mehr Zellen auszählen müssen, da die Streuung dann geringer werden würde.

Bei der verwendeten Zellkultur handelt es sich um eine Krebszellkultur, dadurch gibt es unter den Zellen immer wieder mutierte Zellen. Aufgrund dessen, dass diese meist auch eine nicht durch Doxycyclin induzierte Zentriolenamplifikation aufweisen, wurden übergrosse Zellen nicht mitgezählt. Die Aussagekraft der Resultate konnte so erhöht werden.

Es gibt auch in der Kondition, der kein Doxycyclin zugegeben wurde, amplifizierte Zellen. Dies kann man darauf zurückführen, dass auch nicht übergrosse Zellen mutiert sein können und darum eine Amplifikation aufweisen, oder dass der Promotor sogenannt 'leaky', zu Deutsch undicht, ist. Dies bedeutet, dass auch ohne Induktion myc-PLK4 exprimiert wurde und somit die Gesamtkonzentration von PLK4 erhöht war. Wäre das der Fall, könnte man bei diesen Zellen mit dem Mikroskop das myc-Signal detektieren. Dies war bei unseren Stichproben nicht der Fall (*s. Abb. 9 und Abb. 27*), was aber keine sichere Aussage über die gesamte Zellkultur zulässt.

Es ist fest zu halten, dass in den Western Blot Experimenten myc-PLK4 detektiert wurde und bei den massenspektrometrischen Messungen die Gesamtmenge an PLK4. Bei den Western Blot Experimenten war das Signal der 0,05 und 0,1 ng/mL Kondition nicht vorhanden, bzw. zu schwach, um detektiert zu werden. (Bei der 0 ng/mL ist kein Signal gewünscht, da dieser Kondition kein Doxycyclin zugegeben wurde und somit auch keine myc-PLK4 Expression induziert werden sollte.) Da die drei Experimente unabhängig voneinander durchgeführt wurden, das Signal jedoch deckend über alle drei nicht detektiert werden konnte, handelt es sich dabei nicht um einen Messfehler. Mit der Western Blot-Methode können Proteine erst ab einer bestimmten Konzentration detektiert werden und es kann keine zuverlässige quantitative Aussage gemacht werden. Diese Methode lässt lediglich eine Aussage über eine Zu- oder Abnahme der Proteinkonzentration anhand der Intensität der detektierten Singale zu. Dies ist auch der Grund, weshalb auf aussagekräftigere und sensitivere Methoden wie beispielsweise die Massenspektrometrie gewechselt wird. Vor der Messung wurden jegliche Proteine in Peptide aufgebrochen und anschliessend ausgewählte Peptide gemessen. Das heißt, es wurde bei dieser Messung nicht unterschieden zwischen endogenem PLK4 und induziertem myc-PLK4, sondern die Gesamtmenge des Enzyms PLK4 gemessen. Ebenso wie die anderen Versuche wurden die massenspektrometrischen Messungen dreimal unabhängig voneinander durchgeführt. Es wurden zwei unabhängige Peptide des Proteins PLK4 gemessen. Bei den oben aufgeführten Werten handelt es sich um den Durchschnitt der relativen Konzentration dieser zwei Peptide. Es hätten jedoch auch hier, um durchgehend signifikante Ergebnisse zu erhalten, mehr Peptide gemessen oder mehr Messungen durchgeführt werden müssen. Die Streuung war sehr gering für die Konditionen A, B und C. In den Konditionen D, E und F war sie grösser, dies änderte jedoch nichts daran, dass diese Konditionen eine sigifikante PLK4 Erhöhung aufwiesen (*der t-Test berechnet sich u. a. aus Mittelwert und Standardabweichung*).

Des Weiteren wurde die Proteinkonzentration über die gesamte Zellkultur gemessen, welche somit einen Durchschnittswert pro Zelle darstellt. Es kann also keine Aussage über die Abweichung der Proteinmenge von Amplifizierten zu nicht amplifizierten Zellen gemacht werden.

4.4 Interpretation

Die Leitfrage lautet, wie sich unterschiedliche Konzentrationen des Enzyms myc-PLK4 auf die Zentrosomenduplikation auswirken. Es ist dabei zu erwähnen, dass sich myc-PLK4 und endogenes PLK4 einzig darin unterscheiden, dass myc-PLK4 einen Proteinanhang hat, welcher in Versuchen wie z.B. dem Western Blot detektiert werden kann. Dieser myc Proteinanhang beeinflusst jedoch keineswegs die Aktivität oder den Wirkmechanismus des Enzyms PLK4. Myc-PLK4 ist jenes, dessen Expression durch Zugabe von Doxycyclin induziert werden kann.



Abbildung 33: Entspricht Abb. 29, einzig die Darstellung wurde leicht abgeändert



Abbildung 34: Entspricht Exp. 2 aus Abb. 30

Die Zahl der nicht Flower-ähnlichen Amplifikationen variiert über die 6 Zellkulturen nicht gross. Auch in der Kondition, der kein Doxycyclin zugegeben wurde, weisen 16% der Zellen zerstreute Amplifikationen auf. Darum wurde in der weiteren Interpretation nur der Zusammenhang zwischen den Flower Amplifikationen, welche als stärkere Amplifikationen gelten, und der PLK4 Konzentration betrachtet.

Die Flower Amplifikationen sind in den Konditionen D, E und F sichtlich erhöht. Sie werden eindeutig durch die erhöhte PLK4 Konzentration, die im Western Blot detektiert wurde, hervorgerufen. In Kondition C liegt eine leichte Erhöhung der Flower Amplifikationen vor, welche jedoch nicht signifikant ist. Es konnte auch kein Western Blot Signal für diese Kondition detektiert werden. Ob das Signal zu schwach oder nicht vorhanden war, kann nicht gesagt werden. Wäre wahrhaftig kein myc-PLK4 in dieser Kondition vorhanden, so wäre die Erhöhung der Flower Amplifikationen in Kondition C entweder eine Messungenauigkeit und aufgrund einer grossen Streuung zustande gekommen, oder es kam zu einer nicht durch Doxycyclin induzierten Überexpression von endogenem PLK4.

Um genauere Aussagen über den Zusammenhang der Flower Amplifikationen und der PLK4 Konzentration machen zu können, wurden dieselben Konditionen massenspektrometrisch analysiert.



Abbildung 35: Zusammengesetzte Daten aus Abb. 28 und Abb. 32. Die rel. erhöhte PLK4 Konzentration wurde durch 25 dividiert zur besseren grafischen Gegenüberstellung mit den Flower Amplifikationen. Es sind einzig die Verläufe der Kurven zu betrachten, darum wurde auch die y-Achse entfernt.

Tabelle 4: Relativ erhöhte PLK4 Konzentration in % und relative Menge der Zellen mit Flower Amplifikation. Daten siehe Tabelle 8 und 9 im Anhang

relativ erhöhte PLK4 Konzentration in %	relative Menge Zellen mit Flower Amplifikation in %	
0	1.33	
0	1	
21	4.33	
882	29.67	
1745	38	
2434	40	

In den massenspektrometrischen Messungen wurde nicht die myc-PLK4 Konzentration bestimmt, sondern die Gesamtmenge PLK4. Man konnte anschliessend auf die relative PLK4 Erhöhung durch Subtraktion der PLK4 Menge in Kondition A schliessen (*Dieser Kondition wurde kein Doxycyclin zugegeben. Sie sollte daher nur endogenes PLK4 aufweisen*).

Um sicherzustellen, ob die PLK4 Erhöhungen doxycyclininduziert oder zufällig zustande kamen wurden diese Werte statistisch mit dem t-Test ausgewertet. Die Kondition C weist keine signifikante Erhöhung auf, dieser Wert könnte also auch durch andere Faktoren als die induzierte Expression von myc-PLK4 zustande gekommen sein. Die Konditionen D, E und F weisen eine signifikante Erhöhung auf. Man kann also davon ausgehen, dass in diesen Konditionen die PLK4 Erhöhung doxycyclininduziert war und die relativ erhöhte PLK4

Menge der Menge myc-PLK4 entspricht.

Vergleicht man die Verläufe der PLK4 Erhöhung und den Flower Amplifikationen, so wird eine Korrelation ersichtlich. Eine erhöhte PLK4 Konzentration führt eindeutig zu einer Flower ähnlichen Amplifikation der Zentrosomen. Das Ausmass der Amplifikation reicht von 4.3 bis 40% der Zellen. Verglichen mit der Gesamtzahl der amplifizierten Zellen, machen die Flower Amplifikationen in der Kondition D $\frac{1}{2}$ und in den Konditionen E und F $\frac{3}{4}$ der Amplifikationen aus (*s. Abb. 33*).

In der Kondition C lag eine Amplifikation von 4.3% der Zellen vor und eine relative erhöhte PLK4 Menge von 21%. Jedoch waren weder die Flower Amplifikation noch der detektierte PLK4 Wert signifikant. Die Zellkulturen, welche analysiert wurden, wiesen zwar dieselben Konditionen auf, aber waren unabhängig voneinander. Das heißt, dass auch die Resultate unabhängig voneinander zustande kamen. In beiden Fällen war es so, dass zwei der drei ermittelten Werte dieser Kondition beinahe kongruent waren und der dritte so massiv abwich, dass der Mittelwert sich veränderte oder die Streuung gross wurde.

Es ist unwarscheinlich, dass die erhöhten Werte durch spontane Überexpression von endogenem PLK4 zustande kamen. Dies hätte sonst in dieser Kondition in beiden Experimenten, Titration von PLK4 und Massenspektrometrie, der Fall sein müssen. Betrachtet man aber die Konditionen A und B kam es über beide Experimente, Titration von PLK4 und Massenspektrometrie, nie zu einer nicht induzierten Überexpression.

Als Zusammenhang zwischen diesen Ergebnissen ist eher zu sehen, dass in beiden Fällen die Doxycyclinkonzentration nicht ausreichte, um eine konstante und signifikante PLK4 Überexpression zu induzieren. Schon nur in Kondition D in welcher 5x mehr Doxycyclin zugegeben wurde, war die Flower Amplifikation konstant und die PLK4 Menge um 882% erhöht. Daraus lässt sich schliessen, dass der integrierte Promotor myc-PLK4 erst ab einer gewissen Doxycyclinkonzentration exprimiert, dann jedoch in grosser Menge.

Obwohl die PLK4 Konzentration in den Zellen stetig ansteigt, erreicht die Zahl der amplifizierten Zellen nicht über 60% der Zellkultur. Dies ist darauf zurückzuführen, dass ein Teil der Zellen bereits vor der Zugabe von Doxycyclin abgestorben ist, oder sich trotz der Arretierung mit Thymidin nicht in der S-Phase des Zellzyklus befand. In der S-Phase sind die Tochterzentriolen ersichtlich (*s. Abb. 7*). Ein weiterer Erklärungsansatz ist der Zeitfaktor; eventuell wären mehr als 60% der Zellen amplifiziert hätte man sie länger als 24h mit Doxycyclin induziert.

Zusammengefasst sagen die Ergebnisse aus, dass eine PLK4 Konzentration von 982% eine grossflächige Amplifikation mit Flower Amplifikation in 30% der Zellen hervorruft. Bei einer Konzentration wie in den Konditionen E und F amplifizieren 40%. Das heißt, dass für 10% der Zellen selbst eine um über 800% erhöhte PLK4 Konzentration noch tolerierbar war. Daraus lässt sich schliessen, dass die PLK4 Konzentration einerseits um ein Vielfaches erhöht sein muss, um den maximalen Effekt auf die Zellen zu haben, und andererseits, dass eine gewisse erhöhte Menge PLK4 von einem Teil der Zellen toleriert wird und in diesen

nicht zur Amplifikation führt. Dies bestätigt eine starke Regulation der Zentriolenduplikation der Zellen zur Prävention einer Amplifikation [Hinchcliffe et Sluder, 2001]. Jedoch kann keine Aussage über die konkrete Toleranzgrenze gemacht werden, da diese zwischen 120%-980% PLK4 Konzentration liegt. Um beobachten zu können, inwiefern die Expression des Promotors titrierbar ist und wo die konkrete Toleranzgrenze der PLK4 Konzentration liegt, müsste man weitere Experimente mit Doxycyclinkonzentrationen zwischen 0.1 ng/mL und 0.5 ng/mL durchführen.

5 Diskussion

Der Beginn der Zentrosomenforschung geht auf den Anfang des letzten Jahrhunderts zurück. 1900 veröffentlichte Theodor Boveri das Buch "Zellen-Studien: Über die Natur der Centrosomen", in welchem er den Funktionen des Zentrosoms nachging. Weitere Studien folgten und 1914 veröffentlichte er "Zur Frage der Entstehung maligner Tumore". Er postulierte darin, dass eine Überzahl an Zentrosomen zu Aneuploidie und schliesslich zu Krebs führe [Boveri, 1914].

2005 wurde erstmals die Funktion von PLK4 untersucht [Habedanck et al., 2005]. Die Ergebnisse zeigten, dass dieses am Zentrosom lokalisiert und eine Überexpression zu einer Überduplikation führt. Weitere Duplikationsfaktoren und deren Funktion wurden entdeckt [Kleylein-Sohn, 2007] [Arquint et al., 2012].

Um die Kanzerogenität einer chronischen Zentriolenamplifikation in einem Organismus zu untersuchen, wurde 2008 ein Fliegenmodell verwendet, in welchem man PLK4 überexprimierte [Basto et al., 2008]. Die Ergebnisse dieser und anderer Studien [Sabino et al., 2015] [Castellanos et al., 2008] führten zu der Schlussfolgerung, dass Zentriolenamplifikationen im sich entwickelnden Gehirn und in den Flügeln bei Fliegen die Tumorgenese fördern [Raff et Basto, 2017].

Ab 2015 wurden die Auswirkungen der Zentriolenamplifikation auch in Mäusen untersucht. Dabei zeigte sich, dass in der einen Studie PLK4 Überexpression zu Amplifikationen in bestimmten Organen führte, aber nicht zu Tumorgenese, unabhängig von der Aktivität des Tumorsupressorgens p53 (p53 +/+, p53 +/-, p53 -/- Mäuse) [Vitre et al., 2015]. In weiteren zwei Studien führte die PLK4 Überexpression in der Epidermis [Sercin et al., 2016] als auch über den gesamten Organismus [Coelho et al., 2015] einzig zu einer Zunahme der Tumorgenese unter Inaktivität des Tumorsupressorgens p53 (p53 -/- Mäuse). (Es ist anzumerken, dass die Inaktivität von p53 an sich zu Tumorgenese führt.) Im Februar 2017 gelang es erstmals zu zeigen, dass die durch PLK4 Überexpression induzierte Zentriolenamplifikation zu Aneuploidie und dadurch zu Tumorgenese führt und dies unter Aktivität von p53 (s. Kap. 3.6.1 Krebs) [Levine et al., 2017]. Diese Ergebnisse als auch die der Fliegenexperimente bestätigen Boveris Theorie. Doch wirft die im Februar publizierte Studie die Frage auf, weshalb es nur in diesen Experimenten zur PLK4 induzierten Tumorgenese kam: Der Unterschied zu den anderen Studien lag einerseits darin, dass in jener von Levine et al. ein doxyzyklininduzierbares single-copy-Transgen (Erklärung: https://de.wikipedia.org/wiki/Single-copy-Gen) zur Überexpression von PLK4 in das Mäusegenom integriert wurde [Sercin et al., 2016]

[Vitre et al., 2015] oder dass die Tiere über einen längeren Zeitraum beobachtet wurden [Coelho et al., 2015].

Im Gegensatz zu den Experimenten, in denen kein single-copy-Transgen verwendet wurde, wurde eine geringere PLK4 Menge überexprimiert [Serçin et al., 2016] [Vitre et al., 2015]. Die Amplifikation beschränkte sich so auf durchschnittlich ein Extrazentrosom pro Zelle, was der zu beobachtenden Menge in menschlichen Tumoren entspricht [Levine et al., 2017] [Denu et al., 2016]. Beispielsweise war die Menge PLK4 mRNA in induzierten Zellen eines Mausembryos im Versuch von Levin et. al. ca. 6fach erhöht und bei Sercin et. al. ca. 20fach [Levine et al., 2017] [Serçin et al., 2016], Abb. 2c.

Eine von Levine et. al. aufgestellte Erklärung der unterschiedlichen Ergebnisse ist, dass Zellen, die nur eine leichte Amplifikation aufweisen, eine längere Lebensdauer haben und weniger von Apoptose betroffen sind als solche, mit einer Vielzahl an Amplifikationen [Levine et al., 2017]. Weist eine Zelle eine Vielzahl an Zentrosomen auf, so kann es zu einer multipolaren Mitose kommen, deren Folgen fatal sind und in den meisten Fällen zum Absterben der Tochterzellen führen. Das Absterben der betroffenen Tochterzellen kann nur durch Stilllegung des Tumorsupressorgens p53 umgangen werden. Weist eine Zelle jedoch nur ein Extrazentrosom auf, können die Zentrosomen leicht geclustert werden, und es kommt zu einer pseudobipolaren Mitose. Auch bei dieser schleichen sich Fehler ein, die jedoch selten so fatal sind, dass die Tochterzellen absterben. Bleibt die Amplifikation über einen längeren Zeitraum bestehen, summieren sich die Mutationen im Genom, und

es kommt zur Tumorgenese; unabhängig von p53.

Im Versuch von Coelho et. al. wurde zwar auch ein single-copy-Transgen verwendet, jedoch wurden die Tiere nur bis Woche 35 beobachtet. Ab Woche 36 beobachtete man im Versuch von Levine et. al. eine spontane Tumorgenese in den Versuchstieren [Coelho et al., 2015], Abb. 1b [Levine et al., 2017], Abb. 5a.

Die Experimente, die ich in meiner Arbeit durchführte, bestätigten einerseits die Forschungsergebnisse von 2008, dass eine PLK4 Überexpression zu einer Zentriolenamplifikation führt. Meine Experimente gingen noch einen Schritt weiter und untersuchten, wie sich unterschiedliche Konzentrationen auf die Zentrosomenduplikation auswirken, was wiederum in aktuelle Forschungsbereiche fliesst: das Verständnis der Wechselwirkungen zwischen den Duplikationsfaktoren, und der Krebsbildung durch Zentriolenamplifikation. Denn es ist noch unklar, wie PLK4 Überexpression und die damit verbundene Zentriolenamplifikation zu Tumorgenese führen. Dies liegt unter anderem daran, dass das Zentrosom über eine Vielzahl an Funktionen verfügt (*s. Kap. 3.3 Funktion des Zentrosoms*), worunter Organisation des Mikrotubuliapparates, Ausbildung von Zilien und Flagellen und regulatorische Funktionen fallen [Doxsey, 2001]. Das Verständnis der Beteiligung des Zentrosoms an der Tumorgenese ist wichtig, um abschätzen zu können, ob Zentrosomen ein lohnenswertes diagnostisches [Godinho et Pellman, 2014] oder therapeutisches [Raff et Basto, 2017] Angriffsziel bei der Behandlung und Prävention von Krebs darstellen könnten.

Des Weiteren ist nicht nur Krebs mit zentrosomalen Defekten in Verbindung zu setzen, sondern noch eine Vielzahl anderer Krankheiten (*s. Kapitel 3.6.2 Weitere Krankheiten*).

6 Schlusswort

Grundsätzlich verlief der Arbeitsprozess meiner Maturarbeit gut und das Arbeiten fiel mir leicht. Das persönliche Interesse der Thematik war gross und wurde auch durch teils schwierige Fachliteratur nicht gedämpft.

Eine Herausforderung war für mich, den Fokus nicht zu verlieren und die Leitfrage als roten Faden durch die Arbeit zu verfolgen. Dank der verdankenswerten Unterstützung durch meine Betreuer und der fokussierten Leitfrage gelang mir dies am Ende erfreulich gut. Eine weitere Schwierigkeit war, dass schon zum blossen Verständnis der Leitfrage viel Fachwissen aufgearbeitet werden musste und dass die Fachliteratur in englischer Fachsprache publiziert wird, machte dies nicht einfacher. Schliesslich war aber auch dies für mich als Neueinsteigerin im Gebiet der molekularbiologischen Forschung mit etwas Hilfe bewältigbar.

Dank meiner Maturarbeit konnte ich einerseits mein Englisch verbessern, und es war mir möglich, einen Einblick in die molekularbiologische Forschung zu erhalten. Ich bedanke mich herzlich bei Stefano Ferrari für die Hilfe bei der Suche eines passenden Labors und bei Erich Nigg für die Möglichkeit, Experimente parallel zu laufenden Projekten seines Labors im Biozentrum der Universität Basel durchzuführen. Weiter bin ich überaus erfreut und dankbar darüber, dass es mir ermöglicht wurde, einen Einblick in die Berufswelt des Forschers und seinen Berufsalltag zu erlangen, spannende fachliche Diskussionen zu führen und ein hochinteressantes Maturarbeitsthema wählen konnte.

Ein besonderer Dank gilt auch Christian Arquint. Von ihm wurde ich bei meinen Arbeiten im Labor vorbildlich und mit viel Verständnis, Engagement und Geduld betreut und begleitet sowie bei der Erarbeitung der theoretischen Grundlagen und der Korrektur der Arbeit tatkräftig unterstützt. Nicht zuletzt war er bei all meinen zahlreichen Fragen jederzeit eine kompetente Ansprechperson für mich.

Ich danke der Proteomics Core Facility des Biozentrums der Universität Basel unter der Leitung von Alexander Schmidt sehr für die freundliche Durchführung der massenspektrometrischen Analysen meiner Experimente.

Bei meinem Betreuer, Peter Schocher, bedanke ich mich sehr für all die Zeit, die er mir gewidmet hat, die Freiheit, die er mir beim Schreiben der Arbeit gewährte, und dass er mich immer wieder davon abhielt, mich in der Informationsmenge zu verlieren.

Zum Schluss aber nicht weniger von Herzen danke ich meinen Freunden und meiner Familie, im Besonderen meinen Eltern Olivia und Patric und meinem Freund Silvan für Euren unerschöpflichen Support.

Literatur

Bücher

- [Alberts et al., 1994, S. 803 ff.] "Molecular biology of the cell", S. 803 ff.B. Alberts, D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, J. D. Watson; Garland Publishing Inc., 3. Auflage, 1994
- [Becker et al., 2012, S. 34] "NATURA Biologie für Gymnasien", S. 34 A. Becker, I. Bokelmann, H.-P. Krull, M. Schäfer; Ernst Klett Verlag GmbH, 2012
- [Boveri, 1914] "Zur Frage der Entstehung maligner Tumore", Theodor Boveri; Gustav Fischer Verlag, 1914
- [Schmidt et Thews, 1997, S.4] "Physiologie des Menschen", S. 4 R. F. Schmidt, G. Thews; Springer- Verlag, 27. Auflage, 1997

Arbeiten

- [Arquint, 2014] "On the Function and Regulation of Human STIL a Centrosomal Protein Implicated in Autosomal Recessive Primary Microcephaly", Christian Arquint, PhD Doktorarbeit, 2014
- [Guderian, 2010] "Control of Centriole Numbers by Plk4 Autophosphorylation and βTrCPmediated Degradation", Gernot Guderian, PhD Doktorarbeit, 2011

Periodical

[Arquint et al., 2012] "Cell-cycle-regulated expression of STIL controls centriole number in human cells.",
C. Arquint, K. F. Sonnen, Y. D. Stierhof, E. A. Nigg; Journal of Cell Science Vol. 125, 2012

[Arquint et Nigg, 2016] "The PLK4-STIL-SAS-6 module at the core of centriole duplication.",
 C. Arquint, E. A. Nigg; Biochemical Society Transactions Vol. 44, 2016

[Basto et al., 2008] "Centrosome amplification can initiate tumorigenesis in flies.",
 R. Basto, K. Brunk, T. Vinadogrova, N. Peel, A. Franz, A. Khodjakov, J. W. Raff; Cell Vol. 133, 2008

 [Castellanos et al., 2008] "Centrosome dysfunction in Drosophila neural stem cells causes tumors that are not due to genome instability.",
 E. Castellanos, P. Dominguez, C. Gonzalez; Current Biology Vol. 18, 2008

[Coelho et al., 2015] "Over-expression of Plk4 induces centrosome amplification, loss of primary cilia and associated tissue hyperplasia in the mouse.",
P. A Coelho, L. Bury, M. N. Shahbazi, K. Liakath-Ali, P. H. Tate, S. Wormald, C. J. Hindley, M. Huch, J. Archer, W. C. Skarnes, M. Zernicka-Goetz, D. M. Glover; Open Biology Vol. 5, 2015

[Denu et al., 2016] "Centrosome amplification induces high grade features and is prognostic of worse outcomes in breast cancer.",
 R. A. Denu, L. M. Zasadil, C. Kanugh, J. Laffin, B. A. Weaver, M. E. Burkard; BMC Cancer Vol. 16, 2016

[Doxsey, 2001] "Re-evaluating centrosome function.",S. Doxsey; Nature Reviews Molecular Cell Biology Vol. 2, 2001

[Godinho et Pellman, 2014] "Causes and consequences of centrosome abnormalities in cancer.",

S. A. Godinho, D. Pellman; Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences Vol. 369, 2014

[Habedanck et al., 2005] "The Polo kinase Plk4 functions in centriole duplication.",R. Habedanck, Y. D. Stierhof, C. J. Wilkinson, E. A. Nigg; Nature Cell Biology Vol. 7, 2005

[Hinchcliffe et Sluder, 2001] "It takes two to tango: understanding how centrosome duplication is regulated throughout the cell cycle.",E. H. Hinchcliffe, G. Sluder; Genes and Development Vol. 15, 2001

[Jan, 1997] "Microtubule-organizing centres in plants", M. Jan; Trends in Plant Science Vol. 2, 1997

[Kirkham et al., 2013] "SAS-4 is a C. elegans centriolar protein that controls centrosome size.",

M. Kirkham, T. Müller-Reichert, K. Oegema, S. Grill, A. A. Hyman; Cell Vol. 112, 2013

[Kleylein-Sohn, 2007] "Plk4-induced centriole biogenesis in human cells.",J. Kleylein-Sohn, J. Westendorf, M. Le Clech, R. Habedanck, Y. D. Stierhof, E. A. Nigg; Developmental Cell Vol. 13, 2007

[Kohlmaier et al., 2009] "Overly long centrioles and defective cell division upon excess of the SAS-4-related protein CPAP.",G. Kohlmaier, J. Loncarek, X. Meng, B. F. McEwen, M. M. Mogensen, A. Spektor, B.D. Dynlacht, A. Khodjakov, P. Gönczy; Current Biology Vol. 19, 2009

[Levine et al., 2017] "Centrosome Amplification Is Sufficient to Promote Spontaneous Tumorigenesis in Mammals.",
M. S. Levine, B. Bakker, B. Boeckx, J. Moyett, J. Lu, B. Vitre, D. C. Spierings, P. M. Lansdorp, D. W. Cleveland, D. Lambrechts, F. Foijer, A. J. Holland; Developmental Cell Vol. 40, 2017

[Marthiens et al., 2013] "Centrosome amplification causes microcephaly.",V. Marthiens, M. A. Rujano, C. Pennetier, S. Tessier, P. Paul-Gilloteaux, R. Basto; Nature Cell Biology Vol. 15, 2013

- [Nigg, 2002] "Centrosome aberrations: Cause or consequence of cancer progression?",E. A. Nigg; Nature Review Cancer Vol. 2, 2002
- [Pedersen et Rosenbaum, 2008] "Intraflagellar transport (IFT) role in ciliary assembly, resorption and signalling.",L. B. Pedersen, J. L. Rosenbaum; Current Topics in Developmental Biology Vol. 85, 2008

[Raff et Basto, 2017] "Centrosome Amplification and Cancer: A Question of Sufficiency.",J. W. Raff, R. Basto; Developmental Cell Vol. 40, 2017

[Sabino et al., 2015] "Moesin is a major regulator of centrosome behavior in epithelial cells with extra centrosomes.",

D. Sabino, D. Gogendeau, D. Gambarotto, M. Nano, C. Pennetier, F. Dingli, G. Arras, D. Loew, R. Basto; Current Biology Vol. 25, 2015

[Serçin et al., 2016] "Transient PLK4 overexpression accelerates tumorigenesis in p53deficient epidermis.",Ö. Serçin, J. C. Larsimont, A. E. Karambelas, V. Marthiens, V. Moers, B. Boeckx, M.

Le Mercier, D. Lambrechts, R. Basto, C. Blanpain; Nature Cell Biology Vol. 18, 2016

[Vitre et al., 2015] "Chronic centrosome amplification without tumorigenesis.",

B. Vitre, A. J. Holland, A. Kulukian, O. Shoshani, M. Hirai, Y. Wang, M. Maldonado, T.Cho, J. Boubaker, D. A. Swing, L. Tessarollo, S. M. Evans, E. Fuchs, D. W. Cleveland;Proceedings of the National Academy of Sciences USA Vol. 112, 2015

Internet

[1, Chemgapedia] "Mikrotubuli"

"http://www.chemgapedia.de/vsengine/glossary/de/mikrotubuli.glos.html"(Stand 2.10.17)

[2, Spektrum] "Flagellen"

"http://www.spektrum.de/lexikon/biologie-kompakt/flagellen/4223"(Stand 13.6.17)

[3, Spektrum] "Cilien"

"http://www.spektrum.de/lexikon/biologie/cilien/14162"(Stand 13.6.17)

[4, Wikipedia] "Cilien"

"https://de.wikipedia.org/wiki/Ziliopathie#Bekannte_Ziliopathien"(Stand 14.6.17)

Abbildungen und Tabellen

[Titelseite] "Mitotische Zelle" Legende s. Abb. 10, gleiches Bild wie das gezeigt unter pseudobipolarer Mitose.

[Abbildung 1] "Struktur eines Mikrotubulus", (Stand 28.9.17) http://www.william-hogarth.de/microtubules.jpg

[Abbildung 2] "Zentrosom", (Stand 11.5.17) https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/6/6f/Centrioleen.svg/800px-Centriole-en.svg.png

[Abbildung 3] "Native Architecture of the Centriole Proximal Region Reveals Features Underlying Its 9-Fold Radial Symmetry", Figure 7
P. Guichard, V. Hachet, N. Majubu, A. Neves, D. Demurtas, N. Olieric, I. Fluckiger, A. Yamada, K. Kihara, Y. Nishida, S. Moriya, M.O. Steinmetz, Y. Hongoh, P. Gönczy; Current Biology Vol. 23, 2013 http://www.cell.com/action/showImagesData?pii=S0960-9822(13)00786-0

[Abbildung 4] "MTOC Interphase und Mitose" Bilder persönlich mittels Fluoreszenzmikroskopie aufgenommen und anschliessend in Photoshop bearbeitet. Grafik wurde selbst in Illustrator erstellt.

[Abbildung 5] "Zilie",(Stand 14.6.17) https://www.scienceopen.com/document_file/4fea9cc1-290b-451b-b8a1cb17354f5396/PubMedCentral/image/org-9-61-g1

[Abbildung 6] ' siehe [Nigg, 2002], Box 3 Grafik übernommen, Bezeichnungen auf Deutsch selbst eingefügt.

[Abbildung 7] "Phasen des Zentrosomenzyklus" Bilder persönlich mittels Fluoreszenzmikroskopie aufgenommen und anschliessend in Photoshop bearbeitet. Grafik wurde selbst in Illustrator erstellt. [Abbildung 8] "wichtigste Duplikationsfaktoren"

Abbildung mit Illustrator erstellt, basierend auf [Arquint et Nigg, 2016], Abb. 3A und [Kleylein-Sohn, 2007], Abb. 7

[Abbildung 9] "Zentriolenamplifikation"

Bilder persönlich mittels Fluoreszenzmikroskopie aufgenommen und anschliessend in Photoshop bearbeitet. Grafik wurde selbst in Illustrator erstellt.

[Abbildung 10] "Bipolare und Multipolare mitotische Spindeln"

Bilder persönlich mittels Fluoreszenzmikroskopie aufgenommen und anschliessend in Photoshop bearbeitet. Grafik wurde selbst in Illustrator erstellt.

[Abbildung 11] "Steriler Arbeitsplatz"

Labor im Biozentrum Basel, Klingelbergstr. 70. Fotografie persönlich mit Handykamera aufgenommen. Aus dem Experiment "Titration von PLK4".

[Abbildung 12] "Verwendete 6-Well Platte"

Labor im Biozentrum Basel, Klingelbergstr. 70. Fotografie persönlich mit Handykamera aufgenommen. Aus dem Experiment "Titration von PLK4".

[Abbildung 13] "Doxycyclin und Thymidin Stock"

Labor im Biozentrum Basel, Klingelbergstr. 70. Fotografie persönlich mit Handykamera aufgenommen. Aus dem Experiment "Titration von PLK4".

[Abbildung 14] "Induzierte und arretierte Zellkultur im Inkubator" Labor im Biozentrum Basel, Klingelbergstr. 70. Fotografie persönlich mit Handykamera aufgenommen. Aus dem Experiment "Titration von PLK4".

[Abbildung 15] "Arbeitsplatz für nicht sterile Arbeiten"

Labor im Biozentrum Basel, Klingelbergstr. 70. Fotografie persönlich mit Handykamera aufgenommen. Aus dem Experiment "Titration von PLK4".

[Abbildung 16] "3 Experimente in 6-Well Platten"

Labor im Biozentrum Basel, Klingelbergstr. 70. Fotografie persönlich mit Handykamera aufgenommen. Aus dem Experiment "Titration von PLK4". [Abbildung 17] "Inkubation mit Antikörperlösung"

Labor im Biozentrum Basel, Klingelbergstr. 70. Fotografie persönlich mit Handykamera aufgenommen. Aus dem Experiment "Titration von PLK4".

[Abbildung 18] "Zugedeckte Inkubation"

Labor im Biozentrum Basel, Klingelbergstr. 70. Fotografie persönlich mit Handykamera aufgenommen. Aus dem Experiment "Titration von PLK4".

[Abbildung 19] "Objektträger mit PPD"

Labor im Biozentrum Basel, Klingelbergstr. 70. Fotografie persönlich mit Handykamera aufgenommen. Aus dem Experiment "Titration von PLK4".

[Abbildung 20] "Verwendetes Gel"

Labor im Biozentrum Basel, Klingelbergstr. 70. Fotografie persönlich mit Handykamera aufgenommen. Aus dem Experiment "Western Blot von myc-PLK4".

[Abbildung 21] "Vorrichtung zu SDS-PAGE"

Labor im Biozentrum Basel, Klingelbergstr. 70. Fotografie persönlich mit Handykamera aufgenommen. Aus dem Experiment "Western Blot von myc-PLK4".

[Abbildung 22] "Aufbau des Western Blottings"

Labor im Biozentrum Basel, Klingelbergstr. 70. Fotografie persönlich mit Handykamera aufgenommen, Erklärungen mit Word eingefügt. Aus dem Experiment "Western Blot von myc-PLK4".

[Abbildung 23] "Gerät zur Durchführung des Western Blot Transfers" Labor im Biozentrum Basel, Klingelbergstr. 70. Fotografie persönlich mit Handykamera aufgenommen. Aus dem Experiment "Western Blot von myc-PLK4".

[Abbildung 24] "Blockieren der Nitrocellulose Membran in 5% Milch" Labor im Biozentrum Basel, Klingelbergstr. 70. Fotografie persönlich mit Handykamera aufgenommen. Aus dem Experiment "Western Blot von myc-PLK4". [Abbildung 25] "Zerschnittene Nitrocellulose Membranen"

Labor im Biozentrum Basel, Klingelbergstr. 70. Fotografie persönlich mit Handykamera aufgenommen. Aus dem Experiment "Western Blot von myc-PLK4".

[Abbildung 26] "Inkubation mit Antikörpern"

Labor im Biozentrum Basel, Klingelbergstr. 70. Fotografie persönlich mit Handykamera aufgenommen. Aus dem Experiment "Western Blot von myc-PLK4".

[Abbildung 27] "unterschiedene Zentriolenmuster"

Bilder persönlich mittels Fluoreszenzmikroskopie aufgenommen und anschliessend in Photoshop bearbeitet. Grafik wurde selbst in Illustrator erstellt.

[Abbildung 28] "Experiment 1,2 und 3, Zentriolenanzahl" Auszählung der Zentriolen mit dem Fluoreszenzmikroskop. Grafik selbst in Excel erstellt.

[Abbildung 29] "Anteil amplifizierter Zellen" Auszählung der Zentriolen mit dem Fluoreszenzmikroskop. Grafik selbst in Excel erstellt.

[Abbildung 30] "Westernblotanalyse von myc-PLK4" Chemilumineszenzdetektion von myc-PLK4

[Abbildung 31] "Massenspektrometrie Resultate PLK4" Auswertung der massenspektrometrischen Analyse. Grafik selbst in Excel erstellt.

[Abbildung 32] "Massenspektrometrie Resultate, erhöhte PLK4 Konzentration" Auswertung der massenspektrometrischen Analyse. Grafik selbst in Excel erstellt.

[Abbildung 33] "Anteil amplifizierter Zellen" Analog zu Abb. 29. Grafik selbst in Excel erstellt.

[Abbildung 34] "Experiment 2"Entspricht Experiment 2 aus Abb. 30. Aufgenommen mit Chemilumineszenzdetektor.Grafik selbst in Illustrator erstellt.

[Abbildung 35] "Zusammenhang PLK4 Konzentration und Flower Amplifikationen" Zusammengestetzte Daten aus Abb. 28 und 32. Grafik selbst in Excel erstellt.

[Tabelle 1] "6-Well Platte mit Angaben zur Doxycyclinkonzentration und den zu pipettierenden Volumen" Volumen wurden mit C. Arquint festgelegt, Tabelle erstellt in LaTeX

[Tabelle 2] " μ L Probe zum laden von 50 μ L Gel pro Tasche" Tabelle wurde von C. Arquint berechnet und erstellt

[Tabelle 3] "6-Well Platte mit Angaben zur Doxycyclinkonzentration und den zu pipettierenden Volumen" Volumen wurden mit C. Arquint festgelegt, Tabelle erstellt in LaTeX

[Tabelle 4] "Relative erhöhte PLK4 Konzentration und relative Menge der Zellen mit Flower Amplifikation" relative erhöhte PLK4 Konzentration in Excel berechnet. Tabelle erstellt in LaTeX

Titration von PLK4 zur Bestimmung der Toleranzgrenze

	< 2 Zentriolen	2-4 Zentriolen	>4Zentriolen zerstreut	>4Zentriolen Flower
A 0 ng/mL Dox	4	76	18	2
B 0.05 ng/mL Dox	3	72	24	1
C 0.1 ng/mL Dox	2	63	28	7
D 0.5 ng/mL Dox	1	40	28	31
E 1 ng/mL Dox	1	36	19	44
F 10 ng/mL Dox	1	38	20	41

Tabelle 5: Auszählung Experiment 1

Tabelle 6: Auszählung Expe	riment 2
----------------------------	----------

	< 2 Zentriolen	2-4 Zentriolen	>4Zentriolen zerstreut	>4Zentriolen Flower
A 0 ng/mL Dox	6	80	13	1
B 0.05 ng/mL Dox	4	70	25	1
C 0.1 ng/mL Dox	4	70	25	1
D 0.5 ng/mL Dox	1	43	27	29
E 1 ng/mL Dox	3	39	17	41
F 10 ng/mL Dox	1	37	19	43

	< 2 Zentriolen	2-4 Zentriolen	>4Zentriolen zerstreut	>4Zentriolen Flower
A 0 ng/mL Dox	4	78	17	1
B 0.05 ng/mL Dox	3	75	21	1
C 0.1 ng/mL Dox	0	71	22	7
D 0.5 ng/mL Dox	0	47	24	29
E 1 ng/mL Dox	4	49	18	29
F 10 ng/mL Dox	2	42	20	36
	< 2 Zentriolen	2-4 Zentriolen	>4Zentriolen zerstreut	>4Zentriolen Flower
---------------------	----------------	----------------	------------------------	---------------------
A 0 ng/mL Dox	4.67	78	16	1.33
B 0.05 ng/mL Dox	3.33	72.33	23.33	1
C 0.1 ng/mL Dox	2	68.33	25.33	4.33
D 0.5 ng/mL Dox	0.67	43.33	26.33	29.67
E 1 ng/mL Dox	2.67	41.33	18	38
F 10 ng/mL Dox	1.33	39	19.67	40

Massenspektrometrische Messungen

	relative PLK4 Konzentration	
A 0 ng/mL Dox	1	
B 0.05 ng/mL Dox	0.99	
C 0.1 ng/mL Dox	1.21	
D 0.5 ng/mL Dox	9.82	
E 1 ng/mL Dox	18.45	
F 10 ng/mL Dox	25.33	

Tabelle 9: Relative PLK4 Menge im Verhältnis zu Kondition A