

**Aus dem Rudolf-Virchow-Zentrum für experimentelle Biomedizin
der Universität Würzburg**

Leiterin und Leiter:

Professorin Dr. Caroline Kisker und

Professor Dr. Bernhard Nieswandt

Erforschung des Schicksals des Mittelkörpers anhand der ZF1-Methode

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Michaela Geisenhof, geb. Trinkwalder

aus Rettenbach am Auerberg

Würzburg, März 2019

Referentin: Professorin Dr. Antje Gohla
Koreferentin: Privat-Dozentin Dr. Heike Hermanns
Dekan: Professor Dr. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 24.05.2019

Die Promovendin ist Ärztin.

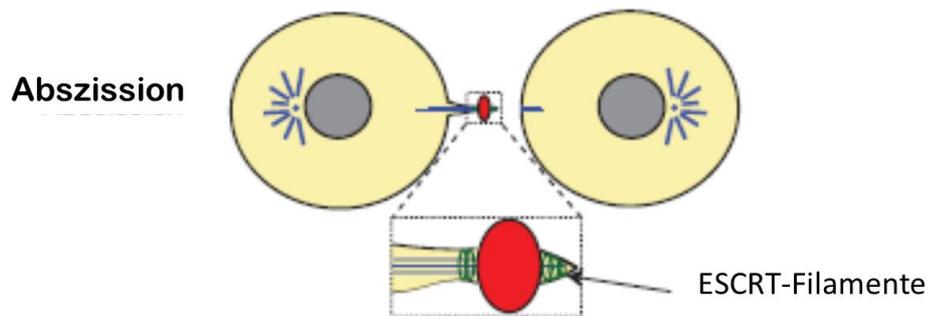
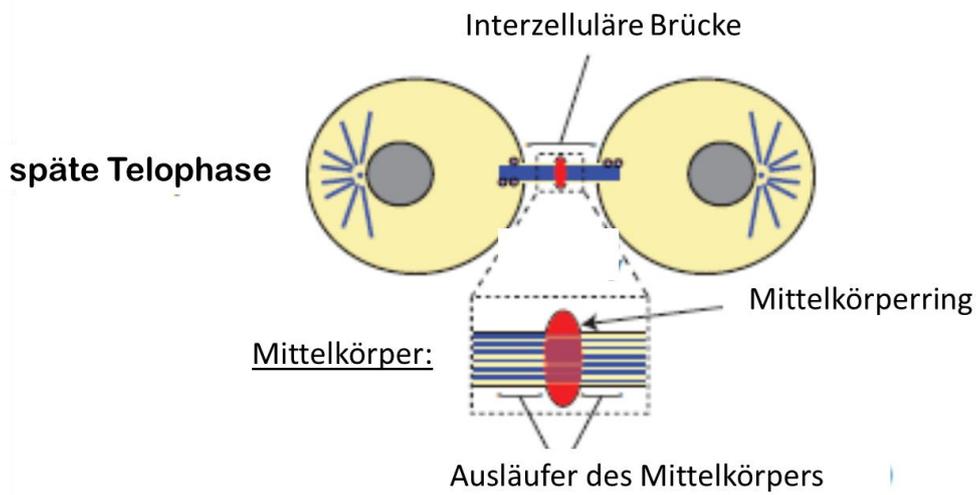
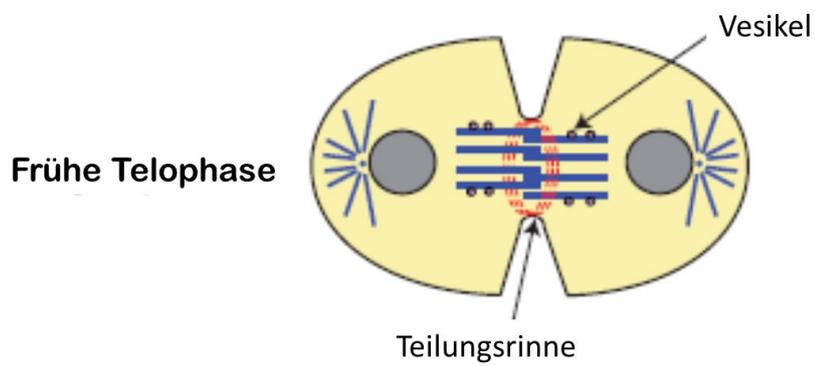
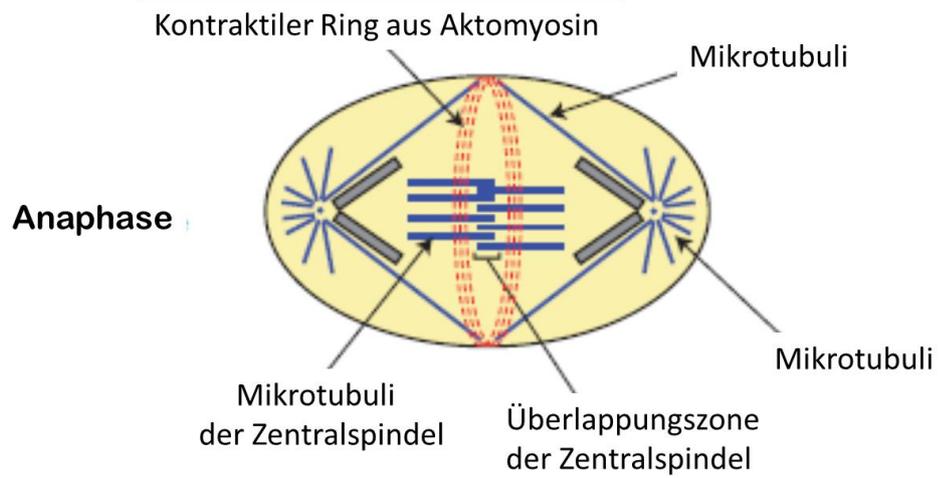
1. EINLEITUNG	1
1.1. ZELLTEILUNG UND DER MITTELKÖRPER	1
1.2. ENTSTEHUNG DES MITTELKÖRPERS WÄHREND DER ABSZISSION	3
1.3. <i>C. ELEGANS</i> ALS MODEL FÜR BESTIMMUNG DES SCHICKSALS DES MITTELKÖRPERRESTS	5
2. MATERIAL UND METHODEN	14
2.1. CAENORHABDITIS ELEGANS	14
2.2. ZEITRAFFER-MIKROSKOPIE	14
2.3. COMPUTERGESTÜTZTE AUSWERTUNG	15
2.3.1. ZELLTEILUNGS-ANALYSEN	15
2.3.2. MESSUNG DER INTERNEN KONTROLLE (ERSTER POLKÖRPER BZW. ZYTOPLASMA)	18
2.3.3. MESSUNG VON NMY-2	19
2.3.4. MESSUNG VON AKTIN DURCH LIFEACT	20
2.4. NORMIERUNG DER DATEN	21
3. ERGEBNISSE	23
3.1. ÜBERPRÜFUNG DER ZF1-REPORTER-LINIE/ ETABLIERUNG DER KONTROLL-LINIE	23
3.1.1. ZELLZYKLUSZEIT	24
3.1.2. STEREOTYPER ZEITLICHER ABLAUF DER ZELLULÄREN AUFNAHME DER MITTELKÖRPER	26
3.1.3. FESTES MUSTER DER INTERNALISIERENDEN ZELLE	27
3.2. ENTWICKLUNG DER ZF1-ANALYSE	29
3.3. NACHWEIS DER VOLLSTÄNDIGEN TRENNUNG DER IZB MITTELS PHAGOZYTÖSE-MUTANTEN	35
3.4. BESTÄTIGUNG DER ROLLE VON PHAGOZYTÖSE MIT AKTIN	41
3.6. BEDEUTUNG VON AUTOPHAGIE BEIM ABBAU VON MITTELKÖRPERN	54
4. DISKUSSION	64
5. ZUSAMMENFASSUNG	69
6. LITERATUR- UND ABBILDUNGSVERZEICHNIS	70

1. Einleitung

1.1. Zellteilung und der Mittelkörper

Die Zytokinese stellt den letzten Schritt der mitotischen Teilung einer Zelle dar. Dabei werden sowohl das Genom als auch die Zellbestandteile zwischen zwei Tochterzellen aufgeteilt. Zunächst wird in der Anaphase eine Zellteilungsebene gebildet und die Trennung der Chromosomen erfolgt. Durch Zusammenziehen eines kontraktiven Ringes aus Aktin und Myosin wird im Anschluss die Form der Zelle verändert. (Chen, Ettinger et al. 2013, D'Avino, Giansanti et al. 2015) Dieser Vorgang (Abbildung 1) erfordert ein fein aufeinander abgestimmtes Zusammenspiel aus Mikrotubuli des mitotischen Spindelapparates, dem Zytoskelett aus Aktin und Myosin sowie Geschehnissen an der Zellmembran (D'Avino, Giansanti et al. 2015). Der Spindelapparat koordiniert hierbei den Zusammenzug des kontraktiven Ringes am Äquator der Zelle sowie die Teilung der Chromosomen. Dort schnürt der kontraktile Ring aus Aktin und Myosin die Plasmamembran sowie darin befindliche Mikrotubuli zusammen, was dann als interzelluläre Brücke (IZB) bezeichnet wird. Deren Trennung - auch Abszission genannt - resultiert in zwei Tochterzellen und stellt den letzten Schritt der Zytokinese dar. (Schiel and Prekeris 2010)

Abbildung 1: schematisierte Darstellung der verschiedenen Stadien der Zellteilung in tierischen Zellen: Mikrotubuli sind in blau dargestellt, der kontraktile Ring aus Aktomyosin sowie der Mittelkörper sind in rot dargestellt; der Ablauf der Zytokinese kann die Entstehung des Mittelkörpers betreffend grob in drei Stadien unterteilt werden: Antiparallele Mikrotubuli überlappen am Äquator der Zelle (erstes Bild). Die Zellmembran wird zunehmend durch den kontraktiven Ring eingeschnürt (zweites Bild), wobei die interzelluläre Brücke mit dem Mittelkörper gebildet wird (drittes Bild). Schließlich erfolgt die Trennung der beiden Tochterzellen (viertes Bild). (D'Avino, Giansanti et al. 2015); Nachdruck mit freundlicher Genehmigung des Elsevier Verlags, Copyright 2015



1.2. Entstehung des Mittelkörpers während der Abszission

Der Mittelkörper ist eine proteinreiche Struktur, die vorübergehend vorkommt und während der Zellteilung in tierischen Zellen gebildet wird. Er entsteht am Ende der Anaphase der Mitose aus der Zentralspindel und dem Mittelkörperring. Bei der ringförmigen Einschnürung der Zellmembran am Äquator, die zur Bildung der IZB und zur Aufteilung der Zellbestandteile führt, werden die sich überlappenden antiparallelen Mikrotubuli aus den beiden gegenüberliegenden Spindelapparaten dicht zusammengepresst (Abbildung 2). Durch Zusammenschnürung des kontraktilen Mittelkörperringes und der Zentralspindel entsteht der Mittelkörper als elektronendichte Struktur. Am Ende der Mitose koordiniert der Mittelkörper die Loslösung der beiden Tochterzellen voneinander in einem noch wenig verstandenen Vorgang der Abzission und spielt somit eine wichtige Rolle bei der Teilung von tierischen Zellen. Nach Beendigung der Zellteilung wird vom post-mitotischen Mittelkörperrest gesprochen. (Paweletz 1967, Mullins and McIntosh 1982, Glotzer 2001, Guizetti and Gerlich 2010, Green, Paluch et al. 2012)

Erstmals in der wissenschaftlichen Literatur erwähnt wird der Mittelkörper im Jahre 1891 durch Walther Flemming. Dieser beschrieb als erster eine Struktur, die sich zwischen teilenden Tochterzellen befindet und nannte sie Zwischenkörper. Zunächst waren die Bezeichnungen Flemming-Körper und Zwischenkörper gängig, mittlerweile wird ausschließlich der Name Mittelkörper verwendet. Unter Nutzung von Lichtmikroskopie und histochemischen Färbungen formulierte er die Hypothese, dass es sich um einen Abkömmling des mittleren Bereichs des Spindelapparates handle. Zudem schlug er vor, dass der Zwischenkörper das tierische Pendant zum Phragmoplasten in Pflanzen sein könnte. Dieser ist als Mikrotubuli-reiche Struktur an der pflanzlichen Zytokinese beteiligt. In den 1960er und 1970er Jahren gelang erstmals die elektronenmikroskopische Darstellung des Mittelkörpers (Paweletz 1967). Ein Großteil von Walther Flemmings Hypothesen konnte daraufhin in den vergangenen Jahrzehnten unter



Abbildung 2: erste elektronenmikroskopische Darstellung des Mittelkörpers 1967 durch N. Paweletz. Das Zytoplasma ist ringförmig eingeschnürt (Pfeile), in der interzellulären Zytoplasmabrücke befindet sich neben Spindelfasern der proteinreiche Mittelkörper (Bildmitte, dunkel); Nachdruck mit freundlicher Genehmigung durch Springer Nature im Namen von Cancer Research UK: Springer Nature, Naturwissenschaften, (Paweletz 1967); Copyright 1967

Anwendung von histochemischen Färbungen und Elektronenmikroskopie bestätigt werden. (Flemming 1891, Buck and Tisdale 1962, Paweletz 1967, Chen, Ettinger et al. 2013)

Der Mittelkörper besteht aus verschiedenen Untereinheiten: Einerseits dem zentralen Teil oder Mittelkörper-Kern (Hu, Coughlin et al. 2012), welcher gebündelte Mikrotubuli sowie den Bündelungsfaktor PRC1, Zentralspindelin (MKLP1) und

Kinesin KIF4 umfasst. Andererseits dem Mittelkörper-Ring, welcher das Zentrum umringt und andere Proteine der Teilungsrinne (Aktin, Anillin, RhoA, Centriolin) beinhaltet sowie Zentralspindelin und zahlreiche weitere Faktoren. (Pohl and Jentsch 2008, Pohl 2017)

Durch Zeitraffer-Mikroskopie von Modellorganismen *in vivo* sowie biochemische Verfahren ist eine nähere Betrachtung des Mittelkörpers seit einigen Jahrzehnten möglich. Aufgrund eines zunehmenden Verständnisses seiner Bedeutung ist der Mittelkörper derzeit Gegenstand intensiver Forschungen. Vielerlei Funktionen des Mittelkörpers sind in den vergangenen Jahren entdeckt worden. Möglicherweise dient der Mittelkörper während der Abszission auch als Verankerung oder Fixierung an der IZB, hierbei wird eine Interaktion mit dem ESCRT („endosomal sorting complex required for transport“) angenommen (Elia, Sougrat et al. 2011).

Nach stattgefundener Trennung der Tochterzellen formen sich der Mittelkörperkern und der –ring zum sogenannten Mittelkörperrest um. Es ist noch nicht im Detail verstanden, was mit dem Mittelkörperrest am Ende der Zellteilung nach dem Bruch der IZB geschieht. Eine der großen noch

ungeklärten Fragen im Zusammenhang mit der Rolle des Mittelkörpers rund um die Zytokinese ist, wie genau die Trennung der IZB stattfindet, in welcher sich der Mittelkörper befindet. Auch über die genauen Mechanismen des Abbaus des Mittelkörperrests ist derzeit noch wenig bekannt. Gegenwärtig werden verschiedene Hypothesen diskutiert, was mit dem Mittelkörper während sowie nach Abtrennung der interzellulären Brücke geschieht. Mit diesen Fragen beschäftige ich mich in der vorliegenden Arbeit.

Die Trennung der beiden Tochterzellen könnte auf einer Seite des Mittelkörpers erfolgen, woraufhin dieser auf der anderen Seite von der noch verbundenen Zelle in das Zytoplasma zurückgeholt werden kann (Abbildung 3). Diese asymmetrische Durchtrennung der IZB wurde von Pohl und Jentsch (2008, 2009) sowie Kuo, Chen et al. (2011) und Green, Mayers et al. (2013) *in vitro* bei HeLa Zellen sowie *in vivo* bei *C. elegans* Embryonen nachgewiesen. Die Trennung von zwei Tochterzellen am Ende der Zytokinese erfolgt häufig auf asymmetrische Art und Weise, was sich in einer ungleichen Verteilung der Zellbestandteile, verschiedenen Funktionen sowie unterschiedlicher Größe der Tochterzellen äußern kann und stellt einen wichtigen Mechanismus zum Erhalt der Homöostase dar (nachgelesen bei (Pohl 2017)).

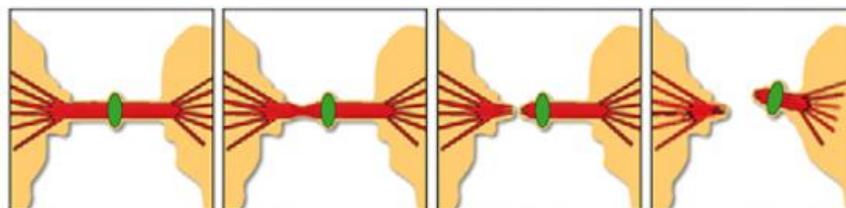


Abbildung 3: asymmetrische Abszission: Der Mittelkörper (grün) befindet sich in der IZB, die unter anderem aus Mikrotubuli (rot) besteht. Durch Trennung der IZB auf nur einer Seite des Mittelkörpers erfolgt die Loslösung der Tochterzellen voneinander (von links nach rechts) und der post-mitotische Mittelkörper bleibt mit einer Tochterzelle verbunden (Crowell, Gaffuri et al. 2014). Nachdruck mit freundlicher Genehmigung durch Company of Biologists LTD.: Journal of cell science, Crowell, E. F., A. L. Gaffuri, Copyright 2014

Alternativ könnte die Trennung der Tochterzellen aufeinanderfolgend zu beiden Seiten des Mittelkörpers an der IZB erfolgen (Abbildung 4), woraufhin die Mittelkörper in den extrazellulären Raum abgegeben werden (Dubreuil, Marzesco et al. 2007, Ettinger, Wilsch-Brauninger et al. 2011). Dies wird gestützt durch elektronenmikroskopische Daten, die eine Ausdünnung der IZB zu beiden Seiten des Mittelkörpers mit nachfolgender Abtrennung zeigen (Elia, Sougrat et al. 2011). Zudem konnten Ettinger, Wilsch-Brauninger et al. (2011) *in vivo* in Liquoruntersuchungen bei Mäusen neuronale Mittelkörper nachweisen, passend zu einer extrazellulären Abgabe des Mittelkörpers nach beidseitiger Durchtrennung der IZB. Auch Daten bei Zellen in Kultur mittels Zeitraffermikroskopie stützen diese Hypothese (Guizetti, Schermelleh et al. 2011).

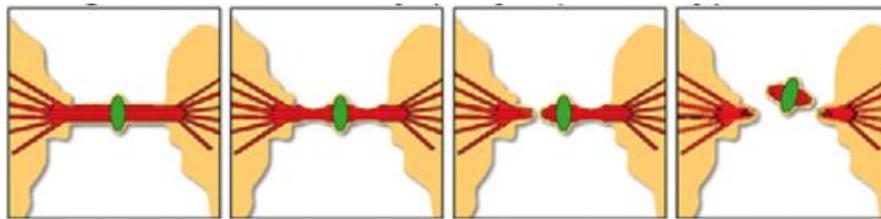


Abbildung 4: symmetrische Abszission: Die IZB, die unter anderem aus Mikrotubuli (rot) besteht, wird zu beiden Seiten des Mittelkörpers (grün) abgetrennt und führt zur Loslösung der Tochterzellen voneinander (von links nach rechts), woraufhin der Mittelkörper nach extrazellulär abgegeben wird; Nachdruck mit freundlicher Genehmigung durch Company of Biologists LTD.: Journal of cell science, (Crowell, Gaffuri et al. 2014), Copyright 2014

Ob ein post-mitotischer Mittelkörper in eine Tochterzelle zurückgeholt wird, nach extrazellulär abgegeben oder intrazellulär abgebaut wird scheint zudem von der Art und dem Zustand der Zelle abzuhängen und ist wahrscheinlich stark reguliert (Pohl and Jentsch 2009, Ettinger, Wilsch-Brauninger et al. 2011, Kuo, Chen et al. 2011). Zudem wird die Bedeutung des Mittelkörperrests in der Differenzierung von Zellen zu Stammzellen oder differenzierten Zellen diskutiert. *In vivo* und *in vitro* wurde eine selektive Anreicherung des Mittelkörperrests in Stammzellen, induzierten pluripotenten Zellen sowie Stammzellen mit Potential zur Entartung beobachtet (Kuo, Chen et al. 2011, Ou, Gentili et al. 2014). Es besteht eine Korrelation zwischen Internalisierungen von post-mitotischen Mittelkörperresten und Pluripotenz sowie der Abgabe von post-mitotischen

Mittelkörperresten mit Differenzierung der Zelle (Pohl and Jentsch 2009, Ettinger, Wilsch-Brauninger et al. 2011). Zudem verstärkt eine Anhäufung von Mittelkörperresten in der Zelle die Umprogrammierung zu induzierten pluripotenten Stammzellen und erhöht *in vitro* die Karzinogenizität von Tumorzellen (Kuo, Chen et al. 2011). Hierbei scheint der Vorgang der Autophagie eine Rolle zu spielen. Kuo, Chen et al. (2011) bemerkten, dass differenzierte Zellen und Zellen, die sich normal teilen, keine Mittelkörperreste akkumulieren und gleichzeitig eine hohe Aktivität an Autophagie aufweisen. Stammzellen und Krebszellen hingegen häufen Mittelkörperreste an und zeigen eine niedrige Aktivität an Autophagie, indem sie die Abkapselung des Autophagosoms verhindern. Auch der physiologische Zustand einer Zelle hat Einfluss auf die Internalisierung bzw. die Abgabe von Mittelkörperresten, zudem können externe Signale die Aufnahmebereitschaft beeinflussen (Crowell, Gaffuri et al. 2014). Des Weiteren scheint der Mittelkörperrest Auswirkungen auf die Polarität von Zellen zu haben (Singh and Pohl 2014), sowie auf das Zytoskelett und die Orientierung des Spindelapparates (Pohl 2017). Klinisch von Bedeutung ist der beobachtete Zusammenhang zwischen fehlerhaftem Abbau des Mittelkörperrests und einer daraus resultierenden zellulären Akkumulation, mit lysosomalen Speicherkrankheiten beim Menschen, auch gibt es Hinweise für eine Bedeutung des Mittelkörperrests bei der Entstehung von Autoimmunerkrankungen oder Tumoren (Pohl and Jentsch 2009). Im Gegensatz zu früheren Vermutungen scheint der post-mitotische Mittelkörper weit bedeutender zu sein als nur ein Überrest oder Zellabfall. Aufgrund der beschriebenen vielfältigen, teilweise signalgebenden Funktionen während und nach der Zellteilung erscheint sein sorgfältig regulierter Abbauprozess sinnvoll (Chen, Ettinger et al. 2013). Derzeit werden für tierische Zellen hauptsächlich zwei verschiedene Möglichkeiten diskutiert, auf welche Weise der Mittelkörperrest in Zellen gelangen kann: Makroautophagie oder Freisetzung (Schiel, Childs et al. 2013).

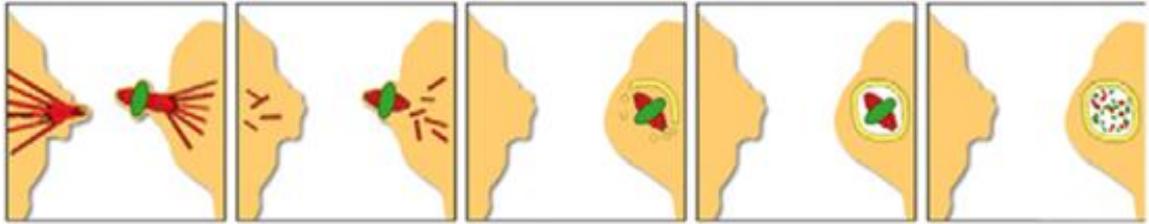


Abbildung 5: Makroautophagie des Mittelkörpers: Autophagie ist ein mehrstufiger Vorgang, bei dem größere Partikel sowie alte und funktionsuntüchtige Organellen in der Zelle in Autophagosomen – Vesikel mit Doppelmembran – separiert werden und schließlich lysosomal abgebaut werden (Lai and Devenish 2012). Nachdruck mit freundlicher Genehmigung durch Company of Biologists LTD.: Journal of cell science, (Crowell, E. F., A. L. Gaffuri), Copyright 2014

Im Falle des Abbaus über Makro-Autophagie (im Folgenden vereinfacht als Autophagie bezeichnet) (Abbildung 5) wäre nach einer einseitigen Abtrennung der IZB ein Zurückziehen des Mittelkörperrests in die noch mit ihm verbundene Zelle zu erwarten. Häufig wird dieser Abbauweg zur Entsorgung größerer Partikel sowie alter und funktionsuntüchtiger Organellen genutzt. Der Vorgang der Autophagie läuft mehrstufig ab, mehr als 30 Autophagie-assoziierte Proteine (Atg) sind daran beteiligt. Der zu entsorgende Partikel wird in der Zelle separiert und zunehmend von der Doppelmembran des Autophagosoms umschlossen, wofür unter anderem die Klasse III Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K) benötigt wird. Das mit Mikrotubuli assoziierte Protein LC3 (light-chain 3) gilt als ein Schlüsselprotein der Autophagie und ist entlang der Doppelmembran des Autophagosoms zu finden. LC3 wirkt bei der Isolierung der Partikel mit, die für den Abbau im Lysosom vorgesehen sind. (Lai and Devenish 2012) Atg8/LC3 ist am Abbau von Mittelkörpern beteiligt, ebenso wie andere Proteine, die mit Autophagie in Verbindung gebracht werden, wie Untereinheiten der PI3K, inklusive VPS34 sowie Beclin1. Pohl und Jentsch (2008, 2009) sowie Kuo, Chen et al. (2011) beobachteten typische Marker für das Autophagosom um internalisierte Mittelkörperreste, wie beispielsweise Proteine aus der Atg8/LC3 Familie. (Pohl and Jentsch 2009, Kuo, Chen et al. 2011, Isakson, Lystad et al. 2013). Bei Annahme des Mittelkörperabbaus durch Autophagie bleibt jedoch die Frage offen, wie die

Zelle mit den signalgebenden Funktionen des intrazellulären Mittelkörperrests vor dessen Abkapselung im Autophagosom umgeht.

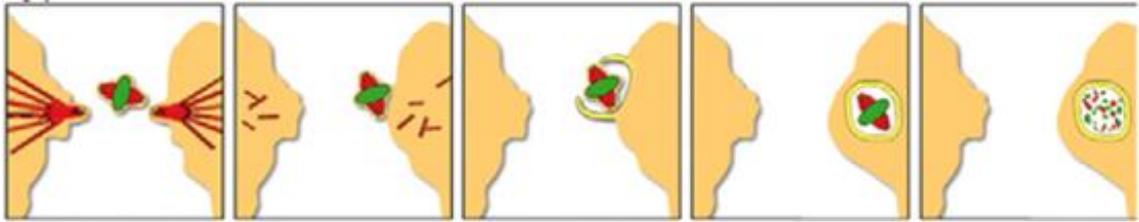


Abbildung 6: Phagozytose des Mittelkörpers: Der Mittelkörperrest (grün) bewirkt über verschiedene Rezeptoren und Signalwege, dass er von einer taschenähnlichen Vorwölbung der Zellmembran einer der Tochterzellen umfasst und schließlich einverleibt wird. Nachdruck mit freundlicher Genehmigung durch Company of Biologists LTD.: Journal of cell science, (Crowell, Gaffuri et al. 2014); Copyright 2014

Auch eine Aufnahme des Mittelkörpers in Zellen mit nachfolgendem Abbau durch Phagozytose ist denkbar (Abbildung 6). Der Vorgang der Phagozytose stellt in tierischen Zellen einen wichtigen Mechanismus dar, um Pathogene und Zellfragmente abzubauen. Die Zelle umfasst diese mit einer taschenähnlichen Struktur, die aus polymerisierten Aktinfilamenten aufgebaut ist, unterstützt durch Rac1 (Freeman and Grinstein 2014). Bei Säugetierzellen *in vitro* wurde beobachtet, dass Mittelkörperreste unter Nutzung eines Aktingerüsts durch Phagozytose internalisiert werden (Crowell, Gaffuri et al. 2014). Freigesetzte Mittelkörperreste setzen über Signalwege die Phagozytose in Gang, beispielsweise indem das Lipid Phosphatidylserin (PtdSer) an die äußere Membran verlagert wird (Chai, Tian et al. 2012). Eine Freisetzung des Mittelkörperrests könnte einen wirkungsvollen Mechanismus darstellen, um weitere Einflussmöglichkeiten der Mittelkörperproteine auf das Zytoskelett nach Beendigung der Zellteilung zu verhindern – wobei der extrazellulär gelegene Mittelkörper über Membran-Signalwege auf mehrere Zellen Einfluss nehmen könnte. Anschließend kann der Mittelkörperrest über Rezeptor-vermittelte Phagozytose gewissermaßen sicher von einer Tochterzelle oder einer anderen benachbarten Zelle aufgenommen werden (Abbildung 6), was bei Würmern, Fliegen sowie in Säugetierzellen gezeigt werden konnte (Chai, Tian et al. 2012, Crowell, Gaffuri et al. 2014, Ou, Gentili et al. 2014, Salzmann, Chen et al. 2014). Auf welche Weise der Mittelkörperrest

schließlich in eine Zelle gelangen kann, ist noch nicht im Detail verstanden, möglicherweise erfolgt die über Rac1-betriebene Aktinpolymerisation und Phagozytose (Crowell, Gaffuri et al. 2014, Freeman and Grinstein 2014).

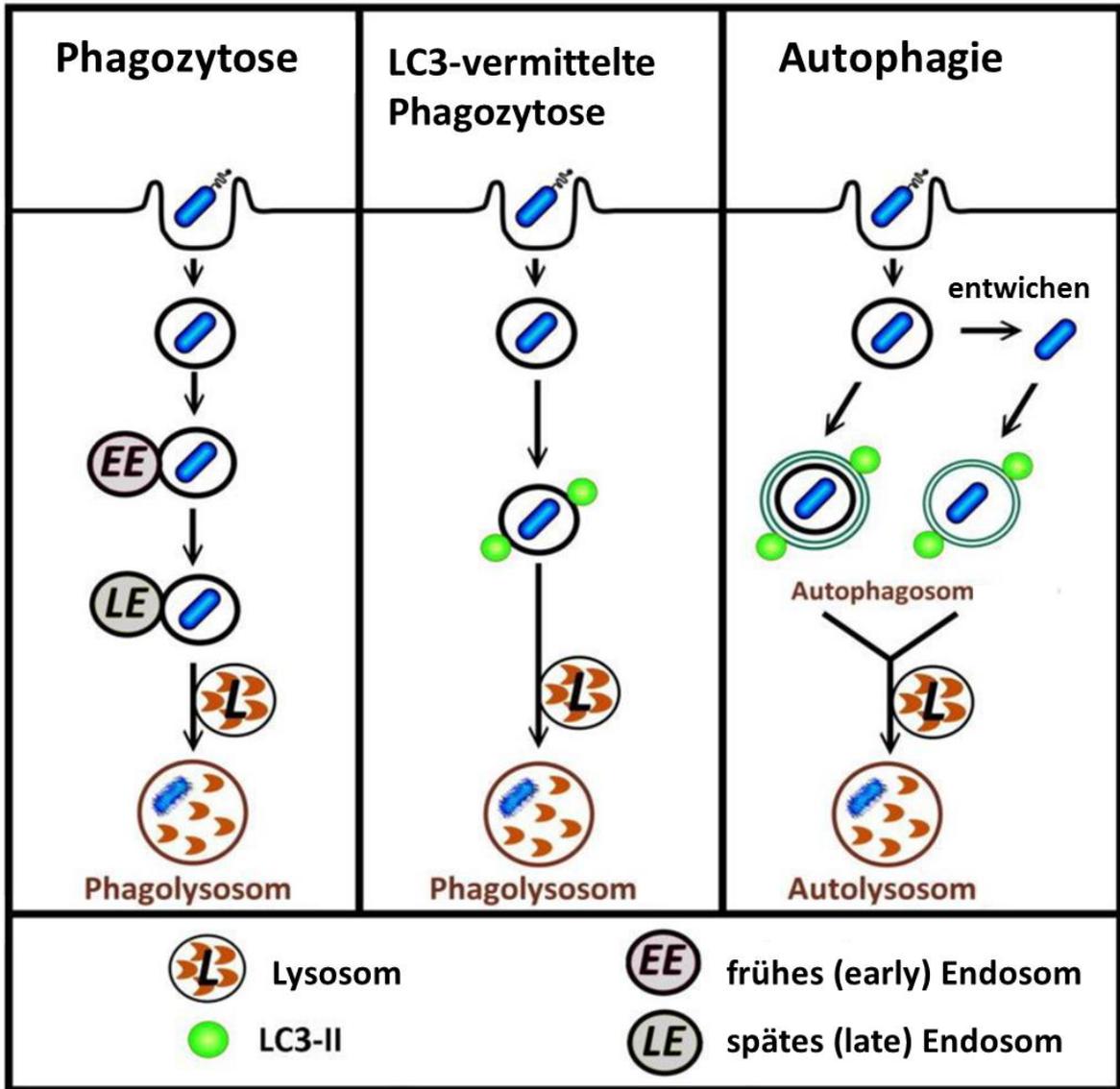


Abbildung 7: Gegenüberstellung von Phagozytose und Autophagie. Zellen müssen permanent eigenen und fremden Detritus entsorgen, hierfür gibt es verschiedene Mechanismen: Phagozytose (linke Spalte), LC3-vermittelte Phagozytose (mittlere Spalte) sowie (Makro-) Autophagie (rechte Spalte). Alle drei Wege führen zu einem lysosomalen Abbau des Partikels. (Lai and Devenish 2012), "LC3-Associated Phagocytosis (LAP): Connections with Host Autophagy." Cells 1, <http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>

Zudem ist seit wenigen Jahren ein Abbaupfad bekannt, der Elemente sowohl aus Autophagie als auch aus Phagozytose enthält: die LC3-vermittelte Phagozytose (LAP) (Abbildung 7, Mitte). LAP nutzt zur Reifung

des Phagosoms das Protein LC3, welches üblicherweise mit Autophagie in Verbindung gebracht wird (Sanjuan, Dillon et al. 2007, Martinez, Almendinger et al. 2011, Kim and Overholtzer 2013). Es ist bekannt, dass LAP unter anderem zur Abwehr von Pathogenen (Sanjuan, Dillon et al. 2007) sowie zum Abbau von Zellbestandteilen genutzt wird (Martinez, Almendinger et al. 2011).

Bisher ist noch nicht geklärt, ob es sich um „einspurige“ Abbauwege handelt und unter welchen Umständen und in welchem Umfang Zellen den einen oder anderen Weg bevorzugen könnten. Meine Auswertungen sollen prüfen, inwiefern Autophagie und/oder Phagozytose beim Abbau von Mittelkörperresten beteiligt sind. Zudem sollen sie Hinweise geben, ob eine Kombination aus beiden Vorgängen den Abbau des Mittelkörperrests vorantreiben könnte, beispielsweise indem Autophagie-Proteine zum Abbau des Mittelkörper-Phagosoms im Lysosom benötigt werden.

1.3. *C. elegans* als Model für Bestimmung des Schicksals des Mittelkörperrests

Als Modellorganismus dient der Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*). *C. elegans* Embryonen sind gerne verwendete physiologische Modelle, insbesondere wird in der Forschung die Ähnlichkeit der zellulären Vorgänge mit denen in menschlichen Zellen geschätzt. Für die Erforschung der Mittelkörper eignen sie sich zudem, da sie eine kurze Zellzykluszeit aufweisen, sowie eine stereotype und gut erforschte und verstandene Entwicklung durchlaufen (Abbildung 8). Transgene können auf verhältnismäßig einfache Art und Weise hergestellt werden, eine hohe Anzahl verschiedener Mutanten sowie anwendbarer RNA-Interferenz (RNAi) ist bekannt.

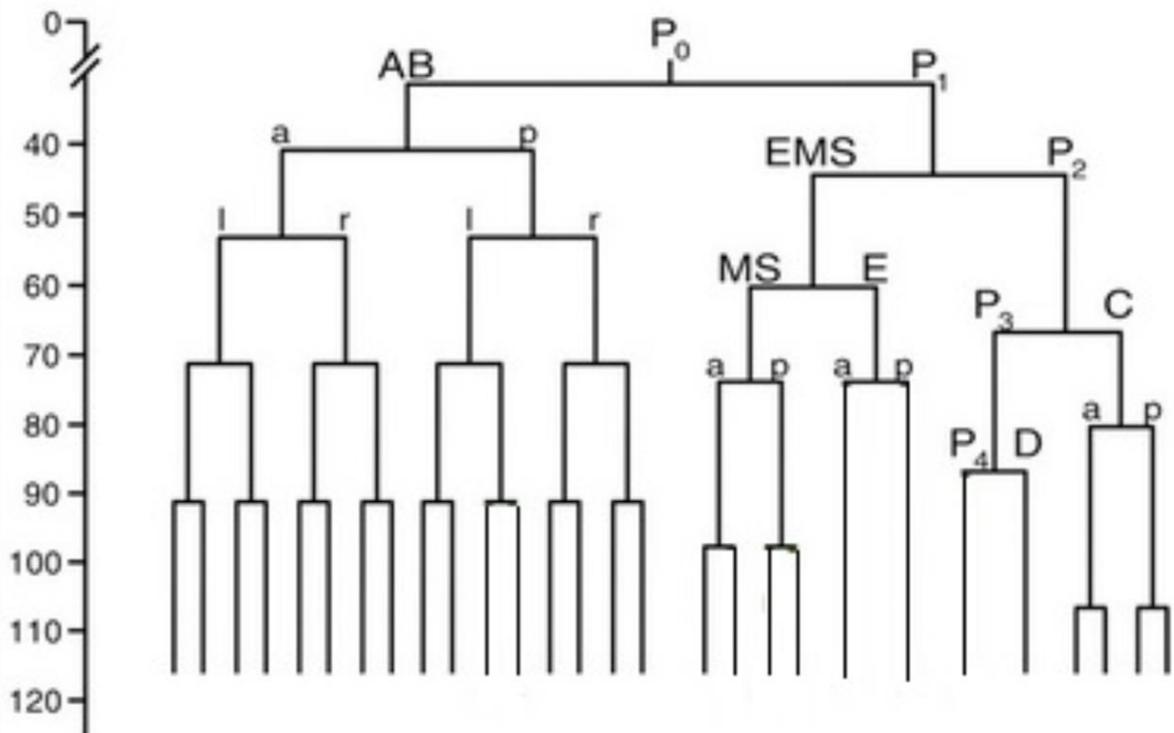


Abbildung 8: Schema der frühen Embryonalentwicklung bei *C. elegans*. Der Embryo hat das 24-Zellstadium bei Raumtemperatur nach 90 Minuten erreicht. AB-Zellen teilen sich synchron und schneller als P-Zellen. Nachdruck aus *Developmental Biology*, (Sulston, Schierenberg et al. 1983), „The embryonic cell lineage of the nematode *Caenorhabditis elegans*“, S. 64 – 119, Vol. 100, Copyright 1983, mit freundlicher Genehmigung des Elsevier Verlags

Die Embryonalentwicklung läuft nach starren Muster ab (Sulston, Schierenberg et al. 1983): aus anfänglich einer einzelnen P₀-Zelle (Zygote) entstehen eine AB-Zelle (anteriore Blastomere) und eine P₁-Zelle (posteriore Blastomere). Aus der AB-Zelle bilden sich eine AB_a- und eine AB_p-Zelle, kurz darauf teilt sich die P₁-Zelle in eine EMS- und P₂-Zelle. Weitere Zellteilungen folgen, jeweils in einer festgelegten Reihenfolge (Abbildung 8). Auch die Zeitabstände zwischen Zellteilungen sind bei *C. elegans* Embryonen interindividuell sehr ähnlich.

Mittelkörper koordinieren das Ende der Zellteilung und die Loslösung der beiden Tochterzellen voneinander (Green, Paluch et al. 2012). In der vorliegenden Arbeit wird das Hauptaugenmerk auf die – in zeitlicher Reihenfolge ihrer Entstehung betrachtet – ersten drei Mittelkörperreste gerichtet. Der P₀ Mittelkörper wird bei der Teilung der P₀-Zelle in die AB-

und P1-Zelle gebildet (Abbildung 9, links, in rot dargestellt). Bei der Teilung der AB-Zelle in eine ABa- und ABp-Zelle entsteht der AB Mittelkörper (Abbildung 9, Mitte, in violett dargestellt). Der P1 Mittelkörper wird bei der Teilung der P1 Zelle in eine EMS- sowie die P2-Zelle gebildet (Abbildung 9, Mitte, in grün dargestellt).

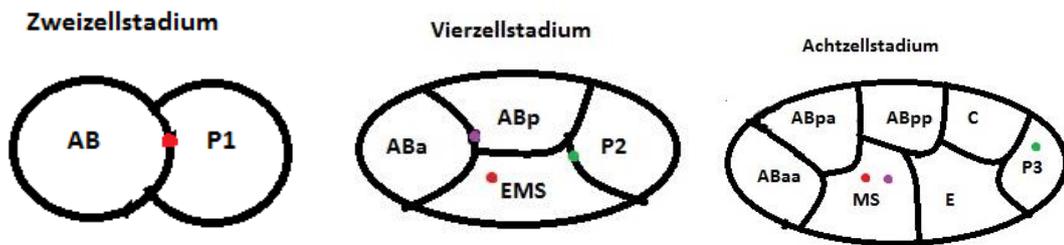


Abbildung 9: schematische Darstellung des Entstehungs- und Internalisierungsverhaltens des P0 (rot), AB (violett) und P1 (grün) Mittelkörpers in einem *C. elegans* Embryo vom Zweizell- bis zum Achtzellstadium: Der P0 Mittelkörperrest wird großteils von der P1 Zelle oder ihrer Tochterzelle EMS aufgenommen, der AB Mittelkörperrest gelangt meist in die EMS Zelle (welche keine Tochterzelle ist), während der P1 Mittelkörperrest in der Regel von der P2 Zelle internalisiert wird. (Ou, Gentili et al. 2014, Salzmann, Chen et al. 2014); veränderter Nachdruck mit freundlicher Genehmigung durch Macmillan Publishers Ltd: Cell research, (Ou, Gentili et al. 2014), Copyright 2014

Die Aufnahme der Mittelkörperreste in Zellen läuft in frühen Embryonalstadien nach einem starren Muster ab: der P0 Mittelkörperrest wird von einer Zelle der EMS-Linie internalisiert, ebenso endet der AB Mittelkörperrest zumeist in der benachbarten EMS-Zelle, wohingegen der P1 Mittelkörperrest von der P2 Zelle aufgenommen wird (Ou, Gentili et al. 2014, Salzmann, Chen et al. 2014). Dass Mittelkörper ein stereotypes, vorhersagbares Verhalten aufweisen und sich nicht zufälligerweise bewegen, unterstreicht die Vermutung nach einer spezifischen Funktion. Aus Abbildung 9 geht hervor, dass Mittelkörperreste nach dem Ende der Zellteilung entweder in eine Tochterzelle (z.B. P0 Mittelkörperrest in EMS-Zelle) oder aber in eine andere benachbarte Zelle (z.B. AB Mittelkörperrest in EMS-Zelle) aufgenommen werden können.

Nachbarzellen, die keine Tochterzellen sind, können post-mitotische Mittelkörper in *C. elegans* und *Drosophila* internalisieren (Salzmann, Chen et al. 2014, Singh and Pohl 2014). Die Tatsache, dass Mittelkörperreste von benachbarten Zellen ohne Beziehung dazu aufgenommen werden können,

impliziert, dass sich der Mittelkörperrest zuvor im extrazellulären Milieu befunden haben muss (Ou, Gentili et al. 2014). Bei Q Neuroblasten bei *C. elegans* wurde beobachtet, dass der Mittelkörperrest nach extrazellulär in den Liquor abgegeben und anschließend von einer Nachbarzelle über Phagozytose aufgenommen und abgebaut wird (Chai, Tian et al. 2012). Möglicherweise wird daher die IZB am Ende der Mitose zu beiden Seiten des Mittelkörpers abgetrennt, woraufhin dieser nach extrazellulär abgegeben wird und anschließend durch Phagozytose von einer Zelle aufgenommen wird.

Phagozytose läuft über einen Signalweg unter anderem über die GTPase CED-10/ RAC1 ab. Diese GTPase induziert die Polymerisierung von Aktin für die Bildung einer tassenähnlichen Struktur, welche dann den Zellkörper einschließt (Hall and Nobes 2000, Chai, Tian et al. 2012, Ou, Gentili et al. 2014). CED-1 und CED-2 sowie das Signalprotein ABI-1 und der Rezeptor PAT-3 regulieren über vier unterschiedliche Signalwege *ced-10* (Abbildung 10) (Neukomm, Zeng et al. 2014). CED-10/RAC1 setzt eine Umstrukturierung des Aktingerüsts in Gang und induziert so die Bildung der tassenförmigen Struktur, die zur Internalisierung von Mittelkörpern und anderen Zellbestandteilen nötig ist (Abbildung 10) (Chai, Tian et al. 2012). Die Umhüllung und nachfolgende Internalisierung des Mittelkörpers bei *C. elegans* von extrazellulär in eine Zelle ist abhängig von dem Rezeptor CED-1 und dem Signalprotein CED-2 (Chai, Tian et al. 2012, Ou, Gentili et al. 2014). CED-1 Rezeptoren sind an der Erkennung von Zellkörpern beteiligt, außerdem geben sie Signale weiter, die die Ummantelung des Zellkörpers sowie die Bildung des Phagosoms betreffen (Chen, Jian et al. 2013). CED-2 ist Bestandteil eines zweiten Rezeptor-vermittelten Signalweges, der über Aktivierung von CED-10 an der Polymerisierung von Aktinfilamenten beteiligt ist, was für die Internalisierung von Mittelkörpern bei *C. elegans* benötigt wird (Reddien and Horvitz 2000). Bei Störungen im CED1- oder CED-2 Signalweg, der bei *C. elegans* wesentlich an der Phagozytose beteiligt ist, ist ein Ausbleiben der Internalisierung von Mittelkörpern zu erwarten.

Das Protein ABI-1 ist ein Regulator des Zytoskeletts und wird bei *C. elegans* zur Ummantelung von apoptotischen Zellkörpern benötigt. ABI-1 agiert parallel zu den beiden Signalwegen mit CED-1 und CED-2 (Abbildung 10) (Hurwitz, Vanderzalm et al. 2009).

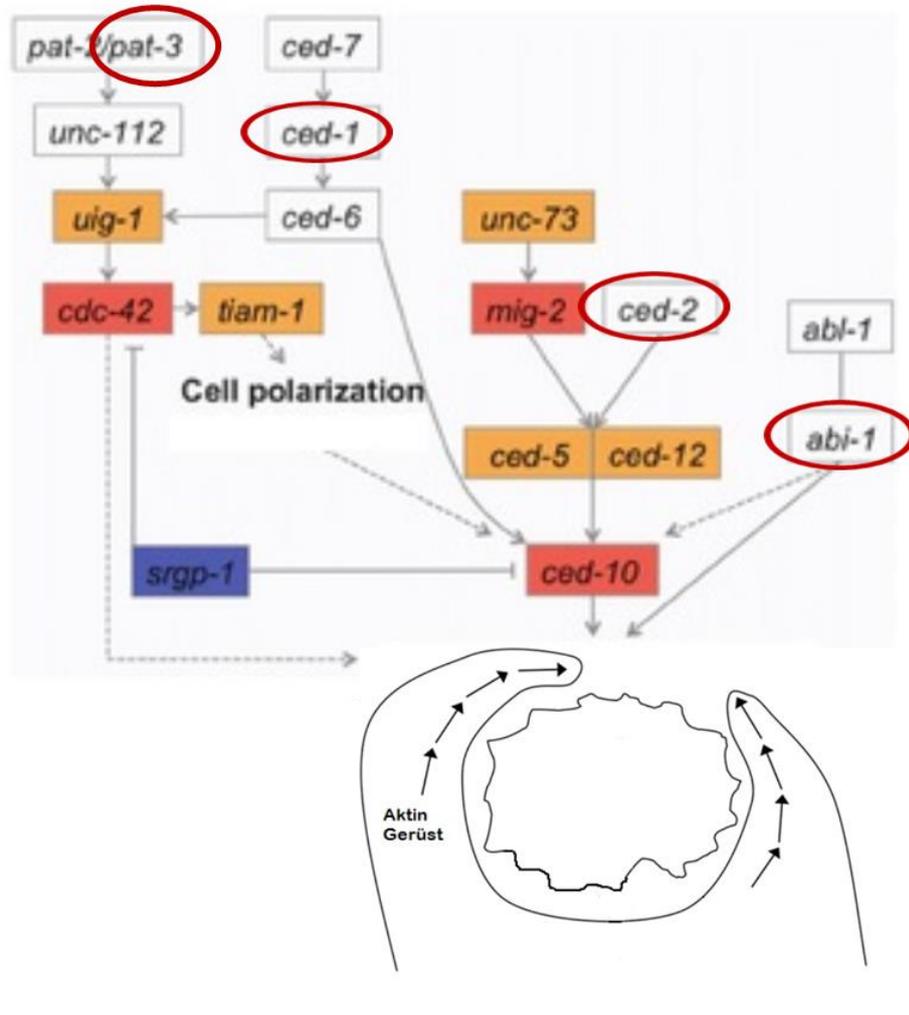


Abbildung 10: Genetisches Modell der Bildung eines Aktingerüsts zur Phagozytose. CED-1, CED-2, ABI-1 sowie PAT-3 (jeweils rot eingekreist) regulieren abhängig und/ oder unabhängig von CED-10 die Bildung einer tassenähnlichen Struktur zur Phagozytose von Zellbestandteilen indem sie Einfluss auf das Aktingerüst nehmen. GTPasen sind in grauen Kästchen dargestellt sowie GTP-Austauschfaktoren in orange und PTPase aktivierende Proteine in blau, gestrichelte Pfeile weisen auf eine mögliche Regulation hin; verändert nach Neukomm, Zeng et al. (2014); <https://www.nature.com/articles/cdd201423>

Bisher ist noch nicht bekannt, ob auch andere Proteine als CED-1, CED-2 und das Rac Homolog CED-10 an der Phagozytose beteiligt sein könnten. Denkbar ist, dass die Asymmetrie der Lipide Phosphatidylserin (PtdSer) und Phosphatidylethanolamin (PtdEth) entlang der Zellmembran Einfluss auf die

Internalisierung von Mittelkörpern haben kann. PtdSer und PtdEth sind auf der Innenseite der Plasmamembran vorzufindende Lipide, deren Asymmetrie entlang der Membran bei *C. elegans* durch TAT-1 (PtdSer) und TAT-5 (PtdEth) gewährleistet wird. Sie sind im Rahmen der Phagozytose von Bedeutung (Emoto, Kobayashi et al. 1996, Darland-Ransom, Wang et al. 2008). Die asymmetrische Verteilung von Phospholipiden entlang der Zytosolseite der Plasmamembran leistet unter anderem einen wichtigen Beitrag zum Erhalt der Integrität der Zelle und sie ist von Bedeutung in der Regulierung intrazellulärer Signalwege.

TAT-1 ist beteiligt an der Regulierung der Einverleibung und des Abbaus von Zellkörpern. Der Lipidtransporter unterbindet das Erscheinen von PtdSer an der äußeren Membran, da PtdSer Zellbestandteile zum Abbau markiert. Bei Embryonen mit mangelhafter Ausprägung von TAT-1 ist eine abnormale Verteilung von PtdSer auf der Zelloberfläche zu sehen. PtdSer kann dort von Rezeptoren erkannt werden, die über CED-1 Phagozytose in Gang setzen können (Fadok, Bratton et al. 1998, Darland-Ransom, Wang et al. 2008). PtdSer stellt ein „Friss-mich“ Signal für freigesetzte Neuronenmittelkörper dar (Chai, Tian et al. 2012), jedoch war noch nicht bekannt, ob es auch bei Embryonenmittelkörpern eine Rolle spielt.

TAT-5 ist eine Phosphatidylethanolamin- (PtdEth) Flippase und sorgt als solche unter anderem für die Aufrechterhaltung der Asymmetrie des Lipids PtdEth in der Plasmamembran. Dies gelingt, indem es verhindert, dass PtdEth auf der Zelloberfläche exprimiert wird. PtdEth ist während der Zytokinese auf der Zelloberfläche exprimiert und muss für eine erfolgreiche Abszission wieder verschwinden (Emoto, Kobayashi et al. 1996). Wehman, Poggioli et al. (2011) zeigten, dass *tat-5* Mutanten manchmal mehrkernige Zellen aufweisen, da sich die zytokinetische Einschnürung der Membran wieder zurückzieht. Dies könnte auf einen Defekt bei der Abszission hindeuten. TAT-5 wurde zudem als ein Protein identifiziert, das die Bildung extrazellulärer Vesikel (EV) - wahrscheinlich durch die Asymmetrie von PtdEth an der Plasmamembran - reguliert. In *tat-5* Mutanten gibt es viele EVs, dies könnte einerseits an einer höheren Produktion EVs liegen oder

andererseits an einer niedrigeren Interlaiserungsrate als bei Kontrollen (Wehman, Poggioli et al. 2011).

Die Asymmetrie von PtdEth entlang der Zellmembran könnte einen Einfluss auf die Internalisierung von Mittelkörpern haben, jedoch ist TAT-5 bisher nicht direkt mit Phagozytose in Verbindung gebracht worden.

Non-muscle myosin 2 (NMY-2) befindet sich während der Zellteilung am sich zusammenziehenden Mittelkörperring sowie auf anderen kontraktilem äußerlichen Strukturen und wird häufig als Marker des Mittelkörpers verwendet. Es ist ein randständiger Bestandteil der Mittelkörper und kann durch Konstruktion eines Transgens mit GFP (grünem Fluoreszenzprotein) als Marker für Mittelkörper bei der fluoreszenzmikroskopischen Beobachtung *in vivo* verwendet werden (Shelton, Carter et al. 1999). NMY-2 agiert als Motor, der die Kontraktion der Aktinfilamente vorantreibt, beispielsweise bei der Bildung der Teilungsfurche für die Zellteilung. Entsprechend finden bei Embryonen ohne funktionstüchtiges NMY-2 keinerlei Kontraktionen auf der Zelloberfläche statt. (Guo and Kemphues 1996, Munro, Nance et al. 2004)

Ein Großteil meiner Daten beruht auf quantitativen Analysen von Mutanten und Wildtypen in frühen Embryonalstadien *in vivo*, bei denen das randständige Mittelkörperprotein NMY-2 mit der Zink-Finger-Domäne 1 (ZF1) von PIE-1 sowie GFP verbunden wurde. Die ZF1 Domäne wird durch die E3-Ubiquitin-Ligase ZIF-1 erkannt und mit Ubiquitin markiert. Dies führt in somatischen Zellen zu einem intrazellulären Abbau von PIE-1 Proteine im Proteasom (Reese, Dunn et al. 2000, DeRenzo, Reese et al. 2003). Die ZF1 Domänen von PIE-1 und einigen anderen Proteinen können auch in somatische Zellen GFP-markierte Reporter gezielt zum Abbau führen (Reese, Dunn et al. 2000). Wehman, Poggioli et al. (2011) konnten zeigen, dass extrazelluläre Vesikel, die von einer Zelle freigesetzt worden sind, vom ZF1 vermittelten Abbau verschont bleiben. Mithilfe der ZF1-Technik soll die Frage geklärt werden, ob post-mitotische Mittelkörperreste Kontakt zum Zytoplasma haben. Da ZF1 den Abbau im Proteasom vermittelt, wäre zu erwarten, dass ein post-mitotischer Mittelkörperrest bei Persistenz innerhalb

der Zelle oder randständigem Verbleib mit Kontakt zum Zytoplasma abgebaut wird. Bei Abgabe des mit ZF1 verbundenen Mittelkörperrests nach extrazellulär wäre hingegen zu erwarten, dass dieser nicht ZF1 vermittelt abgebaut werden kann, da er keinen Zugang zum Zytoplasma und dem darin befindlichen Proteasom hat. Durch den ZF1 Reporter kann dann gezeigt werden, ob sich Mittelkörperreste außerhalb des Zytoplasmas befinden.

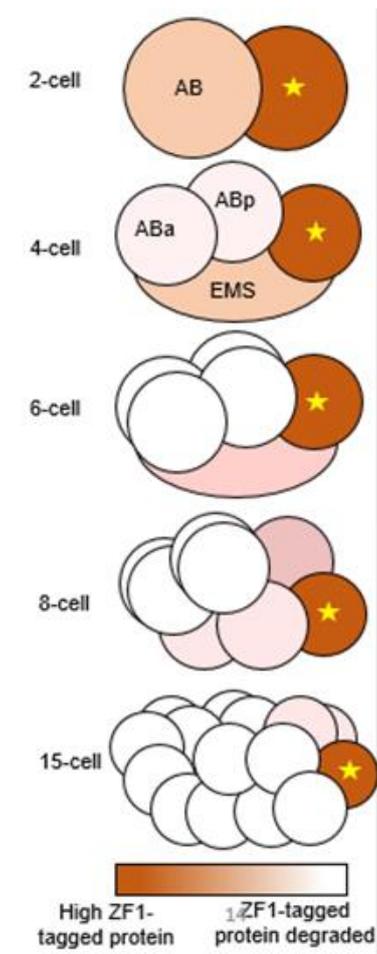


Abbildung 11: schematische Darstellung des ZF1-Abbaus während der frühen Embryonalentwicklung bei *C. elegans*. Die Vorläufer der Keimbahnzellen (mit gelben Stern versehen) teilen sich asymmetrisch in eine Vorstufe einer somatischen Zelle sowie eine Vorstufe einer Keimbahnzelle. Letztere weist einen hohen Anteil an Keimbahn-Proteinen wie beispielsweise PIE-1 auf (dunkelrote Zellen), erstere enthält einen geringen Gehalt an PIE-1 (rosafarbene Zellen), der innerhalb der nächsten ein bis zwei Zellzyklen abgebaut wird (weiße Zellen), (Nance, Munro et al. 2003); Nachdruck aus *Development*, Vol. 130, „*C. elegans* PAR-3 and PAR-6 are required for apicobasal asymmetries associated with cell adhesion and gastrulation“, J. Nance, E. M. Munro, J. R. Priess, Copyright 2003

Bei AB-Zellen handelt es sich um die erste somatische Zelllinie, von der EMS-Zelle geht die nächste somatische Zelllinie aus. In Zellen, die von einer AB-Zelle abstammen, werden mit ZF1 verbundene Proteine schneller abgebaut als in Zellen, die von der EMS-Zelle abstammen. Auch innerhalb der EMS-Zellreihe gibt es Abstufungen in der Geschwindigkeit, mit der mit ZF1 verbundene Proteine im Proteasom abgebaut werden. Ein Abfall der Fluoreszenzintensität ist bei den mit ZF1 verbundenen Reportern, die sich in einer Zelle der AB-Reihe befinden, demnach früher zu erwarten als bei denen, die mit einer Tochterzelle der EMS-Zelle verbunden sind (Reese, Dunn et al. 2000).

Die vorliegende Arbeit konzentriert sich auf das post-mitotische Schicksal des Mittelkörperrests. Erstmals wurden anhand der ZF1-Technik Methoden zur Quantifizierung und anschließenden Normierung Fluoreszenzintensitäten entwickelt und angewandt, mit dem Ziel verschiedene Phasen im Transport eines Mittelkörpers darstellen zu können. Phagozytose- und Autophagie-Mutanten werden hinsichtlich ihres Verhaltens beim Abbau von Mittelkörperresten untersucht. Mögliche Auswirkungen auf Zellteilungen werden auch betrachtet, wenn Proteine bei Mutanten verändert sind, die bekanntermaßen bei Mittelkörpern eine Rolle spielen.

Aus Gründen der besseren Lesbarkeit und Verständlichkeit des Textes benenne ich in der vorliegenden Arbeit alle vorkommenden Formen des Mittelkörpers vereinfacht als Mittelkörper, im Großteil der Fälle ist der Thematik wegen der Mittelkörperrest gemeint.

2. Material und Methoden

2.1. *Caenorhabditis elegans*

C. elegans werden von Dr. Gholamreza Fazeli nach Standardprotokoll gehalten (Brenner 1974).

RNA-Interferenz (RNAi)

Die RNAi Experimente werden von Dr. Gholamreza Fazeli durchgeführt, indem *C. elegans* vom L1 Larvenstadium an bis ins Erwachsenenalter bei 25°C über 60-70 Stunden lang mit Bakterien gefüttert werden, die dsRNA exprimieren. Dies geschieht unter Zuhilfenahme etablierter Protokolle (Fraser, Kamath et al. 2000). RNAi-Konstrukts werden von vorhandenen Datenbanken bezogen (Source BioScience). Folgende Klone werden genutzt: *par-1* (sjj_H39E23.1), *tat-5* (sjj_F36H2.1), *abi-1* (mv_B0336.6), *ced-1* (mv_Y47H9C.4) und *ced-2* (mv_G_YK2769).

2.2. Zeitraffer-Mikroskopie

Embryonen werden von Dr. Gholamreza Fazeli in M9-Pufferlösung entnommen und das Präparat wird auf eine Agarose-Unterlage gegeben (Anderson, Gill et al. 2008). Mit einem Weitfeld Fluoreszenzmikroskop Leica DM5500, das mit einer HC PL APO 40X 1.3 NA Öl-Objektivlinse sowie mit einer Leica DFC365 FX CCD Kamera ausgestattet ist, werden je ein bis zwei Embryonen gefilmt. Die Entwicklung der Embryonen wird ab dem Ein-, Zwei- oder Vierzellstadium für mindestens 30 bis hin zu mehr als 90 Minuten dargestellt. Alle 20 Sekunden wird eine Serie von 16 Schnittbildern jeweils für GFP und mCherry bei Raumtemperatur angefertigt.

Entsprechend besteht zu drei Zeitpunkten pro Minute die Möglichkeit, zwischen 16 verschiedenen Ebenen mit einem Abstand von je 1,2 µm und zwei Fluoreszenz-Reporter zu wechseln.

2.3. Computergestützte Auswertung

Die Auswertungen der Zeitraffer-Serien erfolgten mit Hilfe des frei zugänglichen und auf Java basierenden Computerprogrammes ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>). Dieses ermöglicht die Quantifizierung von Helligkeitsabstufungen und Farbintensitäten definierter Areale in einem Bild. Zudem wird zur besseren Orientierung bei Unklarheiten Imaris Software (Bitplane) genutzt.

2.3.1. Zellteilungs-Analysen

Die Zellteilungen mit Art der Zelle und Zeitpunkt werden in den ausgewerteten Aufnahmen der Zeitraffermikroskopie mittels der mCh::PH-Reporter bis zum 24-Zell-Stadium notiert. Ein Stadium fängt bei Sichtbarwerden der ersten Einstülpung der Membran der sich teilenden Zelle an.

Für die angefertigten Graphen wurde als Startzeitpunkt („Zeitpunkt null“) in der Regel der Beginn des Vierzellstadiums gewählt. Das bezeichnet den Zeitpunkt, an dem - optisch bestimmt - auf einer der Ebenen die gegenüberliegenden Seiten der Membran der P1-Zelle zum ersten Mal beginnen sich einzustülpen und aufeinander zu zu bewegen (Abbildung 12). Diese Definition des Zeitpunktes erwies sich beim Vergleich verschiedener Alternativen als geeignetste, da die Messwerte der Fluoreszenzintensität der Mittelkörper sowie des Zytoplasmas ab dem Beginn des Vierzellstadiums tendenziell konstanter als bei vorher beginnenden Messungen sind und somit besser verwertbar und miteinander vergleichbar. Die Einheit der x-Achse wird der besseren Verständlichkeit wegen in Minuten angegeben, wobei drei Einzelbilder in einer Minute entstanden sind.

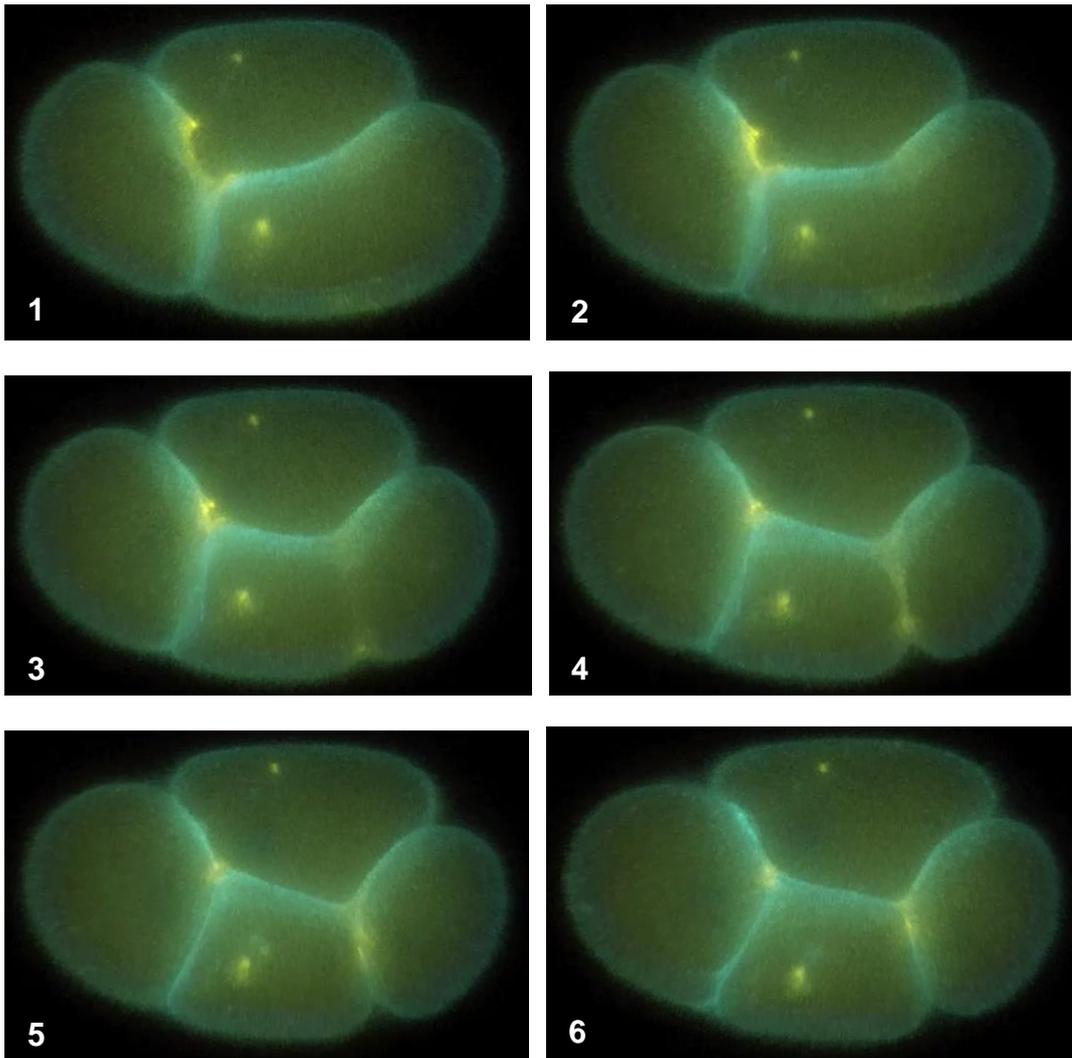


Abbildung 12: Ermittlung des Zeitpunktes 0 bei einem WEH51 Wildtyp-Embryo. Von links oben nach rechts unten sind nacheinander folgend sechs Bildausschnitte der Embryonalentwicklung zu sehen, mit je drei Sekunden Abstand voneinander. Am Ende des Dreizellstadiums - mit ABa-Zelle (jeweils links) sowie ABp-Zelle (jeweils oben) und P1-Zelle (Bilder 1 und 2, rechts unten) – bildet sich der kontraktile Ring am Äquator der P1-Zelle. Der Beginn des Vierzellstadiums (Bild 3) äußert sich im erstmaligen Sichtbarwerden der Einstülpung der Zellmembran der P1 Zelle. NMY-2::GFP::ZF1 (gelb) befinden sich am Mittelkörperring und dessen Überrest sowie mCh::PHPLC δ 1 auf Membranen (blau). Die Bilder 4, 5 und 6 zeigen den Zusammenschluss des kontraktilen Ringes, wobei die EMS-Zelle (jeweils unten) und P2-Zelle (jeweils rechts) entstehen. Die fluoreszenzmikroskopischen Darstellungen werden freundlicherweise von Dr. Gholamreza Fazeli bereitgestellt.

Alternativ kommen als Nullpunkt auf der x-Achse der Zeitpunkt der Aufnahme eines Mittelkörpers in die Zelle oder der Zeitpunkt des Verschwindens des Mittelkörpers in Frage. Wenn sich ein Mittelkörper erstmals innerhalb des Zytoplasma von der Plasmamembran weg bewegt, wird dieser Zeitpunkt als Internalisierung definiert (Abbildung 13). Da bei

einem Teil der Mutanten die Mittelkörper nicht von Zellen aufgenommen und bzw. oder nicht abgebaut werden, kommen letztere jedoch nicht für alle Auswertungen in Frage.

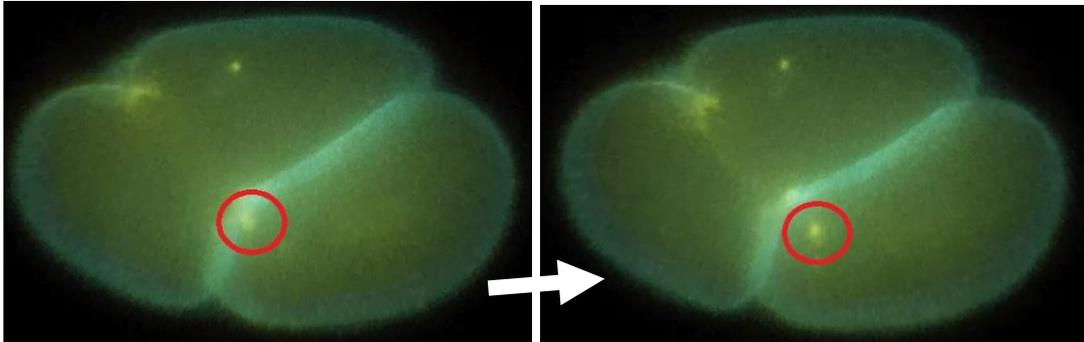


Abbildung 13: Zeitpunkt der Internalisierung: Von links nach rechts sind nacheinander folgend zwei Bildausschnitte der Embryonalentwicklung eines Wildtypen zu sehen, mit drei Sekunden Abstand voneinander. Die erste sichtbare Wegbewegung des Mittelkörpers (NMY-2::GFP::ZF1; gelb, rot umrandet) von der Zellmembran (PH::mCherry; blau) wird als Internalisierung definiert. Die fluoreszenzmikroskopischen Darstellungen werden freundlicherweise von Dr. Gholamreza Fazeli bereitgestellt.

Zudem wird notiert in welche Zelle die P0, AB und P1 Mittelkörper internalisiert werden.

Um die Geschwindigkeit der Zellteilungen zu überprüfen werden die Zeitpunkte bei Wildtypen und einzelnen Mutanten verglichen. Bei der Auswertung werden Zellen der AB-Linie getrennt von denen der EMS Linie betrachtet. Ein Zellzyklus der AB-Zellreihe dauert vom Sechs- zum Zwölfzellstadium. Für die Beurteilung der EMS-Zellreihe werden zwei aufeinanderfolgende Zellzyklen, vom Vier- zum 14-Zellstadium, kalkuliert. Die Zeitdauer vom Sichtbarwerden der ersten Einstülpung der Membran der sich teilenden Zelle (d.h. der ABx Zellen oder der P1 Zelle) bis zum Zeitpunkt der Einstülpung der Zellmembran der Tochterzellen (d.h. der ABxx-Zellen oder der MS Zelle) wird jeweils kalkuliert, sodass die Zeitdauern in Minuten zwischen Mutanten und Wildtypen verglichen werden können.

Der intrazelluläre Abbau von ZF1 in AB-Zellen sowie E- und MS-Zellen wird zudem mit dem ZF1-Abbau des P0-Mittelkörpers verglichen. Dazu wird visuell der Beginn des Fluoreszenzverlustes in AB- sowie E- und MS-Zellen bestimmt. Dieser lässt auf einen Abbau von ZF1-Reportern in der jeweiligen

Zelle schließen. Der intrazelluläre ZF1-Abbau wird verglichen mit dem Fluoreszenzverlust des Mittelkörpers, der später in diese Zelle internalisiert wird. So können Schlüsse über eine eventuelle Zytoplasma-Verbindung zwischen post-mitotischem Mittelkörperrest und aufnehmender Zelle gezogen werden.

2.3.2. Messung der internen Kontrolle (erster Polkörper bzw. Zytoplasma)

Um den kontinuierlichen Verlust an Fluoreszenzintensität durch Ausbleichen im Laufe der Aufnahme zu kompensieren, wird eine interne Kontrolle verwendet. Bei Embryonen, die mittels der NMY-2 Transgene beurteilt werden, wird als interne Kontrolle der erste Polkörper genutzt. Dieser entsteht während der Meiose I in einer asymmetrischen Zellteilung, enthält einen haploiden Chromosomensatz sowie wenig Zytoplasma. Er eignet sich als interne Kontrolle, da er NMY-2 beinhaltet, in der Regel permanent zu sehen ist und sich bewegungsarm und von Einflüssen weitgehend abgeschirmt in der Eischale befindet. In einem Kreis der Fläche $0,5 \mu\text{m}^2$ - entsprechend der Fläche bei den Mittelkörper-Messungen und passend zur Größe des Polkörpers – wird zu jedem Zeitpunkt der Zeitraffer-Aufnahme eine Messung der GFP-Fluoreszenzintensität in der fluoreszenzintensivsten Ebene durchgeführt. Der Embryo wird von der Auswertung ausgeschlossen, wenn der erste Polkörper nicht zu sehen ist oder während der Entwicklung aus der Sichtfläche verschwindet. Anhand der gemessenen Mittelwerte wird eine exponentielle Kurve mithilfe des Programmes OriginPro (OriginLab) erstellt. Wenn die gemessenen Mittelwerte der Fluoreszenzintensität des ersten Polkörpers keiner exponentiellen Kurve entsprechen werden alle Daten dieses Embryos von den Auswertungen ausgeschlossen.

Bei Embryonen, die mittels der LifeAct-Technik beurteilt werden, werden als interne Kontrolle die Mittelwerte von Messungen im Zytoplasma genutzt. Diese erfolgen in einer AB Zelle, welche zentral im Embryo nahe einer Membran gelegen ist, und werden in einem Kreis der Fläche $2 \mu\text{m}^2$ gemessen. Anhand der gemessenen Mittelwerte wird eine exponentielle Kurve mithilfe des Programmes OriginPro (OriginLab) erstellt. Wenn die

gemessenen Mittelwerte der Fluoreszenzintensität des Zytoplasmas keiner exponentiellen Kurve entsprechen werden alle Daten dieses Embryos von den Auswertungen ausgeschlossen. Auch alternative Herangehensweisen für die Werte der internen Kontrolle wurden versucht, wie beispielsweise die Messung der Fluoreszenzintensitäten einer Zellmembran oder des Zytoplasmas an anderen Stellen oder mit anderen Flächen. Jedoch konnten bei letztgenannten Messverfahren keine Werte generiert werden, die einer exponentiellen Kurve entsprechen.

2.3.3. Messung von NMY-2

Die Quantifizierung der Fluoreszenzintensitäten der Mittelkörper erfolgte vom Zeitpunkt des sichtbaren Zusammenschlusses des kontraktilen Ringes bis der Mittelkörper nicht mehr von der Umgebung unterschieden werden kann. Die Messungen des P0, AB sowie des P1 MBR erfolgten jeweils am Stück und einmal pro Zeitpunkt. Die optisch am hellsten erscheinende Ebene wird gewählt. Es wird in einem Kreis der Fläche $0,5 \mu\text{m}^2$ gemessen. Diese Fläche erscheint geeignet, da sie zur Größe der fluoreszenzintensiven Areale des Mittelkörpers passt. Pro Minute liegen entsprechend drei Messwerte pro gemessenem Zellbestandteil vor. Zur Erstellung der Kurven wird der Mittelwert der Fluoreszenzintensität genutzt. Durch die engmaschige Darstellung der Embryonen in 16 Ebenen mit einem Abstand von $1,2 \mu\text{m}$ kommt es nur selten vor, dass sich der fluoreszenzintensivste Punkt zwischen zwei Ebenen befindet. Ein Embryo wird von den Auswertungen ausgeschlossen, wenn sich zwei Mittelkörper sehr nahe nebeneinander befinden und nicht mehr unterschieden werden können.

Zur Standardisierung der Fluoreszenzintensitäten auf Werte zwischen 0 und 1 wird zudem ein Hintergrundwert benötigt, der die Fluoreszenzen um den gemessenen Zellbestandteil herum berücksichtigt. Bei Wildtypen wird hierfür der niedrigste der normierten Werte des jeweiligen Mittelkörper verwendet, sofern er bis 30 Minuten nach Beginn des Vierzellstadiums abgebaut ist. In der Regel handelt es sich hierbei um den letzten

gemessenen Wert der Fluoreszenzintensität des Mittelkörpers, kurz bevor dieser nicht mehr vom umgebenden Zytoplasma unterschieden werden kann. Da bei einigen der mutierten Embryonen die Mittelkörper nicht oder sehr spät an Fluoreszenz verlieren, ist eine Berechnung mit dem Wert der niedrigsten Fluoreszenzintensität nicht möglich. Alternativ werden in Fällen von Mutanten und auch Wildtypen, bei denen 30 Minuten nach Beginn des Vierzellstadiums der Mittelkörper noch nicht degradiert ist, sogenannte „Hintergrundwerte“ anstelle des kleinsten Wertes des Mittelkörpers verwendet. Diese Hintergrundwerte/ Zytoplasmamessungen werden zum Zeitpunkt der Internalisierung getätigt und ergeben sich aus dem Durchschnittswert aus mindestens fünf verschiedenen Messungen im Zytoplasma einer AB Zelle in der Nähe einer Membran in einem Kreis der Fläche $2 \mu\text{m}^2$.

2.3.4. Messung von Aktin durch LifeAct

Um eine Akkumulation von Aktinfilamenten zum Zeitpunkt der Internalisierung des Mittelkörpers um diesen herum nachzuweisen, erfolgt die Quantifizierung der Fluoreszenzintensität von LifeAct::RFP um den P0 Mittelkörper. Die Messungen erfolgen vom Zeitpunkt des sichtbaren Zusammenschlusses des kontraktiven Ringes zwischen der AB und der P1 Zelle bis zum zumindest Siebenzellstadium. Die Messungen werden einmal pro Zeitpunkt in einem Kreis der Fläche $2 \mu\text{m}^2$ durchgeführt, in dessen Zentrum sich der Mittelkörper befindet. Die Fläche erwies sich als geeignet um die Fluoreszenzintensität von LifeAct um den Mittelkörper aussagekräftig darstellen zu können. Pro Minute liegen bedingt durch die Zeitraffer-Mikroskopie entsprechend drei Messwerte pro gemessenem Zellbestandteil vor. Zur Erstellung der Kurven wird der Mittelwert genutzt. Durch die engmaschige Darstellung der Embryonen in 16 Ebenen mit einem Abstand von $1,2 \mu\text{m}$ kommt es nur selten vor, dass sich der fluoreszenzintensivste Punkt zwischen zwei Ebenen befindet.

Zur Standardisierung der Fluoreszenzintensitäten auf Werte zwischen 0 und 1 wird zudem ein Hintergrundwert benötigt, der die Fluoreszenzen um den

gemessenen Zellbestandteil im Zytoplasma berücksichtigt. Im Falle der Messungen der Fluoreszenzintensität bei Wildtyp-Embryonen mit LifeAct Reportern wird dieser Hintergrundwert am Zeitpunkt der Internalisierung bestimmt. Ein Durchschnittswert aus mindestens fünf verschiedenen Messungen im Zytoplasma einer AB Zelle in der Nähe einer Membran in einem Kreis der Fläche $2 \mu\text{m}^2$ wird verwendet.

2.4. Normierung der Daten

Um die Werte der Fluoreszenzintensitäten unter den einzelnen Embryonen und Mutanten miteinander vergleichen zu können, werden diese folgendermaßen weiterverarbeitet:

In einem ersten Schritt (Formel 1) werden die gemessenen Werte der Fluoreszenzintensität normiert, um dem kontinuierliche Ausbleichen unter dem Fluoreszenzmikroskop entgegenzuwirken. Dies erfolgt durch Division des gemessenen Wertes der Fluoreszenzintensität des Mittelkörpers zu einem definierten Zeitpunkt durch den erwarteten Wert des ersten Polkörpers bzw. des Zytoplasmas zum selben Zeitpunkt. Dieser wird wie in 2.3.2 beschrieben einer eigens angefertigten exponentiellen Kurve, die den gemessenen Werten des ersten Polkörpers bzw Zytoplasmas angepasst ist, entnommen.

$$\text{normierter Wert des Mittelkörpers} = \frac{\text{gemessener Wert der Fluoreszenzintensität des Mittelkörpers}}{\text{interne Kontrolle (errechneter Wert des ersten Polkörpers bzw. des Zytoplasmas)}}$$

Formel 1: Errechnung des normierten Wertes eines Mittelkörpers: Durch Division des Mittelkörper-Wertes durch den Wert der internen Kontrolle desselben Zeitpunktes soll das Ausbleichen unter dem Fluoreszenzmikroskop kompensiert werden.

Im zweiten Schritt werden die Werte der Mittelkörper auf Zahlen zwischen 0 und 1 standardisiert. Bei den ZF1-Messungen wird dafür vom mittels 1. Formel errechneten normierten Wert des jeweiligen Mittelkörpers der kleinste seiner normierten Werte subtrahiert. Im Anschluss wird dies dividiert durch die Subtraktion des kleinsten normierten Wertes des Mittelkörpers vom höchsten normierten Wert des Mittelkörpers (Formel 2).

$$\text{standardisierter Wert des Mittelkörpers bei ZF1 – Technik} = \frac{\text{normierter Wert des Mittelkörpers} - \text{Minimum der normierten Werte}}{\text{Maximum der normierten Werte} - \text{Minimum der normierten Werte bzw. "Hintergrund"}}$$

Formel 2: Errechnung des standardisierten Wertes eines Mittelkörpers bei ZF1-Embryonen

Der zweite Schritt bei den Aktin-Messungen, zur Errechnung von Mittelkörper-Werten zwischen 0 und 1, erfolgt unter Zuhilfenahme eines sogenannten Hintergrundwertes.

$$\text{standardisierter Wert des Mittelkörpers bei Aktin – Messungen} = \frac{\text{normierter Wert des Mittelkörpers} - 1}{\frac{\text{Durchschnitt Zytoplasma bei Internalisierung}}{\text{normierter Wert Mittelkörper bei Internalisierung}} - 1}$$

Formel 3: Errechnung des standardisierten Wertes eines Mittelkörpers bei Aktin-Messungen

3. Ergebnisse

Die vorliegende Arbeit konzentriert sich auf Abszission und den Abbau des Mittelkörpers. Die Daten basieren auf Analysen von Embryonen verschiedener Mutanten von *C. elegans* mittels Zeitraffer-Mikroskopie, welche freundlicherweise von Dr. Gholamreza Fazeli bereitgestellt wurden. Erstmals wurden anhand der ZF1-Technik Methoden entwickelt und angewandt, die durch Beobachtung von Fluoreszenzreportern *in vivo* ein besseres Verständnis der post-mitotischen Schicksals des Mittelkörpers ermöglichen sollen, insbesondere der Vorgänge von der Trennung der IZB bis zur Phagozytose des Mittelkörpers.

Phagozytose- und Autophagie-Mutanten werden hinsichtlich ihres Verhaltens bei dem Abbau von Mittelkörperresten untersucht. In Tabelle 1 ist eine Übersicht der in der vorliegenden Arbeit analysierten Mutanten aufgeführt.

3.1. Überprüfung der ZF1-Reporter-Linie/ Etablierung der Kontroll-Linie

Ein Großteil der Embryonen in der vorliegenden Arbeit wurde mit Hilfe der ZF1 Technik analysiert. Zuerst soll *in vivo* geprüft werden, ob *C. elegans* in der Embryonalentwicklung durch Anwendung des ZF1 Reporters beeinträchtigt sind. Mit Zeitraffermikroskopie analysiere ich Mittelkörpern in Embryonen, deren Mittelkörperprotein NMY-2 mit der ZF1-Domäne von PIE-1 sowie mit GFP bearbeitet ist. Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphat (PIP₂) positive Membranen werden mit der Pleckstrin homology (PH) Domäne des PLC δ jeweils zur besseren Orientierung andersfarbig (mCherry) dargestellt (Audhya, Hyndman et al. 2005). Die fluoreszenzmikroskopische Darstellung in Zeitraffer-Mikroskopie ermöglicht eine detaillierte computergestützte Auswertung von Zellzykluszeiten, Zellteilungen sowie Internalisierungen von Mittelkörpern. WEH51 Embryonen, die Transgene für mCh::PH und NMY-2::GFP::ZF1 exprimieren, sollen als Wildtyp-Linie etabliert werden und als Kontrolle im Vergleich mit verschiedenen Mutanten dienen.

3.1.1. Zellzykluszeit

Die Embryonalentwicklung läuft bei *C. elegans* nach einem festen Muster ab (Sulston, Schierenberg et al. 1983). In frühen Stadien der Embryonalentwicklung teilen sich die Zellen bei *C. elegans* in einer starren Reihenfolge (Abbildung 8). Es soll nachgewiesen werden, dass die *C. elegans* Embryonen der ZF1-Reporter-Linie WEH51 als Kontrollen geeignet sind. Daher wird zuerst überprüft, ob die Transgene für mCh::PH und NMY-2::GFP::ZF1 Auswirkungen auf den Ablauf des Zellzyklus und der Zellteilungen haben.

Bei elf betrachteten WEH51 Embryonen sind die Zeitabstände zwischen Zellteilungen interindividuell sehr ähnlich (Abbildung 14). Innerhalb von 9 bis 11 Minuten nach Beginn des Vierzellstadiums befinden sich alle Embryonen im Sechszellstadium. 37,6 bis 44,3 Minuten nach Beginn des Vierzellstadiums haben alle Embryonen das 24-Zellstadium erreicht. Die Zellteilungen erfolgen in oben genannter Reihenfolge sowie nach vergleichbarem zeitlichem Muster (Abbildung 8). Hinsichtlich der Dauer des Zellzyklus sowie der Reihenfolge Zellteilungen sind bei Embryonen der Linie WEH51 keine Auffälligkeiten erkennbar im Vergleich zu Embryonen der Linie LP162 (Abbildung 15).

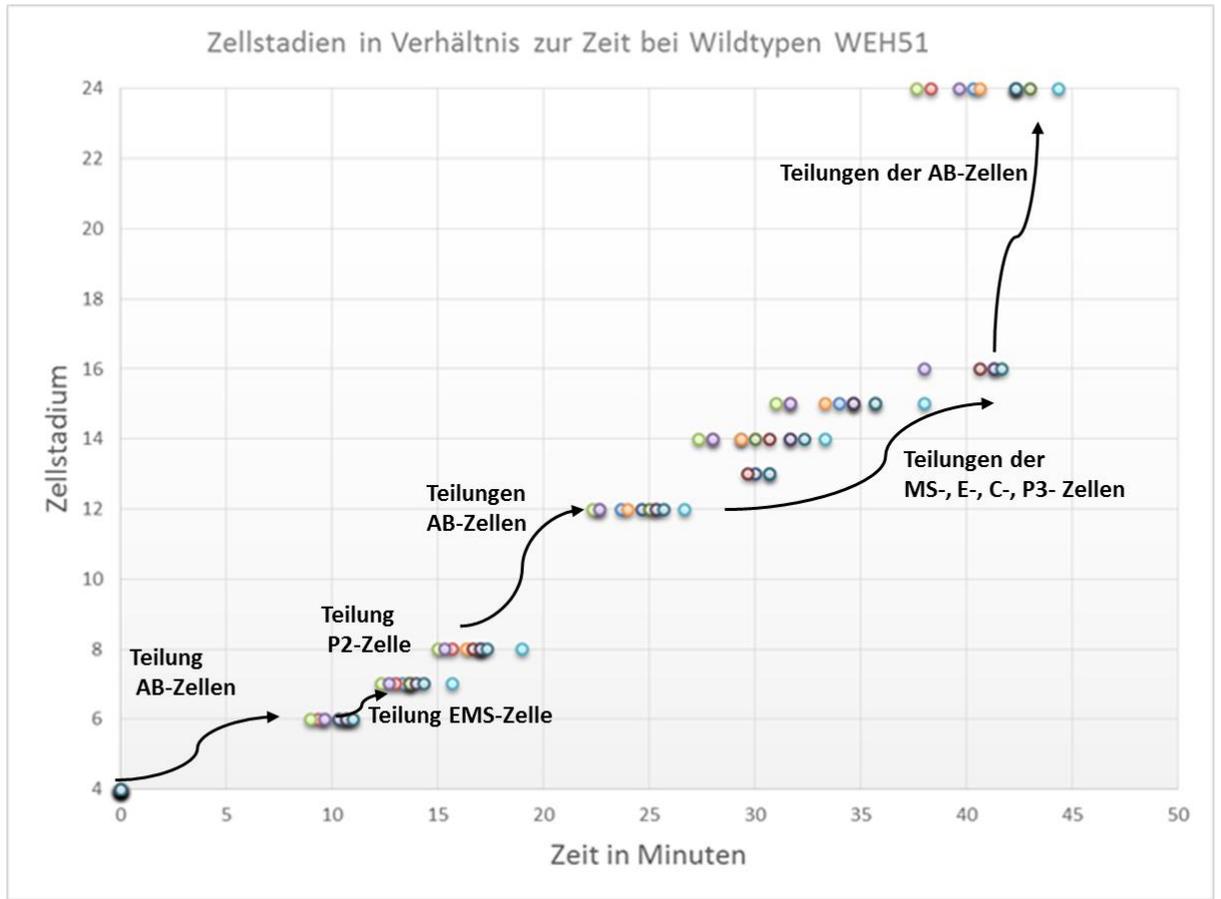


Abbildung 14: Überprüfung der Zellteilungen bei der ZF1-Reporter-Linie WEH51 (n=11). Der ZF1-Reporter stört den stereotypen zeitlichen Ablauf der Zellteilungen sowie das feste Muster der Reihenfolge nicht. Elf *C. elegans* WEH51 Embryonen wurden vom Vierzellstadium bis zum 24-Zellstadium analysiert.

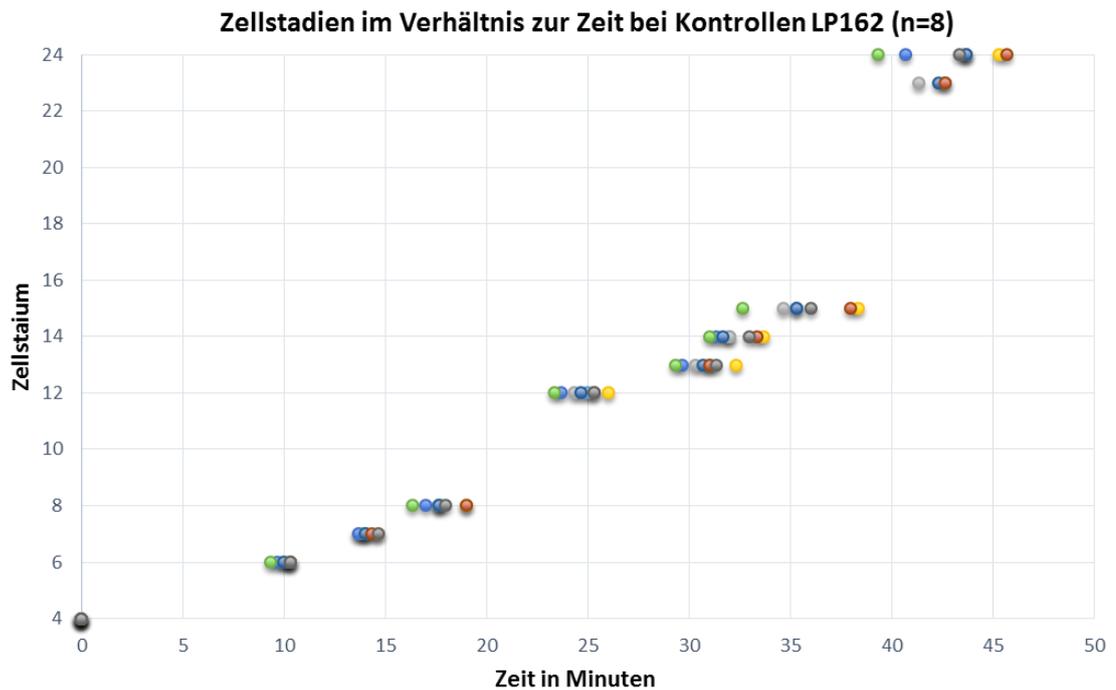


Abbildung 15: Überprüfung der Zellteilungen bei der ZF1-Reporter-Linie LP162 (n=8). *C. elegans* Embryonen der Linie LP162 (*nmy-2::gfp+LoxP*) weisen im Vergleich zu WEH51 Embryonen (vorhergehende Abbildung) identische Zeitdauern in der Entwicklung vom 4- zum 24-Zellstadium auf: Der ZF1-Reporter stört den stereotypen zeitlichen Ablauf der Zellteilungen sowie das feste Muster der Reihenfolge vom Vierzellstadium bis zum 24-Zellstadium nicht.

3.1.2. Stereotyper zeitlicher Ablauf der zellulären Aufnahme der Mittelkörper

Mittelkörper werden in frühen Embryonalstadien bei *C. elegans* nach einem festgelegten zeitlichen Muster von den jeweiligen Zellen aufgenommen (Ou, Gentili et al. 2014). Ich habe vier Linien mit verschiedenen Mittelkörper-Reportern hinsichtlich des Zeitpunktes der Internalisierung der P0, AB und P1 Mittelkörper beobachtet (Abbildung 16). Die Embryonen der Linie WEH51 verfügen über die Reporter *NMY-2::GFP::ZF1*, die Linie BV113 verfügt über Reporter für *NMY-2::GFP*, bei Embryonen der Linie LP162 sind Mittelkörper mit GFP Knock-in in *NMY-2* dargestellt, wohingegen WEH02 Embryonen *NMY-2::mCherry* aufweisen.

Im Durchschnitt wird der P0 Mittelkörper bei allen vier Reporter-Linien sechs \pm fünf Minuten nach Beginn des Vierzellstadiums internalisiert (n= 14 BV113, n=16 LP162, n=9 WEH02, n=18 WEH51; Abbildung 16 links). Der

AB Mittelkörper wird durchschnittlich 16 Minuten (± 8 Minuten) nach Beginn des Vierzellstadiums in eine Zelle aufgenommen (n= 12 BV113, n=16 LP162, n=9 WEH02, n=17 WEH51; Abbildung 16 Mitte). Die Internalisierung des P1 Mittelkörpers erfolgte 14 ± 5 Minuten nach Beginn des Vierzellstadiums (n= 13 BV113, n=16 LP162, n=9 WEH02, n=18 WEH51; Abbildung 16 rechts). Bei den genannten Zeiten war es unerheblich, welche Art des Mittelkörper-Reporters die Linie exprimiert. Alle vier Reporter-Linien internalisieren Mittelkörpern in zeitlicher Hinsicht betrachtet in einer untereinander ähnlichen sowie stereotypen Art und Weise.

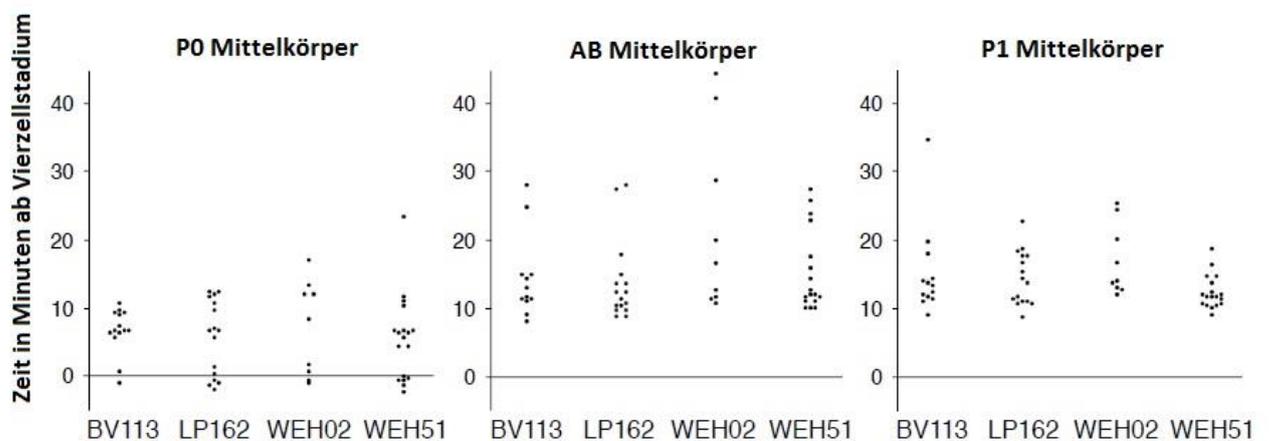


Abbildung 16: Vergleich von vier Reporter-Linien mit verschiedenen NMY-2 Transgenen. Zeitpunkte der Internalisierung des P0 (links), AB (Mitte) und P1 (rechts) Mittelkörpers bei den vier verschiedenen Reporter-Linien: BV113 (NMY-2::GFP, n=14), LP162 (NMY-2::GFP Knock-in, n=16), WEH02 (NMY-2::mCherry, n=9) und WEH51 (NMY-2::GFP::ZF1, n=18). Die Zeitpunkte der Internalisierungen der einzelnen Mittelkörper unterscheiden sich in zeitlicher Hinsicht nicht voneinander, verändert nach (Fazeli, Trinkwalder et al. 2016)

3.1.3. Festes Muster der internalisierenden Zelle

Es ist bekannt dass Mittelkörper, die bei *C. elegans* aus den ersten drei Zellteilungen hervorgehen, nicht zufällig in irgendeine Zelle gelangen. Vielmehr gibt es erkennbare Regeln, in welcher Zellart der jeweilige Mittelkörper wahrscheinlich zum Abbau landen wird: der P0 Mittelkörper wird von einer Zelle der EMS-Linie internalisiert, ebenso endet der AB Mittelkörper zumeist in der benachbarten EMS-Zelle, wohingegen der P1 Mittelkörper von der P2 Zelle aufgenommen wird (Ou, Gentili et al. 2014, Singh and Pohl 2014). Erstmals haben wir dies bei Mittelkörpern getestet,

die mit den Transgenen NMY-2::GFP::ZF1 sowie NMY-2::GFP ausgestattet sind. Es sollte überprüft werden, ob der ZF1-Reporter das stereotype Verhalten der ersten drei Mittelkörper bei der Phagozytose verändert. Hierfür habe ich die Zielzellen bei der Internalisierung der P0, AB und P1 Mittelkörper bei Embryonen mit NMY-2::GFP Reportern untersucht, von denen wiederum einige mit ZF1 versehen waren (WEH51) sowie einige ohne (BV113, LP162). Unsere Daten zeigen, dass unabhängig von ZF1 der P0 Mittelkörper in 83 % der Fälle (n=59) von der EMS Zelle – bei deren Bildung er entstand - oder ihrer Tochterzelle MS aufgenommen. 17% der P0 Mittelkörper hingegen landen in Abkömmlingen der AB Zellreihe. Der AB Mittelkörper wird in 95% der ausgewerteten Fälle (n=43) von der EMS- oder MS-Zelle aufgenommen. Diese sind den Zellen benachbart, welche an der Bildung des AB Mittelkörpers beteiligt sind. In der P2-Zelle oder einer ihrer Tochterzellen P3- oder C-Zelle ist der P1 Mittelkörper in 95% der beobachteten Fälle (n=44) zu finden.

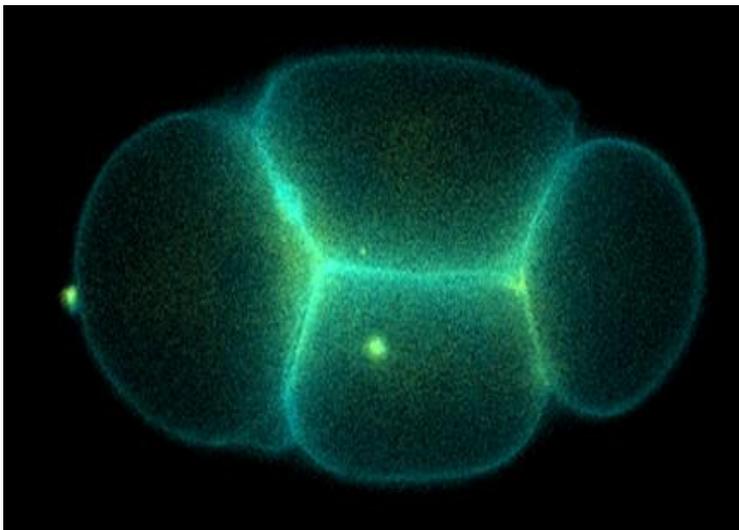


Abbildung 17: Wildtyp WEH51 im 4-Zellstadium Plasmamembranen (PH::mCherry) in blau sowie Mittelkörper (NMY-2::GFP::ZF1) in gelb dargestellt, der erste Polkörper ist am linken Bildrand zu sehen, der P0 Mittelkörper ist in die EMS-Zelle internalisiert worden, verändert nach (Fazeli, Trinkwalder et al. 2016). Die fluoreszenzmikroskopischen Darstellungen werden freundlicherweise von Dr. Gholamreza Fazeli bereitgestellt.

Das Verhalten der ersten drei Mittelkörper sowie die Embryonalentwicklung wird durch die Anwendung von ZF1-Reportern nicht beeinträchtigt. Als Kontrollembryo im Vergleich mit zahlreichen Mutanten eignen sich aus oben genannten Gründen daher die Embryonen der Linie WEH51 (Abbildung 17).

3.2. Entwicklung der ZF1-Analyse

Startpunkt der Analysen

Von allen Embryonen, die mit der ZF1-Technik ausgewertet werden, habe ich die Fluoreszenzintensität der ersten drei Mittelkörper ab erstmaligem Zusammenschluss des kontraktiven Ringes gemessen. Vor Beginn des Vierzellstadiums unterliegen die Daten jedoch sehr starken Schwankungen (Abbildung 18, vor Zeitpunkt 0). Dies kann hauptsächlich darauf zurückgeführt werden, dass zu Beginn der Messungen der Mittelkörper unterschiedlich kompakt war, da der kontraktile Ring noch nicht vollständig kontrahiert ist. Weitere Analysen werden deswegen auf einen Teil der P0 Daten eingegrenzt, z.B. ab dem Vierzellstadium.

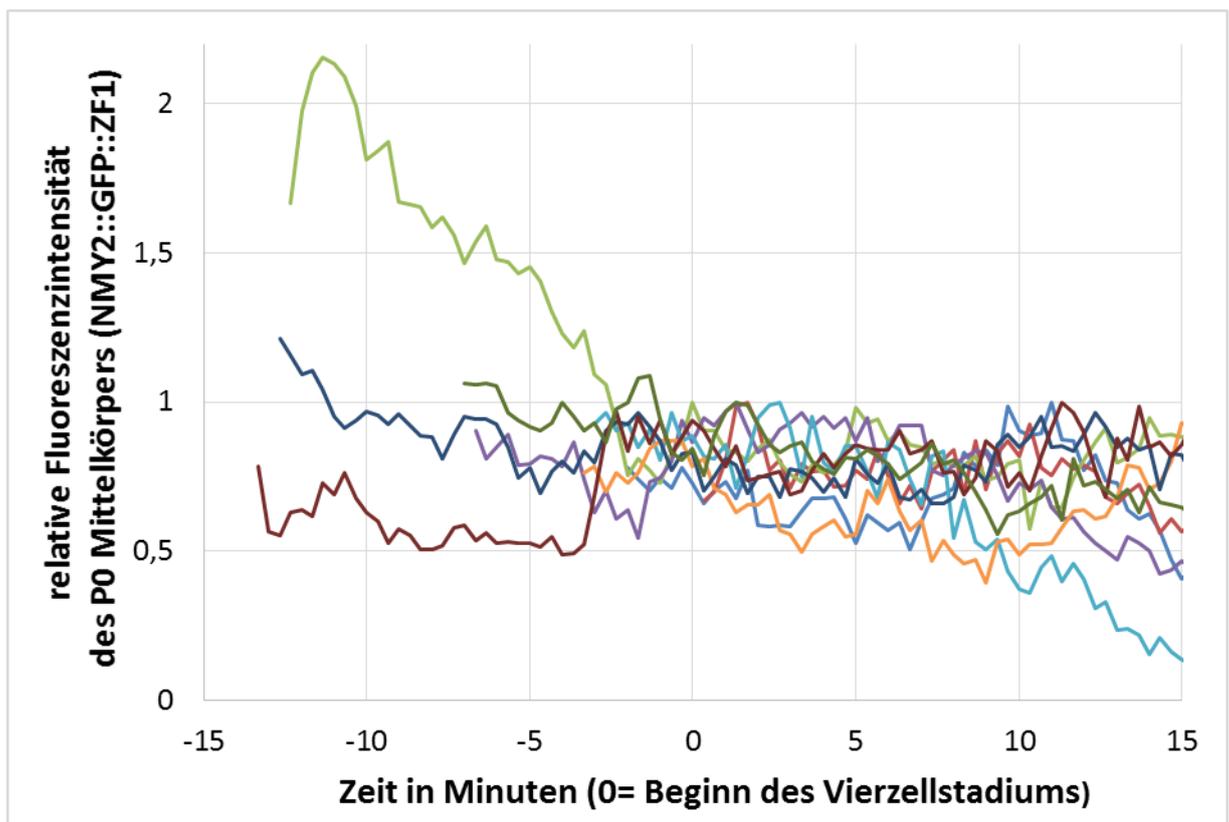


Abbildung 18: Fluoreszenzintensität von P0 Mittelkörpern bei Kontrollen (NMY-2::GFP::ZF1; n=9) vor Beginn des Vierzellstadiums (Zeitpunkt 0 Minuten) unterliegen starken Schwankungen.

Phänotypen mit ZF1-Technik

Es ist bisher ungeklärt, ob post-mitotische Mittelkörper bei *C. elegans* Embryonen nach extrazellulär abgegeben werden oder nach der Trennung der Tochterzellen in einer davon verbleiben. Es wäre auch möglich, dass beides der Fall ist und es wäre interessant welcher Fall wann eintritt. Hier soll die ZF1-Technik Aufschluss geben, wobei bei erhaltenem Kontakt des Mittelkörpers zum Zytoplasma einer Zelle (Abbildung 19) ein zügiger Abfall der Fluoreszenzintensität erwartet wird, solange es im Kontakt zum Zytoplasma bleibt. Bei extrazellulärem Verbleib des Mittelkörpers (Abbildung 19) ist eine Persistenz der ZF1-vermittelten Fluoreszenzintensität aufgrund des fehlenden Zugangs zum Zytoplasma zu erwarten. Dieser Zugang würde dann sowohl vor als auch nach der Phagozytose fehlen.

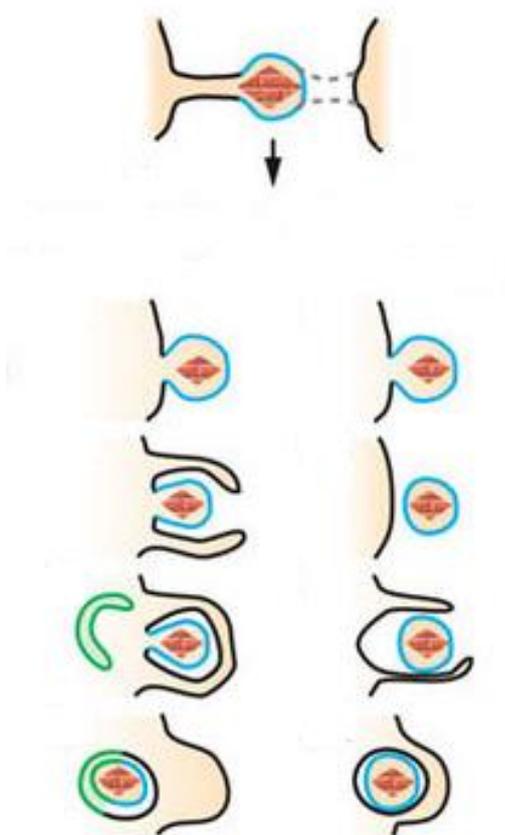


Abbildung 19: Zwei verschiedene Möglichkeiten der Beziehung des Mittelkörpers zum Zytoplasma nach der Zellteilung: Der Mittelkörper ist als braunes Trapez dargestellt und bleibt nach der Zellteilung (oberes Bild) entweder mit einer Tochterzelle verbunden (linke Bildreihe), woraufhin er von dieser internalisiert wird und mit einem Autophagosom fusioniert. Alternativ könnte der Mittelkörper nach der Zellteilung nach extrazellulär

abgegeben werden, über einen der Abszission ähnlichen Mechanismus (rechte Bildreihe) und im Anschluss durch Endozytose von einer Tochter- oder Nachbarzelle aufgenommen werden. Nachdruck mit freundlicher Genehmigung durch Macmillan Publishers Ltd: Nature Communications, (Ettinger, Wilsch-Brauninger et al. 2011), Copyright 2011

Aufgrund des unterschiedlich schnellen Abbaus von ZF1-Reportern je nach Zelllinie (Abbildung 11) ergeben sich verschiedene potentielle ZF1 Phänotypen: wenn der Mittelkörper mit einer AB-Zelle Verbindung hat, wird NMY-2::GFP::ZF1 vor dem Achtzellstadium abgebaut. Wenn sich der Mittelkörper in einer EMS Zelle befindet, ist ein Abbau von NMY-2::GFP::ZF1 zwischen dem 8- und dem 14-Zellstadium zu erwarten. Im Falle, dass sich der Mittelkörper extrazellulär befindet und nicht internalisiert wird, wird NMY-2::GFP::ZF1 auch nach dem 15-Zellstadium nicht abgebaut sein.

Intrazellulärer ZF1-Abbau und Fluoreszenzverlust der Mittelkörper

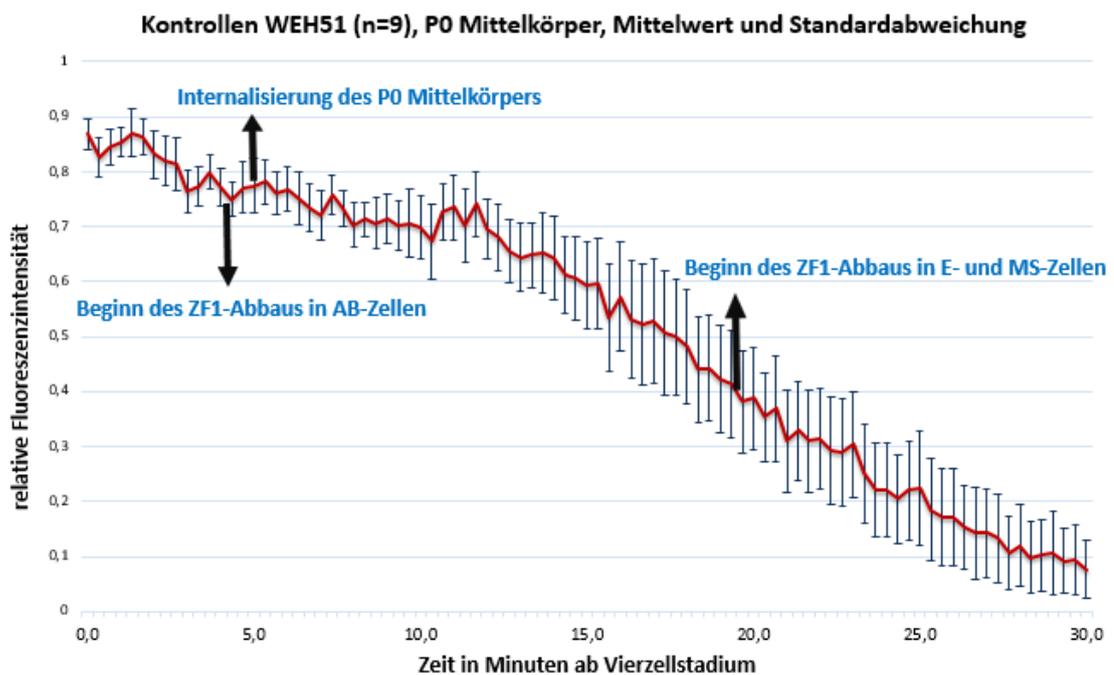


Abbildung 20: Fluoreszenzverlust der Mittelkörper ist unabhängig vom intrazellulären ZF1-Abbau: Darstellung der relativen Fluoreszenzintensität (NMY-2::GFP::ZF1) des P0 Mittelkörpers bei Wildtypen WEH51 (n=9) im Verhältnis zur Zeit in Minuten ab Beginn des Vierzellstadiums mit Angabe der durchschnittlichen Zeitpunkte, an denen ZF1 in AB-Zellen (nach $4,8 \pm 0,6$ Minuten, n=11) sowie in E- und MS-Zellen (nach $19,06 \pm 2,5$ Minuten, n=11) abgebaut werden. Die P0 Mittelkörper (n=18) werden durchschnittlich $5,4 \pm 6,3$ Minuten nach Beginn des Vierzellstadiums von der EMS-Zelle (61 %), der P1-Zelle (22%) oder einer AB-Zelle (17%) aufgenommen.

Um zu prüfen ob Mittelkörper am Ende der Abszission weiterhin mit dem Zytoplasma einer Tochterzelle in Verbindung stehen, wird der intrazelluläre Abbau von ZF1 in AB-Zellen sowie E- und MS-Zellen mit dem ZF1-Abbau des P0-Mittelkörpers (Abbildung 20) verglichen. Der intrazelluläre Abbau von ZF1 beginnt $4,8 \pm 0,6$ Minuten nach Beginn des Vierzellstadiums in AB-Zellen, aber die P0 Mittelkörper werden wie bei Kontrollen zu 83 % (n=18) von der P1-Zelle oder ihrer Tochterzelle EMS aufgenommen. Deswegen kann der Verlust der P0 Mittelkörper Fluoreszenzintensität nicht aufgrund des ZF1-Abbaus in AB Zellen erfolgen. Weil in MS- und E-Zellen der Abbau von ZF1 $19 \pm 2,5$ Minuten nach Beginn des Vierzellstadiums beginnt, wäre es zu erwarten, dass NMY-2::GFP::ZF1 Fluoreszenz bis dahin stabil bleiben würde. Bei P0 Mittelkörpern hingegen ist eine Abnahme der Fluoreszenzintensität bereits deutlich früher, in der Regel wenige Minuten nach Internalisierung des Mittelkörpers, zu beobachten. Diese Daten zeigen, dass sich die Internalisierung der P0 Mittelkörper vor der ZF1 Degradierung in der aufnehmenden Zelle ereignet. Zudem ist eine Abnahme der Fluoreszenz nach der Internalisierung zu sehen, welche aus einem unbekanntem Grunde stattfindet.

Verlust an Fluoreszenzintensität nach Internalisierung

Nach stattgefundener Aufnahme des Mittelkörpers in eine Zelle (Abbildung 13) beginnen sich die Werte der Fluoreszenzintensität von NMY-2::GFP::ZF1 nach wenigen Minuten zu reduzieren. Vom Zeitpunkt der Internalisierung des P0 Mittelkörpers in die Zelle dauert es bei Kontrollen im Mittel 24 Minuten bis zum Verlust der Fluoreszenzintensität auf Hintergrundniveau (Abbildung 21).

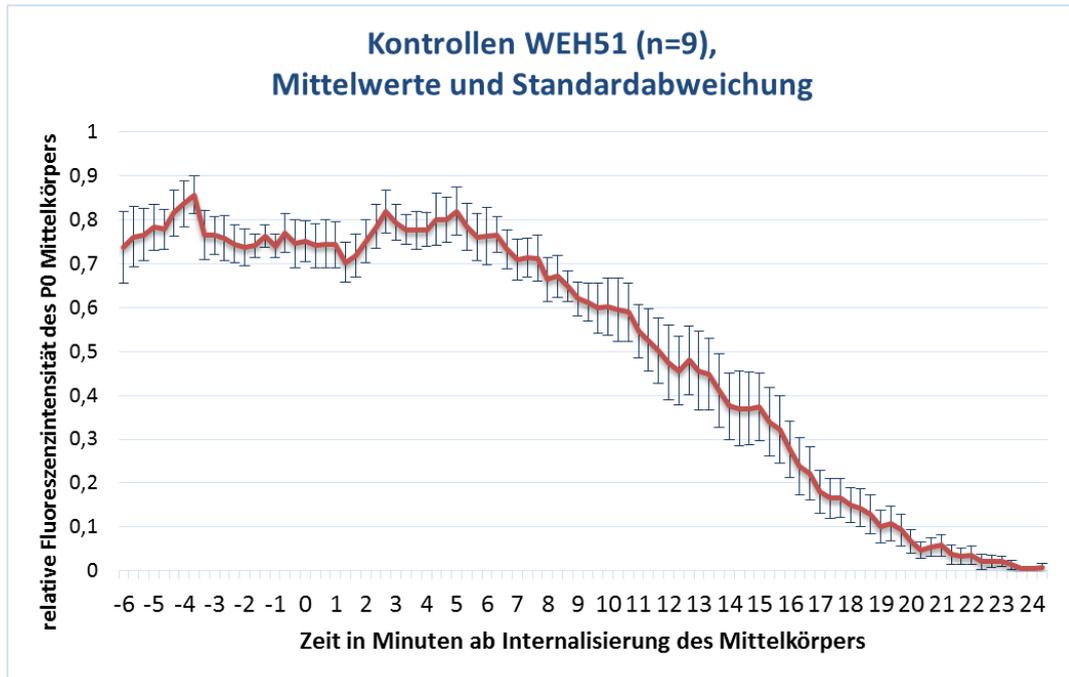


Abbildung 21: Fluoreszenzverlust der P0 Mittelkörper ab Internalisierung

Für den kontinuierlichen Verlust an Fluoreszenzintensität gibt es einige mögliche Erklärungen: Zum einen könnte er im Laufe der Aufnahme durch Ausbleichen zustande kommen. Daher werden Messungen von Werten einer internen Kontrolle angefertigt und das Ausbleichen soll rechnerisch kompensiert werden. Als interne Kontrolle werden die Werte der Fluoreszenzintensität des ersten Polkörpers verwendet. Der erste Polkörper entsteht während der Meiose I. Er eignet sich als interne Kontrolle, da er NMY-2 beinhaltet, permanent zu sehen ist und sich bewegungsarm und von Einflüssen weitgehend abgeschirmt in der Eischale befindet. Die Werte der Fluoreszenzintensität des ersten Polkörpers entsprechen annäherungsweise einer exponentiellen Kurve und nehmen deutlich langsamer ab als die eines Mittelkörpers. Daher ist Ausbleichen als Ursache für den Verlust an Fluoreszenz nicht plausibel, weil auch nach Berechnung von normierten Werten anhand der internen Kontrolle ein Abfall der Kurven der Fluoreszenzintensität zu sehen ist.

Der Verlust an Fluoreszenzintensität von NMY-2::GFP::ZF1 sowie von NMY-2::GFP kann des Weiteren der pH-Empfindlichkeit von GFP im sauren Milieu geschuldet sein (Kneen, Farinas et al. 1998). Nach der Phagozytose

wird das Phagosom saurer (Jensen and Bainton 1973). Um der Frage nachzugehen, ob eine Lokalisierung in einem sauren Zellbestandteilen die Abnahme der GFP-Fluoreszenz verursacht, wird NMY-2 alternativ mit mCherry dargestellt. Die mit GFP versehenen Mittelkörper (n=18, Abbildung 22 blaue und grüne Kurve) verlieren ab 15 Minuten nach Internalisierung an Fluoreszenz im Vergleich zu NMY-2::mCherry (n=5, rote Kurve). Da die Fluoreszenzintensität bei NMY-2::GFP sowie NMY-2::GFP::ZF1 deutlich schneller abnimmt als bei NMY-2::mCherry, scheint ein Kontakt des Mittelkörpers zu saurem Milieu nach der Internalisierung wahrscheinlich. Mutmaßlich verliert NMY-2::GFP::ZF1 aufgrund der Ansäuerung im Phagosom an Fluoreszenz und nicht wegen des Abbaus im Proteasom oder Lysosom. Daher sollte das Abbauverhalten von Mittelkörpern mit mCherry-Reportern getestet werden.

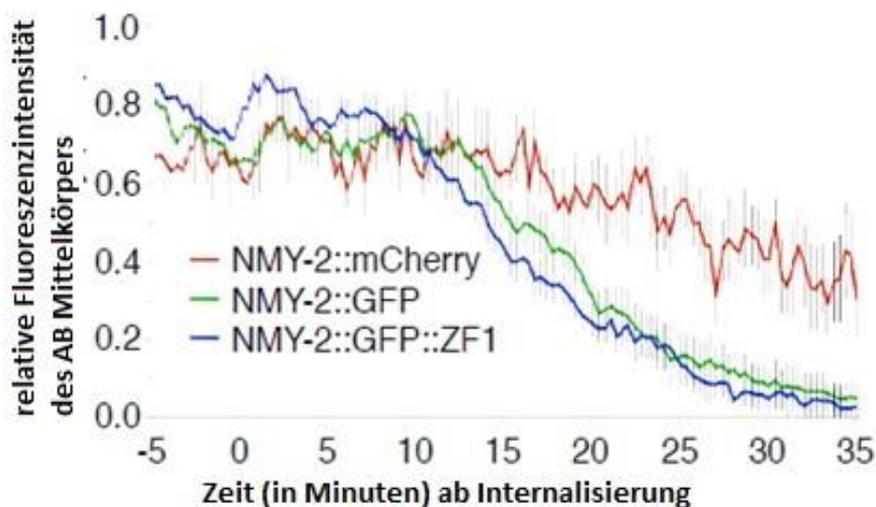


Abbildung 22: mCherry persistiert länger im Phagosom als GFP. Darstellung der Fluoreszenzintensität des AB Mittelkörpers im Verhältnis zur Zeit in Minuten nach Internalisierung in eine Zelle mittels dreier verschiedener Transgene: NMY-2::GFP::ZF1 (blau, n=11), NMY-2::GFP (grün, n=7) sowie mCherry::NMY-2 (rot, n=5). Die mit GFP dargestellten Mittelkörper beginnen 15 Minuten nach Internalisierung an Fluoreszenz zu verlieren, während NMY-2::mCherry deutlich länger zu sehen ist; veränderter Nachdruck mit freundlicher Genehmigung durch Company of Biologists LTD, Journal of Cell Science, Vol 129, S. 3721-3731, (Fazeli, Trinkwalder et al. 2016)

Der AB Mittelkörper bei Kontrollembryonen wird unter der Fragestellung analysiert, ob Mittelkörper vor dem ZF1-vermittelten Abbau geschützt sind, während sie sich auf der Zelloberfläche befinden. AB Mittelkörper werden

größtenteils von benachbarten Zellen der EMS-Linie aufgenommen (Ou, Gentili et al. 2014, Singh and Pohl 2014). Daher ist bei diesen eine Abgabe nach extrazellulär am Ende der Teilung der ABa- von der ABp-Zelle wahrscheinlich, bevor er durch Phagozytose in eine Tochter der EMS-Zelle gelangt. Der ABa-ABp Mittelkörper wird im Mittel 12,7 Minuten nach Beginn des Vierzellstadiums von einer EMS-Zelle oder deren Tochter internalisiert (n=9, WEH51). Der Abbau von ZF1 in Zellen der EMS-Reihe beginnt im Mittel 19,3 Minuten nach Beginn des Vierzellstadiums (n=9, WEH51). Die Fluoreszenz des AB Mittelkörpers (NMY-2::GFP::ZF1, [Abbildung 22](#)) bleibt während des Aufenthaltes an der Zelloberfläche sowie mehrere Minuten nach Internalisierung auf konstantem Niveau. Dies zeigt, dass der AB Mittelkörper vor dem ZF1-vermittelten Abbau geschützt ist. Erst 15 Minuten nach Internalisierung beginnt der Mittelkörper in der Regel an Fluoreszenzintensität zu verlieren, und 28 ± 6 Minuten nach Internalisierung ist der AB Mittelkörper nicht mehr zu sehen (n=11), was dem 15-Zell-Stadium entspricht.

Dem Abfall der Fluoreszenz könnte außerdem der Abbau des ZF1-Reporters durch das Proteasom zugrunde liegen (Reese, Dunn et al. 2000). Um der Frage nachzugehen, welche Rolle ZF1 und das Proteasom am Abbau dieser Reporter spielt, wird die Fluoreszenz von NMY-2::GFP (n=7) mit der von NMY-2::GFP::ZF1 (n=11) verglichen ([Abbildung 22](#)). Da sich die Werte und daraus generierten Kurven kaum unterscheiden, ist anzunehmen, dass die Abnahme der Fluoreszenz nicht durch den ZF1-vermittelten Abbau im Proteasom zustande kommt.

3.3. Nachweis der vollständigen Trennung der IZB mittels Phagozytose-Mutanten

Nachdem festgestellt wurde, dass Mittelkörper im Zeitraum zwischen Abszission und Internalisierung nicht ZF1-vermittelt degradieren, soll geprüft werden, ob ZF1-Reporter extrazellulär über ausreichend lange Zeit auf konstant hohem Niveau persistieren.

Um zu überprüfen, ob ZF1-Reporter extrazellulär über ausreichend lange Zeit persistieren habe ich die Fluoreszenzintensität (NMY-2::GFP::ZF1) von vier verschiedenen Mutanten gemessen, bei denen Mittelkörper nicht internalisiert werden: *ced-1*, *ced-2*, *abi-1* sowie *pat-3* (Abbildung 10, rot umkreist). Diese Proteine regulieren abhängig und/ oder unabhängig von CED-10 ein Aktgerüst an der Membran, welches zur Phagozytose benötigt wird.

ced-1 und *ced-2*

Phänotypisch konnte ich bei den Embryonen der *ced-1* sowie der *ced-2* Mutanten innerhalb der aufgezeichneten Zeit keinerlei Aufnahme der P0, AB und P1 Mittelkörper in eine Zelle beobachten (Tabelle 2, Abbildung 23).

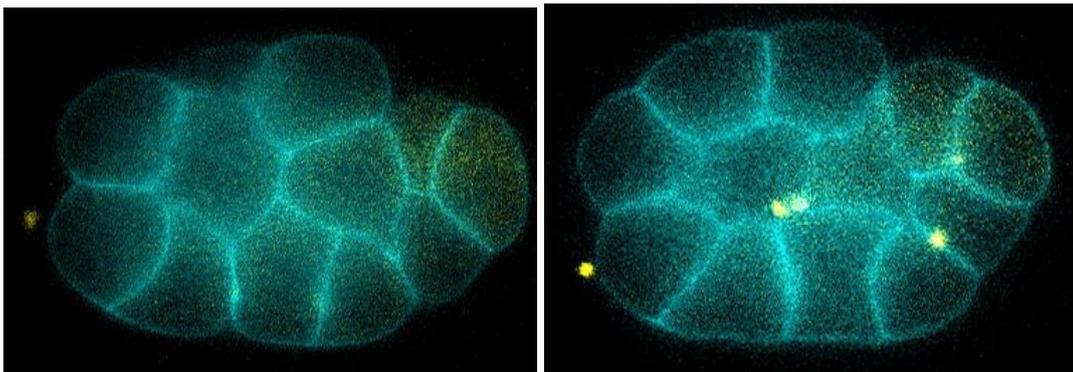


Abbildung 23: *ced-2* Mutant im 15-Zellstadium (rechts), zum Vergleich Kontrolle (links). Membranen (PH::mCherry) sind in blau sowie Mittelkörper und der erste Polkörper (jeweils linker Bildrand) in gelb (NMY-2::GFP::ZF1) dargestellt. Die Mittelkörper bei *ced-2* Mutanten werden bis zum 15-Zellstadium nicht in Zellen aufgenommen und nicht abgebaut. Zum Vergleich sind Mittelkörper bei Kontrollen im 15-Zellstadium internalisiert und abgebaut. Die fluoreszenzmikroskopischen Darstellungen werden freundlicherweise von Dr. Gholamreza Fazeli bereitgestellt. (verändert nach Fazeli, Trinkwalder et al. (2016))

Zudem fällt bei neun von zwölf *ced-2*-mutierten Embryonen auf, dass sich Mittelkörper an der äußeren Oberfläche des Embryos befinden, wo sie sich unabhängig bewegen. Daraus kann gefolgert werden, dass keine Verbindung des Mittelkörpers zu einer Zelle besteht, bei deren Entstehung er gebildet wurde (Fazeli, Trinkwalder et al. 2016).

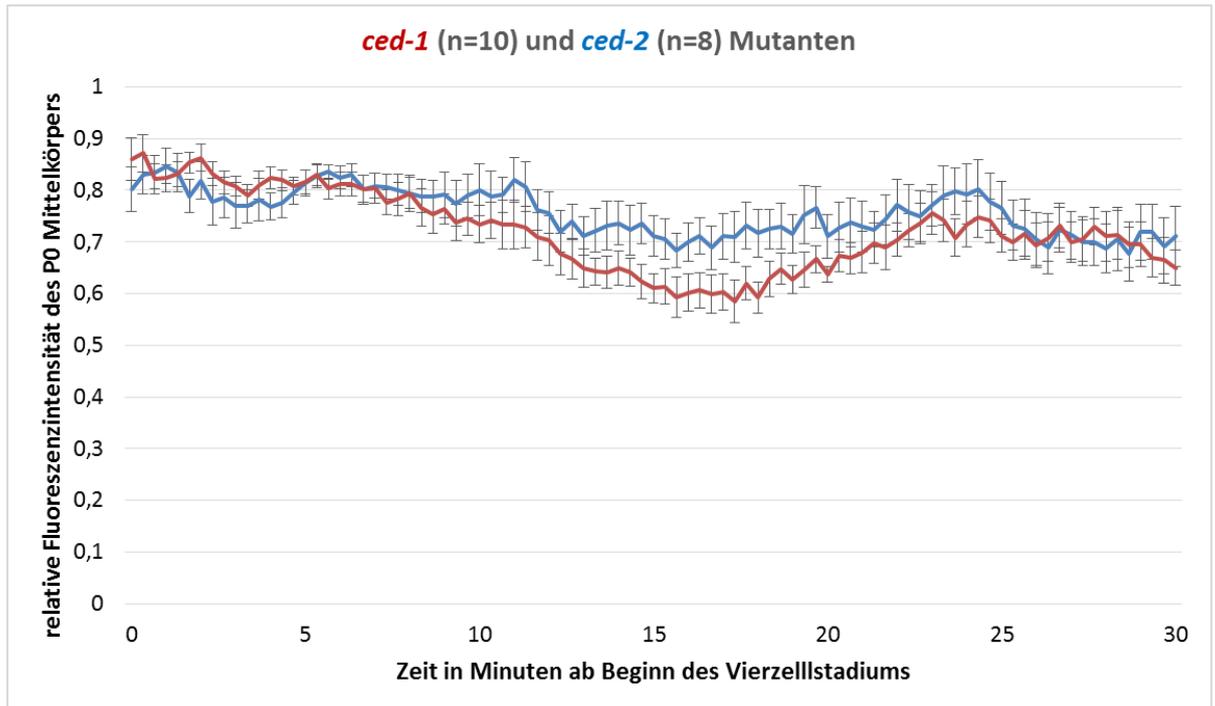


Abbildung 24: Bei *ced-1* sowie *ced-2* Mutanten wird der ZF1-Reporter der P0 Mittelkörper nicht abgebaut. Die Werte der relativen Fluoreszenzintensität der P0 Mittelkörper (NMY-2::GFP::ZF1; Mittelwert und Standardabweichung) und somit der ZF1-Reporter bleiben bis 30 Minuten nach Beginn des Vierzellstadiums in etwa konstant erhalten, phänotypisch werden die Mittelkörper erwarteterweise nicht internalisiert.

Bei den zehn analysierten *ced-1* sowie den acht ausgewerteten *ced-2* Mutanten nimmt die NMY-2::GFP::ZF1 Fluoreszenz bei P0 (Abbildung 24), AB und P1 Mittelkörpern kaum ab. ZF1-Reporter zeigen auch 30 Minuten nach Beginn des Vierzellstadiums noch konstant hohe Werte an Fluoreszenz. Die Mittelkörper unterliegen keinem ZF1-vermitteltem Abbau, haben folglich keinen Zugang zum Zytoplasma und befinden sich extrazellulär an der Zelloberfläche. Meine Daten bestätigen Beobachtungen von Ou, Gentili et al. (2014), wonach die Internalisierungen der ersten drei Mittelkörper einer funktionierenden und von CED-10/RAC1 abhängigen Phagozytose bedürfen. Die Daten zeigen, dass ZF1-Reporter extrazellulär über ausreichend lange Zeit persistieren.

abi-1

Anhand der *abi-1* RNAi Mutanten wird ein dritter Signalweg der Phagozytose (neben CED-1 und CED-2) betrachtet, der in CED-10 mündet.

Die Behandlung von Mutanten mit *abi-1* RNAi führte nur bei einem Teil der Fälle zur erwarteten phänotypischen Ausprägung im Sinne einer fehlenden Internalisierung der P0, AB und P1 Mittelkörper. Dies könnte auf den unvollständigen „knockdown“ durch RNAi zurückgeführt werden. In Tabelle 2 wird deutlich, dass bei 66% von 12 betrachteten P0 Mittelkörpern keine Internalisierungen bis Filmende erfolgen. Die Analyse dieser acht Embryonen mit internalisierenden Mittelkörpern und mutmaßlich unvollständigem „knockdown“ durch RNAi zeigt eine Abnahme der gemessenen Fluoreszenz-Werte (Abbildung 25, rote Kurve). Im Vergleich mit Kontrollen (Abbildung 25, grüne Kurve) nimmt die Fluoreszenz der P0 Mittelkörper langsamer ab, was auf eine Restaktivität der *abi-1* RNAi hindeuten könnte.

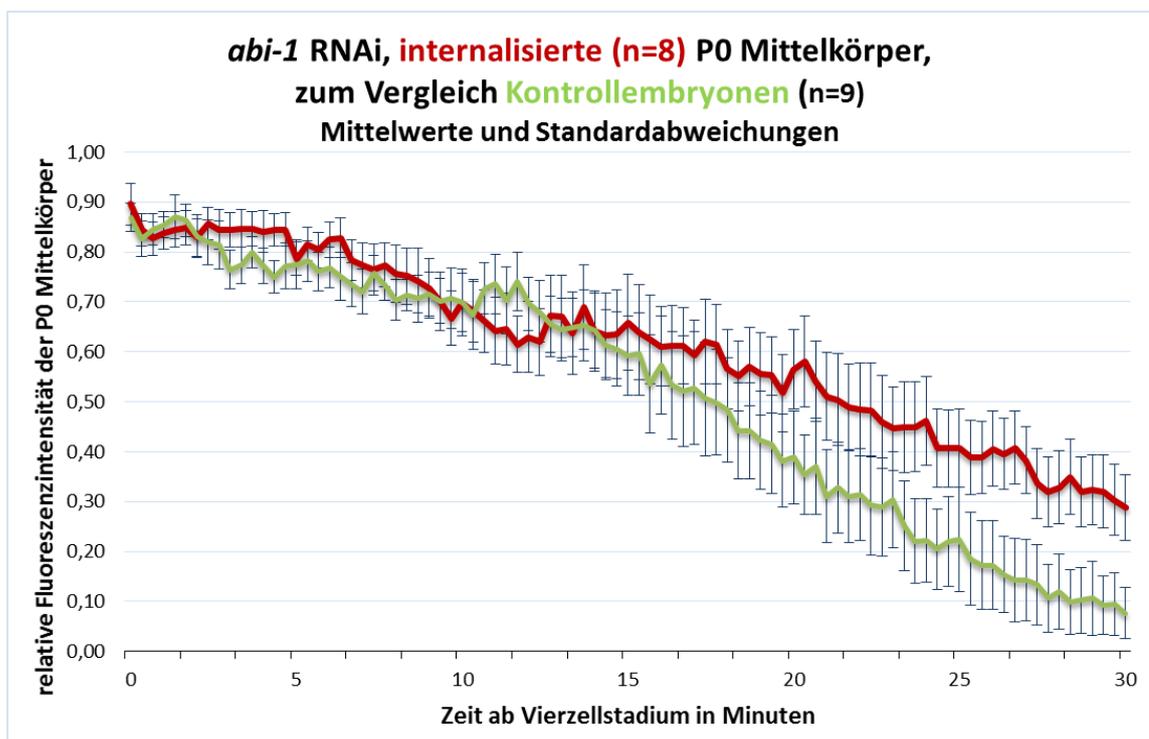


Abbildung 25: Fluoreszenz der internalisierten P0 Mittelkörper bei *abi-1* RNAi Mutanten, Mittelwert und Standardabweichung der internalisierten (rot, n=8) P0 Mittelkörper (NMY-2::GFP::ZF1), im Vergleich dazu P0 Mittelkörper von Kontrollen WEH51 (grün, n=9): die relative Fluoreszenzintensität im Verhältnis zur Zeit in Minuten ab Vierzellstadium nimmt bei internalisierten P0 Mittelkörpern bei *abi-1* RNAi Mutanten langsamer ab als bei Kontrollen

Vier *abi-1* RNAi Embryonen zeigen phänotypisch - wie es für Phagozytose-Mutanten zu erwarten ist - ausbleibende Internalisierungen von

Mittelkörpern. Es zeigt sich ein konstanter Wert der Fluoreszenzintensität des P0 Mittelkörpers (Abbildung 26, blaue Kurve), ähnlich denen der Phagozytose-Mutanten *ced-1* und *ced-2*.

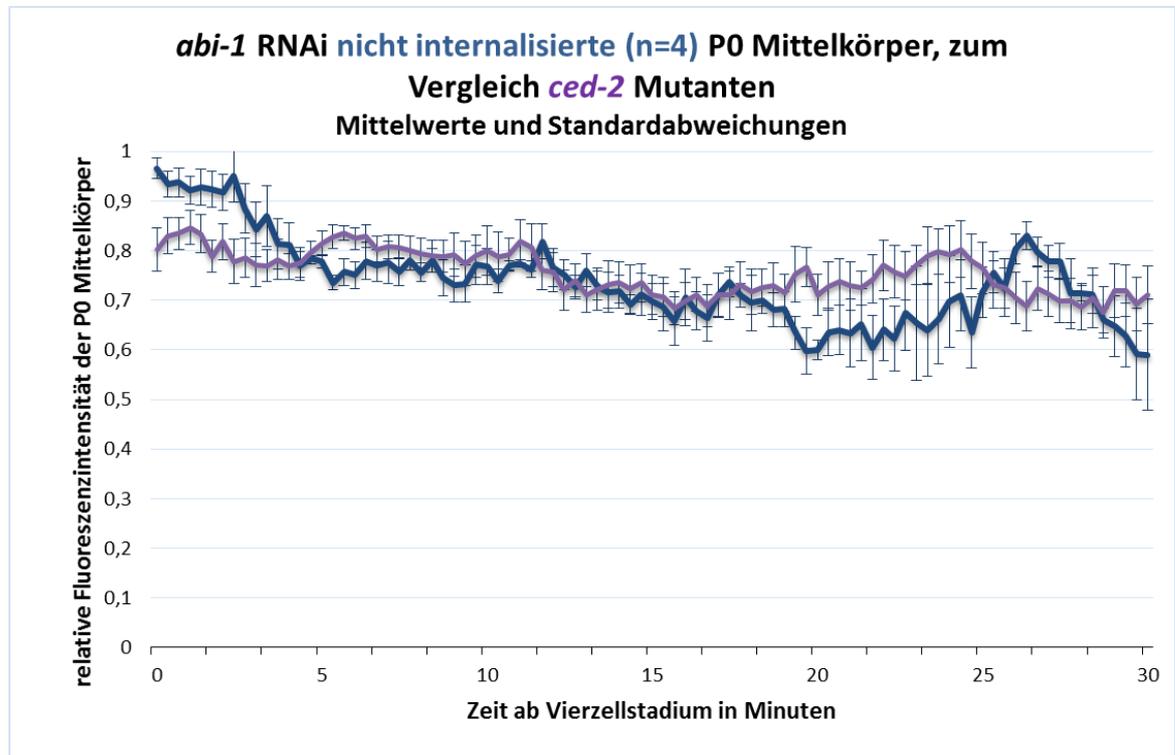


Abbildung 26: Fluoreszenz von nicht internalisierten Mittelkörpern bei *abi-1* RNAi Mutanten, Mittelwert und Standardabweichung der nicht internalisierten P0 Mittelkörper (blau, n=4) (NMY-2::GFP::ZF1), im Vergleich dazu P0 Mittelkörper von *ced-2* Mutanten (lila, n=8): die relative Fluoreszenzintensität im Verhältnis zur Zeit in Minuten ab Vierzellstadium bleibt bei beiden konstant erhalten.

Die Daten zeigen, dass ein dritter Signalweg neben CED-1 und CED-2, für die Phagozytose von Mittelkörpern benötigt wird.

pat-3

Die Phagozytose kann auch unabhängig von CED-10 über einen Signalweg über das α -Integrin PAT-2 und das β -Integrin PAT-3 ablaufen. (Neukomm, Zeng et al. 2014). Es ist bisher ungeklärt, ob PAT-3 („paralyzed at two-fold“) an der Internalisierung von Mittelkörpern bei *C. elegans* Embryonen beteiligt sind. Deswegen soll getestet werden, ob die Internalisierungen der P0, AB und P1 Mittelkörper durch Anwendung von *pat-3* RNAi beeinflusst werden. Zunächst wurde geprüft, ob die *pat-3* RNAi exprimiert wird, indem andere

Embryonen desselben phänotypisch beobachtet wurden (Fazeli, Trinkwalder et al. 2016).

Phänotypisch kann zudem im Vergleich mit Kontrollen bei *pat-3* RNAi Mutanten kein Unterschied bezüglich Zeitpunkt und Art der Internalisierung festgestellt werden (Tabelle 2). Die relative Fluoreszenzintensität des P0 Mittelkörpers (Abbildung 27) nimmt vergleichbar mit der von Kontrollen ab. Bei *pat-3* RNAi Mutanten können keine Auswirkungen auf die Internalisierung der P0, AB und P1 Mittelkörper beobachtet werden. Ob *pat-3* RNAi nicht effizient ist oder ob PAT-3/ β -Integrin nicht nötig ist, um Mittelkörper in Zellen aufzunehmen, muss noch geklärt werden.

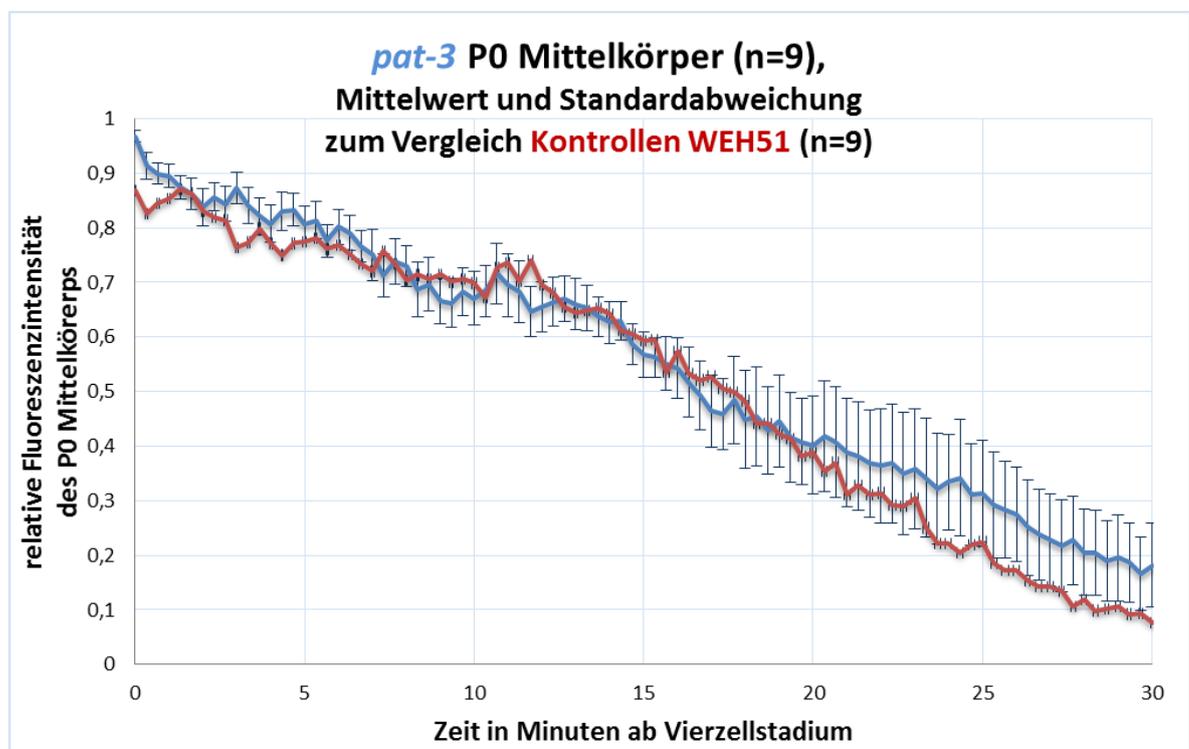


Abbildung 27: Fluoreszenz der Mittelkörper von *pat-3* RNAi Mutanten: Mittelwerte und Standardabweichung der relativen Fluoreszenzintensität (NMY-2::GFP::ZF1) der P0 Mittelkörper bei *pat-3* Mutanten (n=9) nehmen nach Internalisierung ab und ähneln denen von Kontrollembryonen WEH51 (rote Kurve, n=9)

Zusammenfassend kann auf der Grundlage der ZF1-Analysen von *ced-1*, *ced-2*, *abi-1* und *pat-3* Mutanten festgestellt werden, dass die Internalisierung von Mittelkörpern von Proteinen abhängig ist, die die Phagozytose über CED-10 regulieren, nämlich CED-1/Draper, CED-2/CrkII, and ABI-1/Abi1 (Neukomm, Zeng et al. 2014).

Zudem kann in Zusammenschau der Ergebnisse festgestellt werden, dass die ZF1-Analyse geeignet ist um einen Kontakt des Mittelkörpers zum Zytoplasma nachzuweisen. Mithilfe der ZF1-Technik kann gezeigt werden, dass Mittelkörper im Zeitraum zwischen Abszission und Internalisierung nicht ZF1-vermittelt degradieren. Sowohl solche Mittelkörper bleiben vom ZF1-vermittelten Abbau verschont, die von Nachbarzellen (ohne Beziehung zum Mittelkörper) internalisiert werden, als auch Mittelkörper, die später von Tochterzellen aufgenommen werden.

3.4. Bestätigung der Rolle von Phagozytose mit Aktin

Es ist bekannt, dass die Internalisierung von Mittelkörpern unter Nutzung eines Aktingerüsts über den Vorgang der Phagozytose stattfinden kann, was elektronenmikroskopisch bei Säugetierzellen in Kultur beobachtet wurde (Crowell, Gaffuri et al. 2014). Die Polymerisierung von Aktinfilamenten wird zur Bildung einer tassenähnlichen Struktur bei der Phagozytose benötigt und wird durch CED-10/ RAC1 aktiviert (Freeman and Grinstein 2014).

Übereinstimmung von Internalisierung und Phagozytose

Zunächst soll nachgewiesen werden, dass der Zeitpunkt der Internalisierung des Mittelkörpers mit dem Zeitpunkt der Phagozytose übereinstimmt. Dies erfolgt über eine Analyse der Akkumulation von Aktin, welche sich kurz vor der Phagozytose um den Zellkörper ereignet. Der Zeitpunkt der Aktinansammlung wird auf seinen zeitlichen und örtlichen Zusammenhang mit der Internalisierung des P0 Mittelkörpers geprüft.

Für die Auswertungen ist eine Rasse von *C. elegans* ausgewählt, in der Mittelkörper durch NMY-2::GFP sowie Aktinfilamente durch pie-1::lifeACT::RFP dargestellt sind. Lifeact ist ein Peptid, bestehend aus 17 Aminosäuren und färbt Aktinfilamente in eukaryoten Zellen an. LifeAct beeinflusst nicht die Dynamik von Aktin und ermöglicht deren Visualisierung. (Riedl, Crevenna et al. 2008, Singh and Pohl 2014)

Die Daten zeigen eine erhöhte Intensität der LifeAct Fluoreszenz vor der Mittelkörperinternalisierung und einen anschließenden Rückgang (Abbildung 28). Die Internalisierung des P0 Mittelkörpers fand bei den 14 analysierten Kontrollembryonen 7 ± 4 Minuten nach Beginn des Vierzellstadiums statt. Eine Akkumulation von Aktin um den P0 Mittelkörper ist bereits während des Zweizellstadiums beschrieben, welche mit der Ausrichtung der Polarität des Embryos in Verbindung gebracht wird (Singh and Pohl 2014). Daher wird hier näher betrachtet, ob diese Anhäufungen von Aktin in einem Zusammenhang zueinanderstehen oder unabhängig voneinander sind.

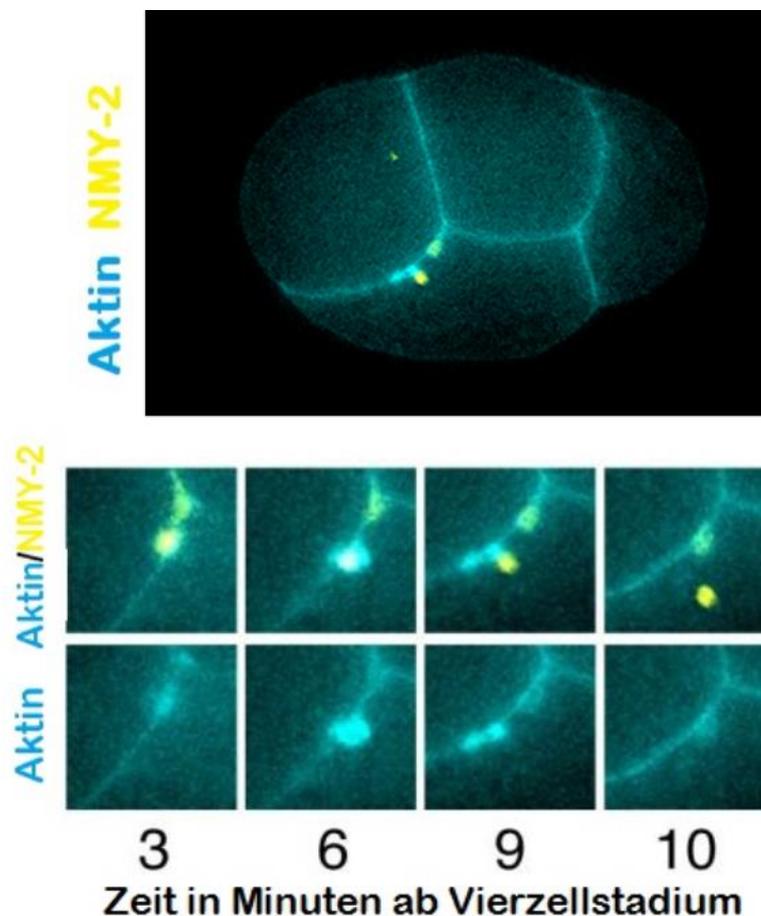


Abbildung 28: Aktin (blau) akkumuliert um den P0 Mittelkörper (gelb) vor der Internalisierung, oben Kontrollembryo im Vierzellstadium, unten Bildausschnitte 3, 6, 9 und 10 Minuten nach Beginn des Vierzellstadiums, die eine hohe Dichte an Aktinfilamenten vor der Internalisierung des P0 Mittelkörpers zeigen. Die fluoreszenzmikroskopischen Darstellungen werden freundlicherweise von Dr. Gholamreza Fazeli bereit gestellt. Modifiziert nach (Fazeli, Trinkwalder et al. 2016)

Zunächst wurde die LifeAct Fluoreszenzintensität bei Kontrollembryonen gemessen. Hierbei zeigten sich zwei wellenförmig verlaufende Anhäufungen von LifeAct Fluoreszenzintensität (Abbildung 29). Die erste Welle beginnt ca 10 Minuten vor Beginn des Vierzellstadiums und nimmt bis zum Vierzellstadium hin ab (Abbildung 32).



Abbildung 29: Zwei Wellen der Aktinakkumulation um den P0 Mittelkörper. Vor Beginn des Vierzellstadiums ist bei Kontrollembryonen (n=13) eine erste Verdichtung der LifeAct::mCherry Fluoreszenzintensität um den P0 Mittelkörper herum zu sehen (Singh and Pohl 2014), kurz vor der Internalisierung des P0 Mittelkörpers, welche üblicherweise einige Minuten nach Beginn des Vierzellstadiums stattfindet, ist eine zweite Ansammlung von Aktinfilamenten um den P0 Mittelkörper sichtbar; modifiziert nach (Fazeli, Trinkwalder et al. 2016)

Die zweite wellenförmige Zunahme der LifeAct Fluoreszenzintensität nimmt kurz vor der Internalisierung des P0 Mittelkörpers in die Zelle zu (Abbildung 30). Diese zweite Welle beginnt 6 ± 3 Minuten bevor der P0 Mittelkörper internalisiert wird, kurz nach dem Beginn des Vierzellstadiums. Sie endet kurz nachdem der Mittelkörper von einer Zelle aufgenommen worden ist. Die zweite Welle der Aktinanreicherung um den P0 Mittelkörper stimmt mit dem Zeitpunkt der Internalisierung überein. Auch vor der Internalisierung des AB sowie des P1 Mittelkörpers sind Ansammlungen von Aktin zu sehen. Der Zeitpunkt der Phagozytose eines Mittelkörpers kann durch Beobachtung der Aktinansammlung (LifeAct::RFP) um diesen herum abgeschätzt werden.

**P0 Mittelkörper von BV 113 Kontrollembryonen (n=14),
Mittelwert und Standardabweichung der Life Act Fluoreszenz**

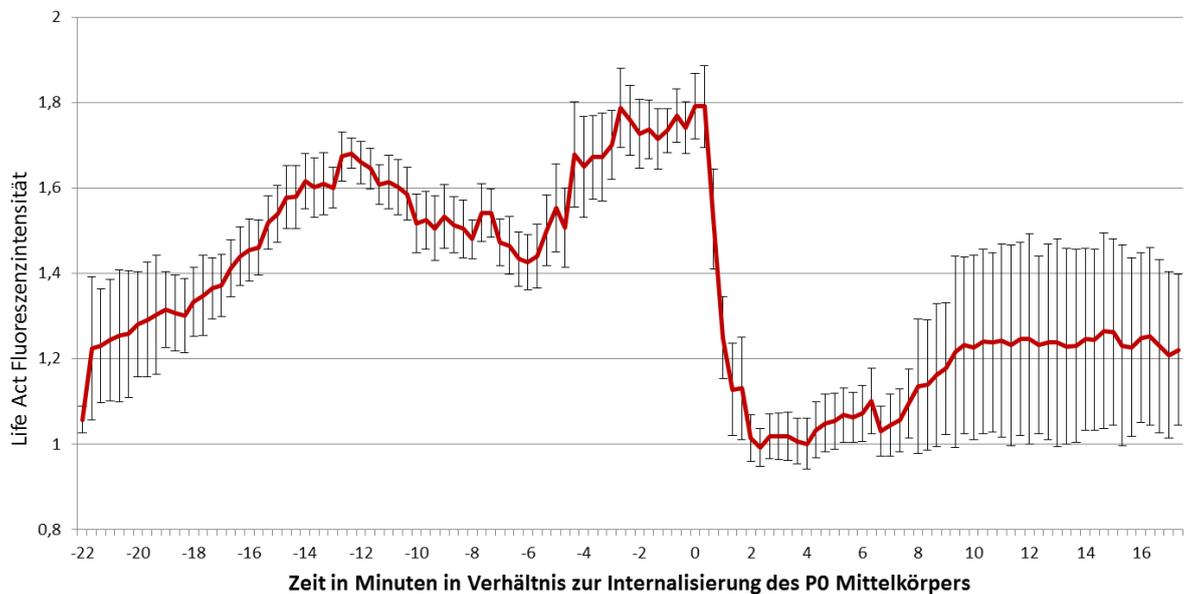


Abbildung 30: Die zweite Welle der Aktinansammlung stimmt mit dem Phagozytose-Zeitpunkt überein. Fluoreszenzintensität von mittels LifeAct dargestellten Aktinfilamenten um den P0 Mittelkörper bei Kontrollembryonen BV113, normiert zum Zeitpunkt der Internalisierung des P0 Mittelkörpers.

Phagozytose von Aktin und CED-10 abhängig

Um zu bestätigen, dass die zweite wellenförmige Ansammlung von Aktinfilamenten um den P0 Mittelkörper um den Zeitpunkt der Internalisierung erfolgt, soll geprüft werden, ob Mutanten mit Unfähigkeit zur Phagozytose diese Ansammlung aufweisen. Das Signalprotein CED-2 aktiviert das Rac1 Homolog CED-10, was eine Umorganisation von Aktin entlang der Membran zur Folge hat (Chai, Tian et al. 2012, Ou, Gentili et al. 2014). Daher habe ich die *ced-2* Mutanten-Linie WEH85 analysiert, bei denen Mittelkörper mit NMY-2::GFP dargestellt sind sowie Aktinfilamente durch LifeAct::RFP.

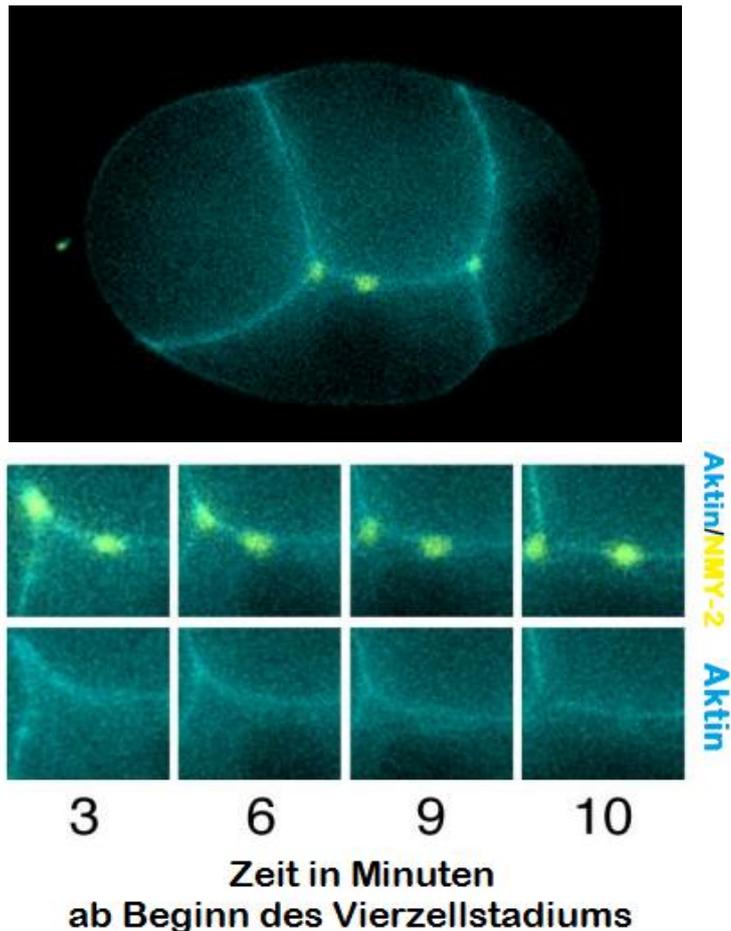


Abbildung 31: *ced-2* Mutant im Vierzellstadium; Bei *ced-2* Mutanten ist keine Akkumulation von Aktin (blau) um den P0 Mittelkörper (gelb) zu sehen und dieser wird nicht internalisiert, unten Bildausschnitte zu Zeitpunkten an denen Internalisierung zu erwarten wäre (verändert nach (Fazeli, Trinkwalder et al. 2016)). Die fluoreszenzmikroskopischen Darstellungen werden freundlicherweise von Dr. Gholamreza Fazeli bereit gestellt.

Phänotypisch werden bei diesen *ced-2* Mutanten in frühen Embryonalstadien wie erwartet keine Mittelkörper internalisiert. Bei Betrachtung der LifeAct Fluoreszenz um einen Mittelkörper zu Zeitpunkten, an denen eine Internalisierung zu erwarten wäre, ist keine Zunahme der Fluoreszenz zu beobachten (Abbildung 31).

Auch eine quantitative Analyse (Abbildung 32) zeigt, dass die zweite wellenförmige Ansammlung von Aktinfilamenten um den P0 Mittelkörper bei *ced-2* Mutanten ausbleibt (Abbildung 32). Während des Vierzellstadiums – dem Zeitpunkt, an dem eine Internalisierung des Mittelkörpers zu erwarten wäre – wurde die Fluoreszenz gemessen.

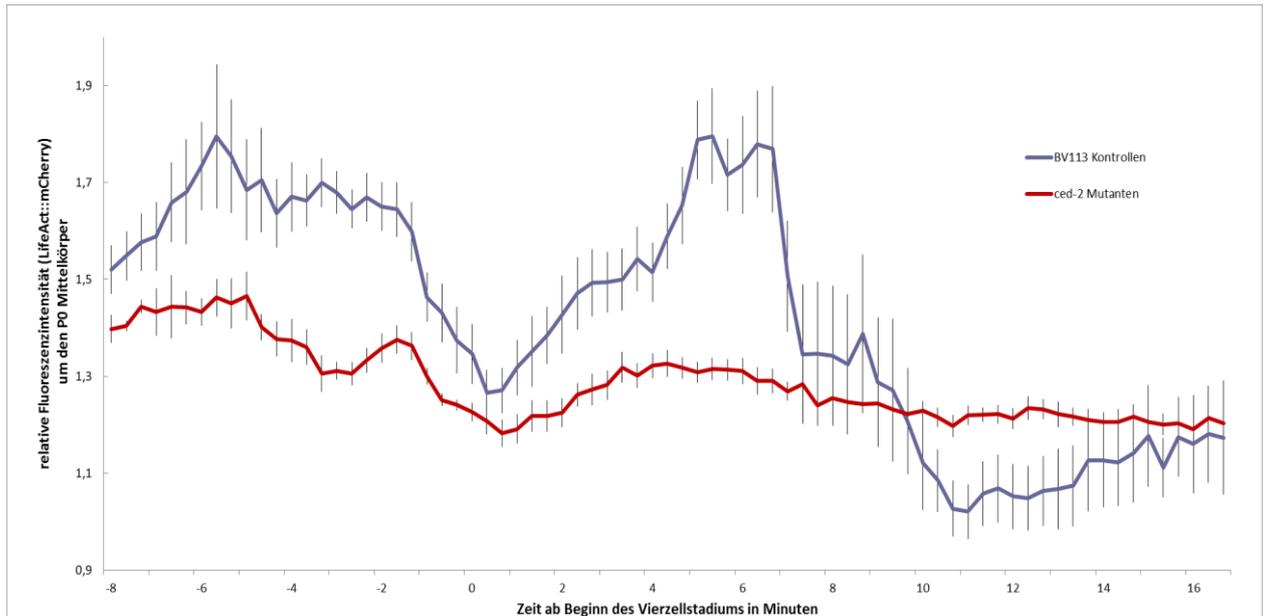


Abbildung 32: Bei ausbleibender Internalisierung ist keine zweite Aktinwelle zu sehen. Eine Akkumulation von Aktinfilamenten (LifeAct::RFP) um den P0 Mittelkörper ist bei Kontrollen (blau, n=11 oben, 13 unten) vor der Internalisierung zu sehen. Die Internalisierung des P0 Mittelkörpers ereignet sich 7 ± 4 Minuten nach Beginn des Vierzellstadiums. Bei *ced-2* (rot, n=10 oben, 11 unten) Mutanten sind im Vergleich stark reduzierte LifeAct Fluoreszenzintensitäten bei phänotypisch ausbleibenden Internalisierungen zu beobachten (modifiziert nach (Fazeli, Trinkwalder et al. 2016))

Die Ergebnisse zeigen dass die Internalisierung über eine CED-10/Rac1-abhängige Umordnung von Aktin geschieht. Die Daten deuten darauf hin, dass die zweite Welle mit der Phagozytose des Mittelkörpers zusammenhängt und dass bevorstehende Internalisierungen von Mittelkörpern durch Umordnungen des Aktin Zytoskeletts vorhergesagt werden können. Die Daten deuten auch an, dass die zwei Wellen genetisch trennbar sind.

PAR-1 zeigt Unabhängigkeit der beiden Aktinwellen voneinander

Um zu bestätigen, dass die erste Welle der Aktinakkumulation unabhängig von der zweiten Welle verläuft, werden Embryonen betrachtet, in denen die erste Welle nicht vorhanden ist. Singh and Pohl (2014) beobachteten, dass die wellenförmige Anreicherung von Aktin um den Mittelkörper während des Zweizellstadiums von PAR-2 abhängig ist. PAR-1 und PAR-2 haben zudem

unter anderem Einfluss auf die anterior-posteriore Ausrichtung von *C. elegans* Embryonen (Gomes and Bowerman 2002).

Es werden Embryonen analysiert, die mit *par-1* RNAi behandelt wurden.

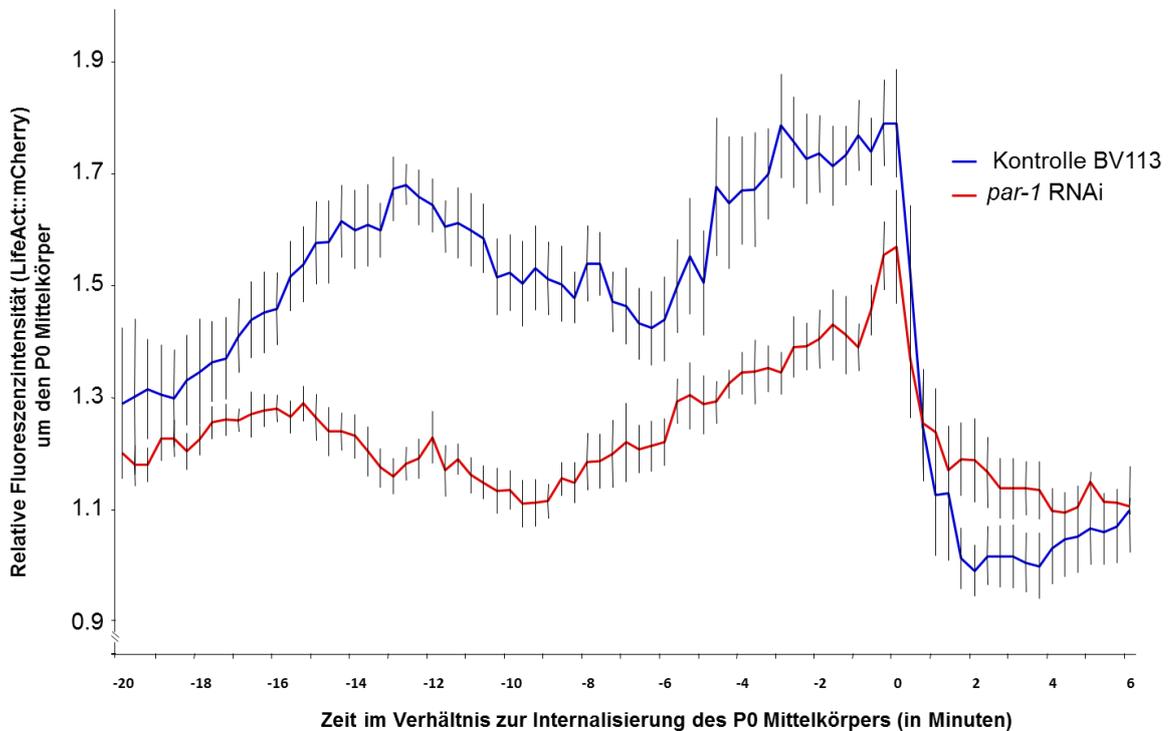


Abbildung 33: Die beiden Wellen der Aktinansammlung sind genetisch trennbar und verlaufen voneinander unabhängig. Bei *par-1* RNAi Mutanten ist nur die zweite Welle der Aktinansammlung kurz vor der Internalisierung des Mittelkörpers zu beobachten. Die erste Welle der Aktinanhäufung im Zweizellstadium ist bei *par-1* RNAi Mutanten im Gegensatz zu Kontrollen nicht zu sehen.

Bei *par-1* RNAi Mutanten erfolgt keine erste wellenförmige Anhäufung von Aktin, während die zweite Welle ungestört vonstatten geht (Abbildung 33). Mittelkörper in *par-1* Mutanten werden internalisiert (Tabelle 2).

Anhand der Zeitpunkte der Daten von *ced-2* und *par-1* Mutanten kann nachgewiesen werden, dass die zweite Welle der Aktinakkumulation zur Phagozytose des Mittelkörpers führt und dass die beiden Wellen genetisch trennbar sind und unabhängig voneinander ablaufen. Die beiden Wellen werden unabhängig voneinander reguliert und führen zu unterschiedlichen Vorgängen.

3.5. Lipidtransporter-Mutanten

Nachdem gezeigt wurde, dass die Aufnahme von Mittelkörpern in Zellen über Phagozytose durch eine von CED-10 abhängige Umordnung von Aktin erfolgt, sollen auch andere Proteine wie Lipidtransporter auf ihre Beteiligung an der Internalisierung von Mittelkörpern geprüft werden. Die asymmetrische Verteilung von Phospholipiden entlang der Plasmamembran leistet unter anderem einen wichtigen Beitrag zum Erhalt der Integrität der Zelle und sie ist von Bedeutung in der Regulierung intrazellulärer Signalwege. Phosphatidylserin (PtdSer) und Phosphatidylethanolamin (PtdEth) sind zytosolseitig an Plasmamembranen vorzufindende Lipide, deren Asymmetrie entlang der Membran bei *C. elegans* durch Lipidtransporter der P4-ATPase-Familie gewährleistet wird. Sie sind im Rahmen der Phagozytose von Bedeutung (Emoto, Kobayashi et al. 1996, Darland-Ransom, Wang et al. 2008). Die Asymmetrie von Lipiden entlang der Zellmembran könnte daher eine Rolle bei der Internalisierung von Mittelkörpern per Phagozytose spielen. Aus diesem Grunde werden im Folgenden mutierte *C. elegans* Embryonen mit mangelhafter Ausprägung der Lipidtransporter TAT-1 und TAT-5 betrachtet.

tat-1

Zunächst werden die P0 Mittelkörper bei *tat-1* Mutanten hinsichtlich ihres Verhaltens bei der Internalisierung betrachtet. Diese dauert im Vergleich mit Wildtypen ähnlich lange (Tabelle 2). Die Daten deuten darauf hin, dass PtdSer keinen Einfluss auf den zeitlichen Ablauf der Internalisierung hat. Erstaunlicherweise ist bei *tat-1* Mutanten zu sehen, dass sich der P0 Mittelkörper bei 92% der zwölf analysierten Mutanten in zwei oder mehr Fragmente aufteilt, während dies bei Wildtypen nur bei 6% von 18 analysierten Embryonen der Fall ist. Auch der AB Mittelkörper teilte sich in 17% der zwölf beobachteten Fälle in mehrere Fragmente auf, was bei 17 Kontrollen nie der Fall war (Fazeli, Trinkwalder et al. 2016). Die Daten deuten darauf hin, dass eine erhöhte Anzahl von PtdSer auf der

Zelloberfläche zu häufigeren Internalisierungen von Mittelkörperfragmenten führt.

Die einzelnen Mittelkörperfragmente können von verschiedenen Zellen aufgenommen werden. Beispielsweise zerfällt beim Embryo WEH 75-4 sieben Minuten nach Beginn des Vierzellstadiums der P0 Mittelkörper in Stücke, woraufhin ein großer Teil in die EMS Zelle und ein kleinerer in die Aba Zelle gelangt. Auffallend häufig wurden Teile des P0 Mittelkörpers von Tochterzellen der Aba Zelle internalisiert, bei *tat-1* Mutanten geschah dies in 67% der betrachteten Fälle im Vergleich zu 15% bei Kontrollembryonen. Es wäre nicht möglich, dass verschiedene Zellen Teile des zersplitterten P0 Mittelkörpers aufnehmen können, wenn die Abtrennung der interzellulären Brücke nur auf einer Seite des Mittelkörpers mit nachfolgender Autophagie durch eine Tochterzelle geschähe (Fazeli, Trinkwalder et al. 2016).

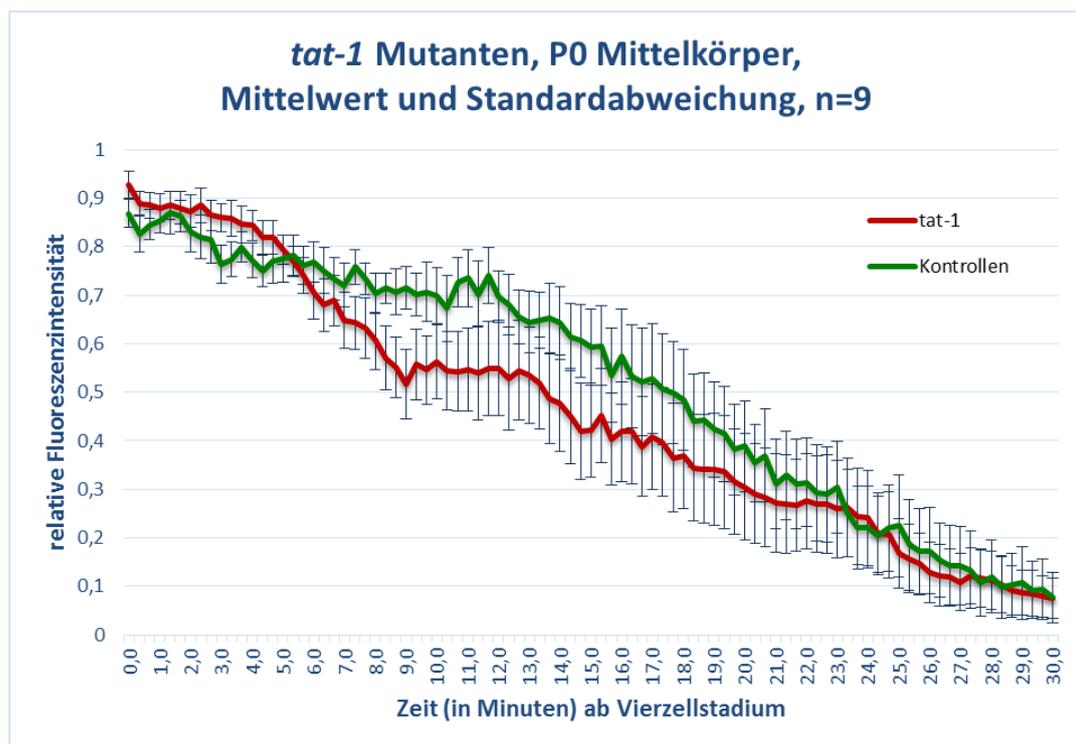


Abbildung 34: Bei *tat-1* Mutanten verlieren Mittelkörper an Fluoreszenz. Die relative Fluoreszenzintensität der P0 Mittelkörper (NMY-2::GFP::ZF1) von *tat-1* Mutanten (n=9) nimmt ab. Die Mittelkörper zersplittern und internalisieren in Zellen. Bei zersplitterten P0 Mittelkörpern habe ich das hellste Fragment weiterverfolgt.

Um zu testen, ob die Phagosomen sich in *tat-1* Mutanten normal verhalten, habe ich NMY-2::GFP::ZF1 gemessen. Bei den Auswertungen habe ich

stets das größte und hellste Fragment weiterverfolgt und gemessen. Anhand der Kurven der ZF1 abhängigen Fluoreszenzintensität (Abbildung 34) ist zu sehen dass diese bei P0 Mittelkörpern bei *tat-1* Mutanten abnimmt, ähnlich der Kurven der Wildtypen. Die Daten deuten darauf hin, dass der Abbau des Mittelkörpers im Phagosom bei *tat-1* Mutanten im Vergleich zu Kontrollen vergleichbar abläuft.

tat-5

Die PtdEth-Flippase TAT-5 verhindert, dass PtdEth auf der Zelloberfläche exprimiert wird. PtdEth kommt während der Zytokinese auf der Zelloberfläche vor und muss für eine erfolgreiche Abszission wieder verschwinden (Emoto, Kobayashi et al. 1996). Die Asymmetrie von PtdEth entlang der Zellmembran könnte einen Einfluss auf die Internalisierung von Mittelkörpern haben, jedoch ist TAT-5 bisher nicht direkt mit Phagozytose in Verbindung gebracht worden. Daher werden die P0, AB und P1 Mittelkörper (NMY-2::GFP::ZF1) von *tat-5* RNAi Mutanten dahingehend analysiert.

Bei *tat-5* Mutanten werden die P0 Mittelkörper in keinem der elf beobachteten Embryonen internalisiert (Abbildung 35). Sie bleiben stattdessen bis zum Filmende, also ca 60 bis 90 Minuten lang, an der Zelloberfläche sichtbar. Auch bei P1 Mittelkörpern findet bei elf beobachteten Embryonen keine Internalisierung bis Filmende statt, die AB Mittelkörper werden in 91% von elf analysierten Mutanten nicht in Zellen aufgenommen. Phänotypisch verhalten sich die P0, AB und P1 Mittelkörper der *tat-5* Mutanten ähnlich denen der Mutanten der Phagozytose (*ced-1*, *ced-2*, *abi-1*) (Tabelle 2).

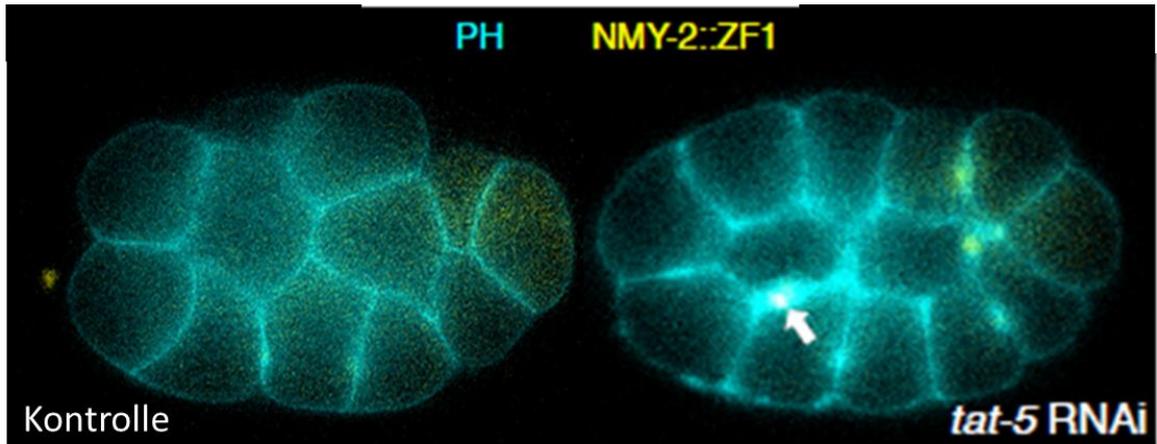


Abbildung 35: keine Internalisierung und erhaltene Fluoreszenzintensität bei *tat-5* Mutant (rechts) im Vergleich zur Kontrolle (links) im 15-Zellstadium. NMY-2::GFP::ZF1 in gelb sowie PH-Domäne der Membranen in blau dargestellt. Die fluoreszenzmikroskopischen Darstellungen werden freundlicherweise von Dr. Gholamreza Fazeli bereitgestellt.

Unter der Hypothese, dass TAT-5 Abszission oder Phagozytose kontrollieren könnte, wird eine quantitative Auswertung der ZF1-vermittelten Fluoreszenzintensität angefertigt. Hierbei ist zu sehen, dass diese in *tat-5* Mutanten bis zum Filmende vom Abbau im Proteasom verschont bleibt (Abbildung 36). Diese Ergebnisse legen erstmals nahe, dass Mittelkörper in *tat-5* Mutanten keinen Kontakt zum Zytoplasma haben und dass TAT-5 und/oder die Asymmetrie von PtdEth an der Zellmembran zur Phagozytose notwendig sind (Fazeli, Trinkwalder et al. 2016). Zudem konnte kein auffälliger Defekt der Abszission bei *tat-5* Mutanten beobachtet werden.

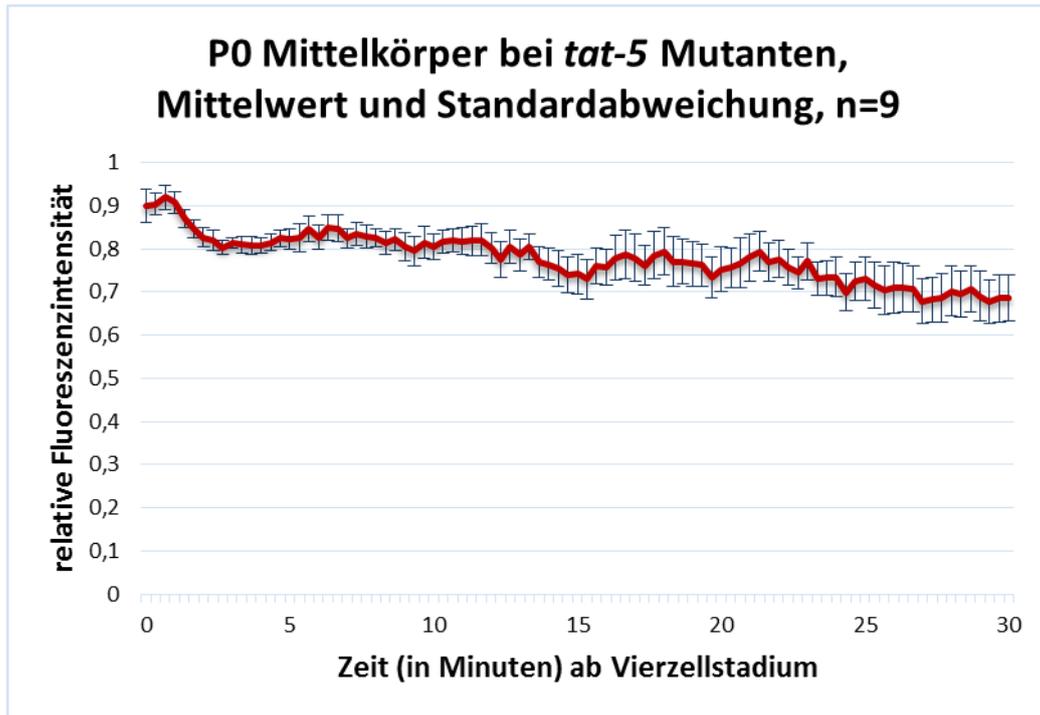


Abbildung 36: Mittelkörper bei *tat-5* RNAi Mutanten zeigen konstante Fluoreszenz. Der P0 Mittelkörper (NMY-2::GFP::ZF1; n=9) wird bei *tat-5* RNAi Mutanten nicht angesäuert, da er sich nicht im Phagosom befindet, und nicht ZF1-abhängig abgebaut.

Nachdem bei *tat-5* Mutanten in der ZF1 Darstellung aufgefallen war, dass die Internalisierung der P0, AB und P1 Mittelkörper ausbleibt und weil TAT-5 bisher nicht direkt mit Phagozytose in Verbindung gebracht worden ist, soll geprüft werden, ob die zweite Welle der Aktinanreicherung (Abbildung 32) um den P0 Mittelkörper bei *tat-5* RNAi Mutanten bei *C. elegans* zu sehen ist.

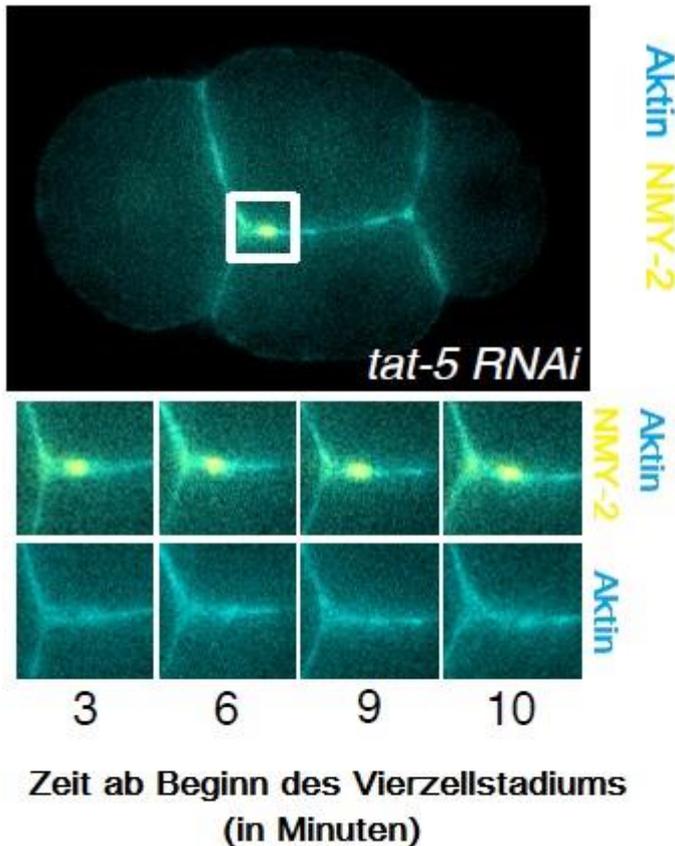


Abbildung 37: *tat-5* RNAi Mutanten zeigen im Vierzellstadium keine Aktinanreicherung um den P0 Mittelkörper, Mittelkörper gelb sowie Aktinfilamente blau dargestellt, unten Bildausschnitte des Geschehens um den P0 Mittelkörper 3,6,9, und 10 Minuten nach Beginn des Vierzellstadiums. Mittelkörper werden nicht internalisiert und es erfolgt keine Anreicherung von Aktin um den P0 Mittelkörper. Die fluoreszenzmikroskopischen Darstellungen werden freundlicherweise von Dr. Gholamreza Fazeli bereitgestellt.

Bei acht Embryonen, die mit RNAi gegen *tat-5* RNAi-behandelt sind, ist keine Akkumulation von Aktin während des Vierzellstadiums (wenn üblicherweise die Internalisierung des P0 Mittelkörpers stattfinden würde) zu

sehen (Abbildung 37). Die phänotypische Ähnlichkeit von *tat-5* Mutanten mit den Mutanten der Phagozytose lässt zudem auf eine Beteiligung von TAT-5 und/oder der Asymmetrie von PtdEth an der Internalisierung von Mittelkörpern durch Phagozytose schließen. Die Daten legen nahe, dass TAT-5 im Rahmen der Akkumulation von Aktinfilamenten um den Mittelkörper eine Rolle spielt.

3.6. Bedeutung von Autophagie beim Abbau von Mittelkörpern

Bei Säugetierzellen in Kultur fiel auf, dass Autophagie-Proteine eine Rolle beim Abbau von Mittelkörpern spielen (Pohl and Jentsch 2009, Kuo, Chen et al. 2011, Isakson, Lystad et al. 2013). Das mit Autophagie assoziierte Protein Beclin 1 sowie das Protein LC3 aus der Atg8-Familie befinden sich üblicherweise um Autophagosomen. Zudem sind sie um internalisierte Mittelkörperreste zu finden und sind zum Abbau von Mittelkörpern nötig (Pohl and Jentsch 2009). Beim Autophagosom handelt es sich um ein intrazellulär befindliches und von einer Doppelmembran umgebenes Bläschen, das *de novo* gebildet wird. Es umgibt Organellen aus dem Zytoplasma und baut diese anschließend durch Fusion mit dem Lysosom ab. Jedoch wurde bisher nicht geprüft, ob Proteine, die an Autophagie beteiligt sind, eine Rolle beim autophagosomalen Abbau der Mittelkörper spielen.

Für die Bildung und Reifung des Autophagosoms werden unter anderem der PI3K III Komplex sowie Proteine aus der Atg8-Familie, inklusive LGG-1 und LGG-2 benötigt (Alberti, Michelet et al. 2010). Die PI3K III besteht aus der Kinase Vps34 und dem Beclin 1 Homolog BEC-1. Durch Analysen entsprechender Mutanten soll der Frage nachgegangen werden, wie Mittelkörper abgebaut werden. PI3K III könnte einen Autophagie-vermittelten Abbau von Mittelkörpern regulieren, beispielsweise indem sie Einfluss auf die Sequestrierung und den Einschluss des Mittelkörpers im Autophagosom hat.

Jedoch ist die PI3K III bei Säugetieren zudem an einer ganzen Reihe von weiteren Vorgängen an Membranen beteiligt. VPS-34 wirkt in *C. elegans*

auch an der Regulierung der Phagozytose und der Reifung des Phagosoms mit, sowie am Transport von Vesikeln, an Endozytose und Autophagie (Kinchen, Doukoumetzidis et al. 2008). Bei *C. elegans* wurde des Weiteren gezeigt, dass das Beclin 1 Homolog BEC-1 an Phagozytose beteiligt ist (Huang, Jia et al. 2013). Die PI3K III ist zudem an der Trennung der Tochterzellen am Ende der Mitose beteiligt (Funderburk, Wang et al. 2010, Thoresen, Pedersen et al. 2010). Daher erscheint es möglich, dass die PI3K III neben ihrer Beteiligung an Autophagie auch bei der Abszission oder der Internalisierung von Mittelkörpern mitwirkt. Die vorher gezeigten Daten stützen die These, dass Mittelkörper nach extrazellulär abgegeben und im Anschluss per Phagozytose von Zellen aufgenommen werden.

Im Folgenden wird mittels der ZF1-Technik geprüft, inwiefern die PI3K III an der Loslösung der beiden Tochterzellen voneinander, an der Aufnahme des Mittelkörpers in eine Zelle oder an dessen ZF1-vermitteltem Abbau im Zytoplasma mittels Autophagie beteiligt sein könnte. Zudem ist von Interesse, inwiefern die PI3K III bei der Aktin-abhängigen Phagozytose von Mittelkörpern beteiligt ist.

Unter dieser Hypothese wären bei PI3K III Mutanten schnell abfallende Werte der ZF1-abhängigen Fluoreszenzintensität von Mittelkörpern zu erwarten.

Wachstumsgeschwindigkeit

BEC-1 und VPS-34 haben Einfluss auf die Wachstumsgeschwindigkeit bei *C. elegans* Embryonen (Roggo, Bernard et al. 2002, Melendez, Tallochy et al. 2003, Levine, Liu et al. 2015). Um die Zeitpunkte für die Aktin- und ZF1-Messungen bei *bec-1* sowie *vps-34* Mutanten festlegen zu können, muss zunächst bestätigt werden, wie langsam sich Mutanten entwickeln. Daher überprüfte ich zunächst die Geschwindigkeit der Zellzyklen von PI3K III Mutanten.

**PI3K Mutanten *vps-34* und *bec-1*
entwickeln sich langsamer im Vergleich zu Wildtypen.**

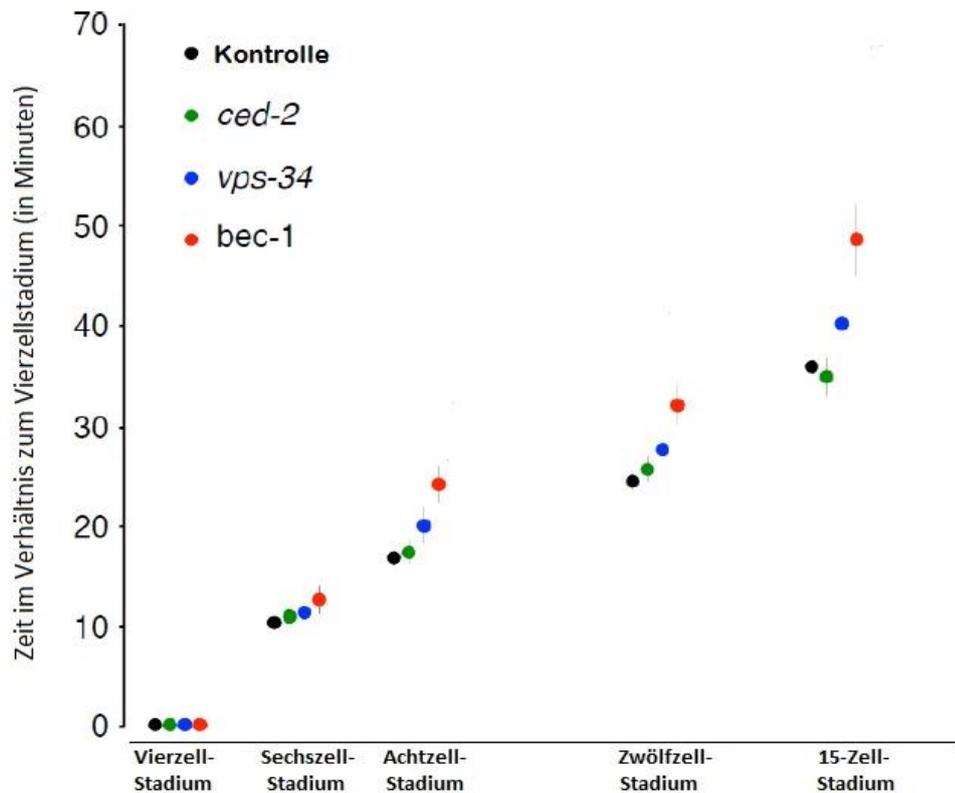


Abbildung 38: langsamere Geschwindigkeit der Zellzyklen bei PI3K III Mutanten; Die durchschnittliche Zeit im Verhältnis zum Vierzellstadium, die zur Entwicklung der jeweiligen Zellstadien benötigt wird, wird bei folgende Rassen betrachtet: Kontrolleembryonen (WEH51, schwarz, n=11), *ced-2* Mutanten (WEH71, grün, n=10), *vps-34* Mutanten (WEH73, blau, n=5) und *bec-1* Mutanten (WEH69, rot, n=6), (Fazeli, Trinkwalder et al. 2016); veränderter Nachdruck mit freundlicher Genehmigung durch Company of Biologists LTD, Journal of Cell Science, Vol 129, S. 3721-3731

Die *C. elegans* PI3K III Mutanten weisen phänotypisch keine offensichtlichen Zellteilungsdefekte auf. Die PI3K III wird daher augenscheinlich für die Trennung der Tochterzellen bei Embryonen nicht benötigt. Zudem ist bei den meisten der beobachteten *bec-1* und *vps-34* Mutanten eine langsame, aber unauffällige Embryonalentwicklung zu sehen. Die Entwicklung der *vps-34* Mutanten erfolgt um 19% (n=13) langsamer als die von Kontrollen, bei *bec-1* mutierten Embryonen (n=15) dauert das Wachstum 32% länger (Abbildung 38). Die PI3K III Mutanten *vps-34* und *bec-1* benötigen deutlich länger um sich vom Vierzellstadium zum 15-Zellstadium zu entwickeln als Kontrolleembryonen. Da die PI3K III an

vielen Vorgängen entlang der Membran beteiligt ist (unter anderem Abszission, Phagozytose, Autophagie) werden zusätzlich *ced-2* Mutanten (=Phagozytose-Mutanten) analysiert. Diese Embryonen entwickeln sich bis zum 15-Zell-Stadium ähnlich schnell wie Kontrollen. Somit scheinen die Unterschiede in der Wachstumsgeschwindigkeit auf die Beteiligung der PI3K III an Autophagie zurückzuführen sein, da Abszission fehlerfrei abläuft und andere Phagozytose-Mutanten normal schnell gedeihen. Angesichts der um 19 – 32% langsameren Wachstumsgeschwindigkeit der *bec-1* und *vps-34* Mutanten im Vergleich zu Kontrollen und Phagozytose-Mutanten müssen die Messungen der ZF1 Fluoreszenz bis 40 Minuten nach Beginn des Vierzellstadiums anstelle 30 Minuten bei Kontrollen analysiert werden.

Mittelkörper-Analyse

Um zu verstehen, welche Rolle die PI3K III bei Embryonen von *C. elegans* in Bezug auf den Mittelkörper spielt, werden *bec-1* und *vps-34* Mutanten *in vivo* beobachtet.

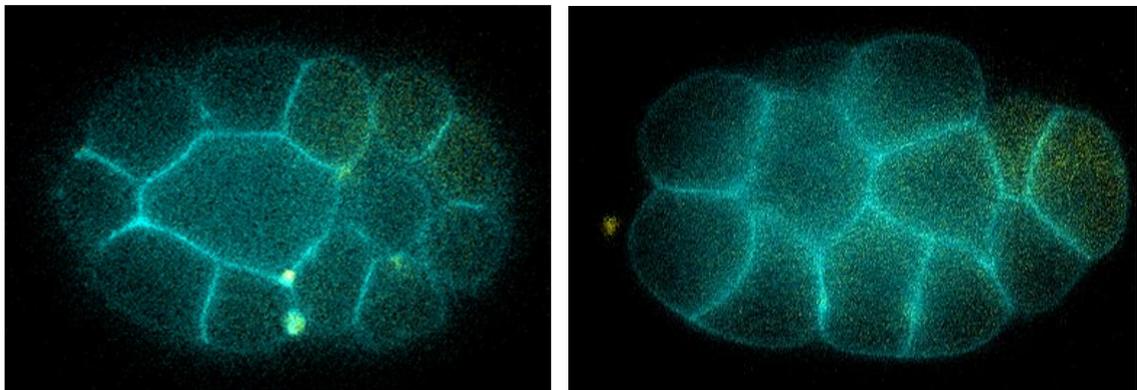


Abbildung 39: *vps-34* Mutant im 15-Zellstadium (links), zum Vergleich Kontrolle (rechts); Mittelkörper (NMY-2::GFP::ZF1; in gelb zu sehen) werden bei *vps-34* Mutanten (linkes Bild) nicht internalisiert, sie halten sich entlang der Plasmamembranen (GFP, blau) auf. Bei Kontrollen (rechtes Bild) hingegen sind bis zum 15-Zellstadium alle Mittelkörper in Zellen internalisiert und abgebaut. Die fluoreszenzmikroskopischen Darstellungen werden freundlicherweise von Dr. Gholamreza Fazeli bereitgestellt. (Fazeli, Trinkwalder et al. 2016)

Insbesondere von Interesse sind hierbei die Geschehnisse rund um die P0, AB und P1 Mittelkörper von der Trennung der IZB zwischen den beiden Tochterzellen am Ende der Mitose bis zu dessen zellulärer Aufnahme und Abbau. Diese Ereignisse können jedoch nicht direkt beobachtet werden,

sodass indirekt Schlüsse gezogen werden müssen. Aufgrund der Beteiligung der PI3K III an vielerlei verschiedenen zellulären Vorgängen sind folgende Phänotypen denkbar:

1) Ein sofortiger ZF1-Abbau ist bei Beteiligung der PI3K III an Abszission zu erwarten. Ein Defekt bei der Abszission könnte auch zu einem Ausbleiben der Internalisierung führen. 2) Bei einer Bedeutung der PI3K III im Rahmen der Phagozytose sollten weder Internalisierungen noch ZF1-Abbau zu sehen sein, weil sich der Mittelkörper extrazellulär befindet. 3) Wenn die PI3K III bei der Autophagie der Mittelkörper im Phagosom wichtig wäre, sind Internalisierungen der Mittelkörper ohne nachfolgenden ZF1-Abbau zu erwarten.

Da Internalisierungen bei den beobachteten Mutanten ausbleiben, ist eine Beteiligung von BEC-1 und VPS-34 an Abszission denkbar, wie im ersten Punkt aufgeführt. Jedoch findet ein sofortiger ZF1-Abbau nicht statt. Trotz der langsamen Wachstumsgeschwindigkeit werden Mittelkörper nicht in Zellen aufgenommen und verbleiben mit erhaltener Fluoreszenzintensität an der Zelloberfläche (Abbildung 39 und Tabelle 2), was zur oben beschriebenen zweiten Hypothese passt. Das Verhalten der Mittelkörper bei PI3K III Mutanten ist aufgrund ausbleibender Internalisierungen dem von Phagozytose-Mutanten sehr ähnlich. Meine Daten legen eine Bedeutung PI3K III bei der Phagozytose der Mittelkörper bei *C. elegans* Embryos nahe. Eine Aussage zur Beteiligung am Abbau von Mittelkörpern (entsprechend der oben formulierten dritten Hypothese) kann aufgrund ausbleibender Internalisierungen nicht getroffen werden.

Analyse nach der ZF1-Technik

Um besser zu verstehen, welche Rolle die PI3K III bei Embryonen von *C. elegans* bei der Internalisierung der Mittelkörper spielt, werden *bec-1* und *vps-34* Mutanten mit der ZF1-Technik betrachtet. Die Analyse der ZF1-abhängigen Fluoreszenz der Mittelkörper zeigt, dass diese bei Mutanten der PI3K III – *bec-1* und *vps-34* – im Vergleich zu Kontrollen keinem ZF1-

vermittelten Abbau unterliegen, die P0 Mittelkörper (NMY-2::GFP::ZF1) weisen einen konstanten Wert an Fluoreszenzintensität auf (Abbildung 40).

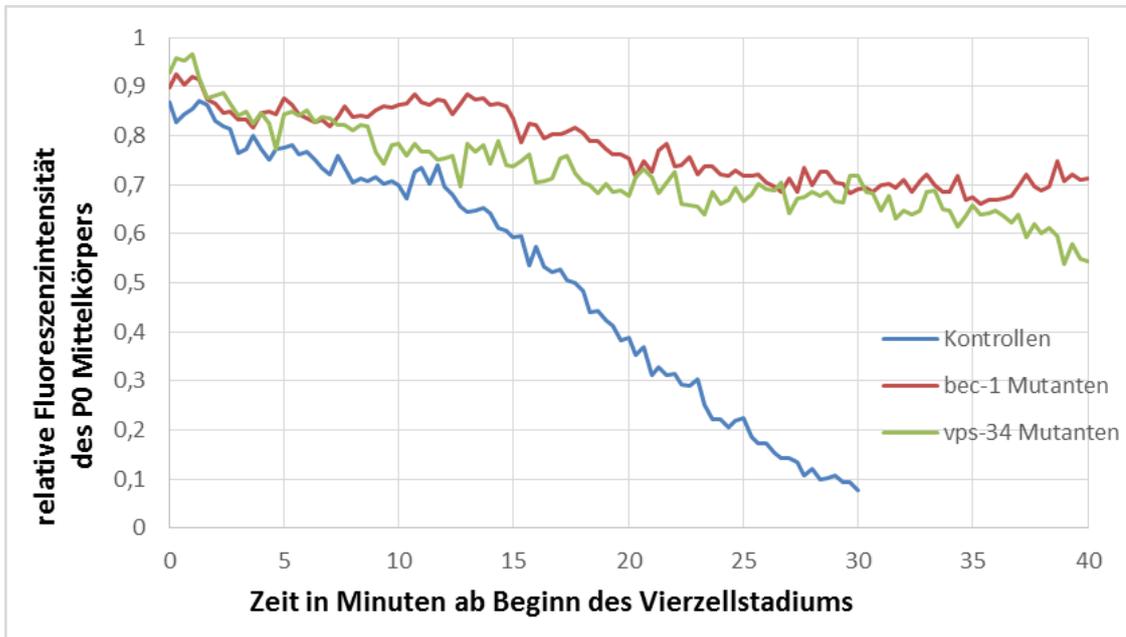


Abbildung 40: Mittelkörper bei PI3K III Mutanten verlieren kaum an Fluoreszenz; P0 Mittelkörper von Mutanten der PI3Kinase, *vps-34* (blau, n=4) und *bec-1* (grün, n=6), die NMY-2::GFP::ZF1 exprimieren, verlieren kaum an Fluoreszenzintensität, im Gegensatz zu denen von Kontrollen (WEH51, orange, n=9).

Da der ZF1-Abbau im intrazellulär gelegenen Proteasom stattfindet, kann daraus gefolgert werden, dass NMY-2::GFP::ZF1 keinen Kontakt zum Zytoplasma hat, dass also der P0 Mittelkörper am Ende der Zellteilung nach extrazellulär freigesetzt wird. Dies setzt voraus, dass die Abszission zuvor stattfand. Also haben mit Autophagie assoziierte Proteine (PI3K III) Einfluss auf Internalisierungen von Mittelkörpern, aber nicht während der Abszission.

Rolle der PI3K III bei Phagozytose

Um der Frage nachzugehen, ob die PI3K III im Rahmen der Phagozytose der Mittelkörper benötigt wird, werden im Folgenden *bec-1* Mutanten anhand der LifeAct-Analyse näher betrachtet. Anhand der WEH106 Linie, ein *bec-1* Mutant (Abbildung 41), bei dem Aktin durch LifeAct::RFP sowie Mittelkörper mit NMY-2::GFP dargestellt sind, soll die Rolle der PI3K III bei der Polymerisierung von Aktinfilamenten sowie der Phagozytose von Mittelkörpern geprüft werden.

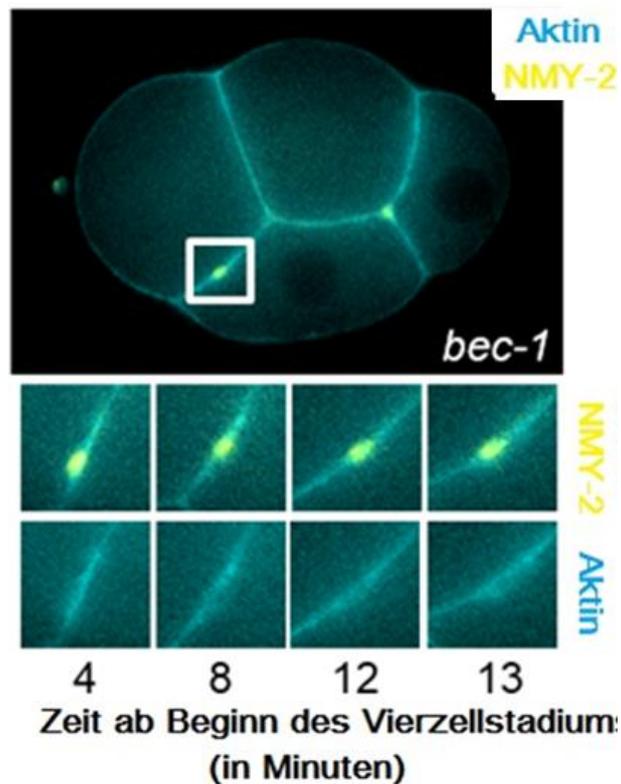


Abbildung 41: PI3K III ist bei Phagozytose beteiligt. Bei *bec-1* Mutanten ist keine Akkumulation von Aktinfilamenten (blau, LifeAct::RFP) rund um den P0 Mittelkörper (gelb, NMY-2::GFP) zum üblicherweise zu erwartenden Zeitpunkt der Internalisierung zu sehen; die Bildausschnitte unten 4,8,12 und 13 Minuten nach Beginn des Vierzellstadiums zeigen das Fehlen von Internalisierung und Aktinansammlung; modifiziert nach (Fazeli, Trinkwalder et al. 2016); Die fluoreszenzmikroskopischen Darstellungen werden freundlicherweise von Dr. Gholamreza Fazeli bereitgestellt.

Phänotypisch werden die Mittelkörper bei der WEH106 Linie nicht internalisiert. Es ist zudem keine Anreicherung von Aktin um den P0 Mittelkörper zu Zeitpunkten, an denen eine Internalisierung zu erwarten wäre, zu sehen. Dass Mittelkörper bei PI3K Mutanten nicht internalisiert werden und stattdessen extrazellulär verbleiben, spricht für eine Beteiligung der PI3K III an Phagozytose.

lgg-1/lgg-2

Anhand der Analysen der PI3K III Mutanten ist nun bekannt, dass Proteine, die mit Autophagie in Verbindung gebracht werden, eine Rolle bei der Phagozytose spielen. Um zu prüfen, ob dies auch für andere Autophagieproteine gilt, oder ob der Einfluss über Autophagie erfolgt, werden Homologe des bekanntesten Autophagie-assoziierten Proteins (Atg8) betrachtet. LGG-1 und LGG-2 sind zur Verlängerung der Membran des Autophagosoms notwendig (Alberti, Michelet et al. 2010, Manil-Segalen, Culetto et al. 2014) und agieren somit etwas später im Ablauf der Autophagie. Auch LGG-1 und LGG-2 sind an einer Vielzahl zellulärer Vorgänge beteiligt, jedoch handelt es sich weitgehend um andere als die der PI3K III. Durch Beobachtung von *lgg-1; lgg-2* RNAi Mutanten soll herausgefunden werden, ob diese bzw Atg8 im Rahmen der Autophagie für den Abbau des Mittelkörpers benötigt werden. Atg8/LC3 spielt im Rahmen der LAP eine bedeutende Rolle im Erhalt der Homöostase in tierischen Zellen. LAP und Autophagie sind in den letzten Jahren stark erforscht wurden und weisen starke Ähnlichkeiten auf, jedoch unterscheiden sie sich beispielsweise in der Zusammensetzung von Proteinen (Fazeli and Wehman 2017).

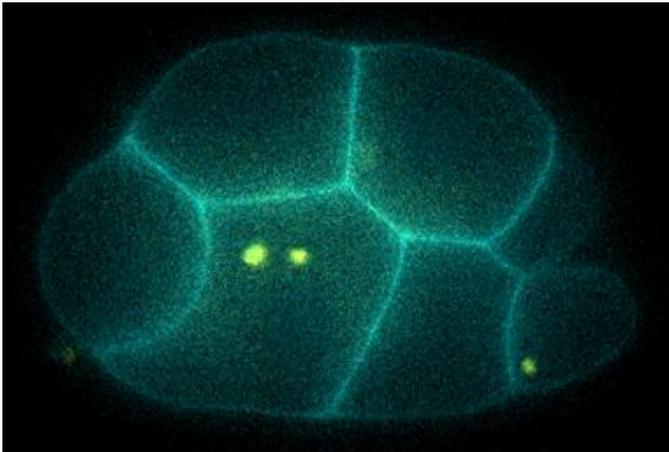


Abbildung 42: Autophagie-assoziierte Proteine sind nicht zur Internalisierung der Mittelkörper nötig; Mittelkörper (NMY-2::mCherry, in gelb dargestellt) werden in *lgg-1*; *lgg2* RNAi Mutant im 8-Zell Stadium internalisiert, Plasmamembranen sind in blau dargestellt. Die fluoreszenzmikroskopische Darstellung wird freundlicherweise von Dr. Gholamreza Fazeli bereitgestellt. Modifiziert nach (Fazeli, Trinkwalder et al. 2016)

Die Mittelkörper, die aus den ersten drei Zellteilungen hervorgehen, werden bei den *lgg-1*; *lgg-2* -Mutanten im Gegensatz zu den PI3K III Mutanten von Zellen internalisiert (Abbildung 42). Dies geschieht von der Art und Weise her ähnlich den Wildtypen (Tabelle 2). Die Verlängerung der Membran des Autophagosoms scheint daher bei der Internalisierung von Mittelkörpern keine Rolle zu spielen.

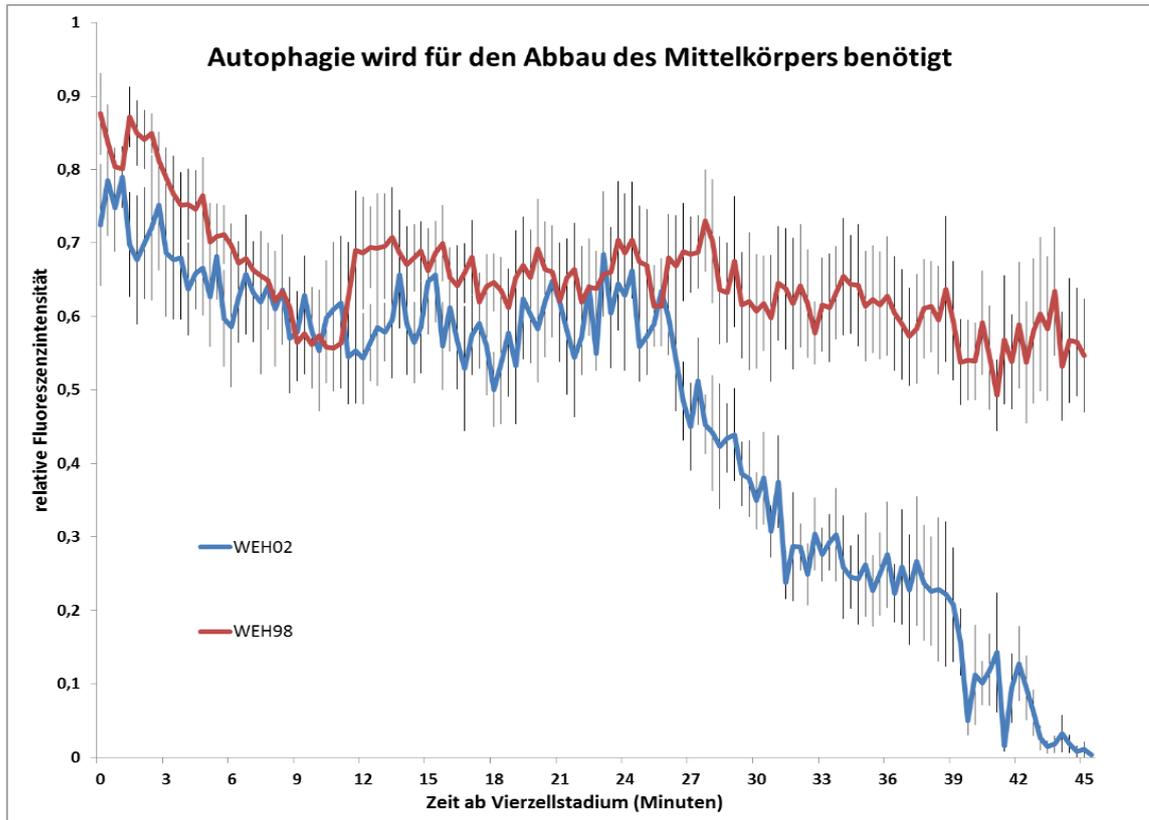


Abbildung 43: Für den Abbau des Mittelkörpers ist Autophagie nötig. Die Fluoreszenzintensität von P0 Mittelkörpern bleibt bei *Igg-1; Igg-2* RNAi Mutanten (rot, n=6) nach der Internalisierung konstant, bei Kontroll Embryonen WEH02 (NMY-2::mCherry; blau, n=6) ist die Fluoreszenzintensität 43 ± 7 Minuten nach Beginn des Vierzellstadiums verschwunden

Zusätzlich wurde geprüft, ob Autophagie-assoziierten Proteine eine Rolle beim Abbau des Mittelkörpers spielen. Überraschenderweise bleibt in WEH98 *Igg-1; Igg-2* RNAi Mutanten die Fluoreszenzintensität der P0 Mittelkörper (NMY-2::mCherry) nach stattgefundenener Internalisierung im Vergleich zu entsprechenden Kontrollembryonen WEH02 konstant. Während die Fluoreszenzintensität der P0 Mittelkörper bei Kontrollen 43 ± 7 Minuten nach Beginn des Vierzellstadiums nicht mehr zu sehen ist, bleibt sie bei *Igg-1; Igg-2* RNAi Mutanten bis zum Filmende erhalten. Dies zeigt, dass LGG-1 und LGG-2 für den Abbau des Mittelkörpers benötigt werden. Da LGG-1 und LGG-2 auch während der LC3-vermittelten Phagozytose eine Rolle spielen, ist ein Abbau der Mittelkörper durch LC3-vermittelte Phagozytose denkbar.

4. Diskussion

Die Ergebnisse zeigen, dass mithilfe der ZF1 Technik verschiedene Phasen des Transports eines Mittelkörpers unterschieden werden können, von Abszission bis Phagozytose bis hin zum Abbau im Lysosom.

Mittelkörperproteine können gezielt mit ZF1-Reportern gekennzeichnet werden. Der Abbau erfolgt im intrazellulär gelegenen Proteasom. Im Nachhinein wäre es besser, einen ZF1-Reporter mit mCherry Proteinen zu bauen, da GFP bei Kontakt zu sauren Bestandteilen unkenntlich wird. Aber die Messungen mit GFP-Reportern haben gezeigt, dass der Mittelkörper nach seiner intrazellulären Aufnahme in saures Milieu des Endosoms und Lysosoms gelangt.

Die Daten zeigen, dass sich der Mittelkörper nach der Trennung der Tochterzellen auf der Zelloberfläche befindet. Dort werden weder AB- noch P0- und P1 Mittelkörper ZF1-vermittelt abgebaut. Daher ist davon auszugehen, dass die Abszission mit der beidseitigen Durchtrennung der IZB und der Abgabe des Mittelkörpers nach extrazellulär endet. Einerseits können Mittelkörper von Zellen ohne Beziehung zu ihnen aufgenommen werden (Chai, Tian et al. 2012, Ou, Gentili et al. 2014). Des Weiteren konnte Fazeli et al. (2016) zeigen dass bei *ced-2* Mutanten Bewegungen der Mittelkörper an der Oberfläche des Embryos zu sehen sind – losgelöst von den Tochterzellen. Zudem konnte dieser nach der Internalisierung von Mittelkörpern Marker der Plasmamembran (PIP2-positive Reporter) um den Mittelkörper herum darstellen, was nur bei vorheriger extrazellulärer Lage des Mittelkörpers zu erwarten wäre. Die Abgabe des Mittelkörpers nach extrazellulär erfolgt auch dann, wenn der Mittelkörper später von einer Tochterzelle internalisiert wird, wie es bei P0 Mittelkörpern meist der Fall ist. König, Frankel et al. (2017) konnten elektronenmikroskopisch bestätigen, dass die Abtrennung der IZB zu beiden Seiten des P0 Mittelkörpers stattfindet. Anhand der Daten dieser Arbeit bleibt es unklar, an welcher Seite des Mittelkörpers die IZB zuerst abgetrennt wird. König, Frankel et al.

(2017) haben später gezeigt, dass dies zunächst auf einer zufälligen Seite des Mittelkörpers geschieht.

Meine Kollegen aus der Arbeitsgruppe Wehman konnten später zeigen, dass bei der Phagozytose Mittelkörper durch eine Zelle eine zweite Membran erhalten und nach der Internalisierung komplett vor dem ZF1-vermittelten Abbau im Proteasom geschützt sind.

Wir haben bestätigt, dass Mittelkörper von der Zelloberfläche zum Abbau nach intrazellulär durch Phagozytose gelangen. Die Ergebnisse aus den Analysen von TAT-1 könnten darüber hinaus Hinweise geben, wie Phagozytose gezielt in einer Zelle abläuft. Freigesetzte Mittelkörper könnten ihre Phagozytose in Gang setzen, indem sie das Lipid PtdSer nach außen verlagern (Chai, Tian et al. 2012). Ob TAT-1 im freigesetzten Mittelkörper inaktiv ist oder ob andere Proteine PtdSer Asymmetrie regulieren, ist noch unbekannt. Die Bereitschaft eines Mittelkörpers zur Phagozytose könnte durch Einfluss von TAT-1 und/ oder PtdSer vermittelt werden. Vermehrte Aktivierung von PtdSer-abhängigen Phagozytose-Signalwegen durch vermehrtes Vorkommen von PtdSer hat häufigere Internalisierungen zur Folge. Es wäre auch interessant zu wissen, wie Mittelkörper in mehreren Stücken internalisiert werden. Es ist noch unklar, ob Mittelkörper während der Phagozytose in *tat-1* Mutanten auseinandergerissen werden, oder ob sie schon gestückelt waren. Weitere Experimente mit TAT-1 und PtdSer werden neue Einsicht in Phagozytose geben.

Wir haben auch neue Proteine entdeckt, die Mittelkörperphagozytose regulieren, inklusive ABI-1, BEC-1, VPS-34, und TAT-5. Für die Phagozytose von Mittelkörpern ist die Umorganisation des Aktingerüsts erforderlich (Crowell, Gaffuri et al. 2014). Diese wird durch die CED-10/Rac1-abhängige Polymerisierung von Aktin veranlasst (Chai, Tian et al. 2012). CED-1 und CED-2 und ABI-1 münden über drei voneinander unabhängige Signalwege in CED-10/Rac1 und alle drei sind wichtig für Mittelkörperphagozytose. Bei Säugetierzellen ohne Beclin 1 sind weniger Wiederverwertungen von Phagozytoserezeptoren der Plasmamembran zu beobachten, was auf einen Defekt bei der Erneuerung von

Retromerkomplexen zurückzuführen ist (Lucin, O'Brien et al. 2013). Bei *vps-34* Mutanten konnten unsere Daten zeigen, dass im Gegensatz zu Kontrollen kein CED-1 entlang der Plasmamembran zu finden ist (Fazeli, Trinkwalder et al. 2016). Proteine des PI3K III-Komplexes sowie der PtdEth-Flippase TAT-5 sind auch wichtig für Umorganisation des Aktingerüsts und Mittelkörperphagozytose. PAT-3, von dem eine Beteiligung an der CED-10/Rac1-abhängigen Phagozytose über einen anderen Signalweg bekannt ist, hat jedoch keinen Einfluss auf die Internalisierung der Mittelkörper. Die Daten legen nahe, dass Mittelkörper durch CED-10-abhängige Phagozytose durch ein Zusammenspiel verschiedener Rezeptoren der Plasmamembran und des Mittelkörpers sowie durch Verformung der Zelloberfläche durch Umorganisation des Aktingerüsts an der Zellmembran internalisiert werden.

In den letzten Jahren wurde außerdem die LC3-vermittelte Phagozytose genauer erforscht. Mittelkörper werden via Phagozytose in Zellen aufgenommen und LC3-vermittelt abgebaut, wobei sowohl PI3K III als auch Atg8/LC3 Proteine eine bedeutende Rolle spielen. Die PI3K wird auch nach der Internalisierung des Mittelkörpers benötigt (Fazeli, Trinkwalder et al. 2016). Im Rahmen der LC3-vermittelten Phagozytose beeinflusst die Aktivität der PI3K III die Reifung des Phagosoms. Fazeli hat herausgefunden, dass LGG-2 sich nicht mehr am Phagosom in PI3K Mutanten befindet (Fazeli, Trinkwalder et al. 2016). Proteine wie VPS-34, die bisher mit Autophagie in Verbindung gebracht werden, sind also zudem notwendig für die Reifung des Mittelkörper-Phagosoms zusammen mit den Atg8-Homologen LGG-1 und LGG-2. Was genau die Atg8-Homologen auf dem Phagosom bewirken, ist noch unklar. Eine Möglichkeit wäre, dass sie wichtig für die Aufschlüsselung der Mittelkörpermembran sind. Während der Autophagie ist Atg8 wichtig für die Aufschlüsselung der Innermembran des Autophagosoms (Lamb, Yoshimori et al. 2013, Fazeli and Wehman 2017). Anschließend kann die Fusion des Mittelkörper-Phagosoms mit dem Lysosom stattfinden, woraufhin der Mittelkörper schließlich abgebaut wird.

Im Anschluss an meine Analysen wurde in der Arbeitsgruppe an der Thematik weitergeforscht, unter anderem zur Rolle der PI3K III bei der

Abszission sowie zur Geschwindigkeit des Zellzyklus bei PI3K III Mutanten, auch zum Einfluss von Fluoreszenzlicht auf Embryonen. Des Weiteren wurde eine genaue Auswertung des Zusammenzuges des kontraktiven Ringes angefertigt und das Autophagieprotein ATG-7 genauer untersucht. Mittelkörper haben vielfältige, teilweise signalgebende Funktionen während und nach der Zellteilung. Von medizinischer Relevanz ist die Thematik, da vermutet wird, dass Fehlregulationen bei Vorgängen rund um den Mittelkörper unter anderem zu Autoimmun-Erkrankungen führen können oder an der Entstehung von Tumoren beteiligt sein könnten. Beispielsweise durch Beeinflussung bei der Zelldifferenzierung zu Stammzellen oder differenzierten Zellen. Kuo, Chen et al. (2011) bemerkten, dass differenzierte Zellen und Zellen, die sich normal teilen, keine Mittelkörperreste akkumulieren und gleichzeitig eine hohe Aktivität an Autophagie aufweisen. Stammzellen und Krebszellen hingegen häufen Mittelkörperreste an und zeigen eine niedrige Aktivität an Autophagie, indem sie die Abkapselung des Autophagosoms verhindern.

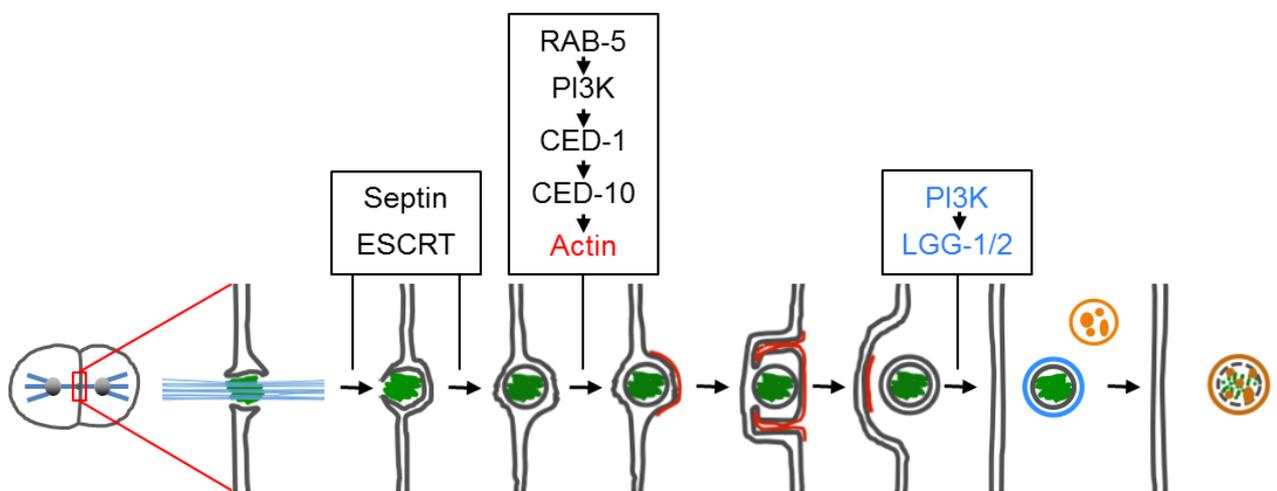


Abbildung 44: modellhafter Weg des Mittelkörpers:

Der kontraktile Ring zieht sich zusammen und bildet die IZB. Diese beinhaltet Mikrotubuli (blau) sowie den Mittelkörper (grün). Die Trennung der beiden Tochterzellen beginnt zunächst auf einer Seite des Mittelkörpers. Nachdem die IZB beidseitig ESCRT-abhängig abgetrennt ist, befindet sich der Mittelkörper von einer Membran (grau) umgeben extrazellulär. Aktin (rot) bildet eine tassenähnliche Struktur um den Mittelkörper einzuverleiben, dies geschieht über einen Signalweg via PI3K, CED-1 und CED-10. Zur

Reifung des Phagosoms ist PI3K Aktivität nötig, sowie LGG-1 und LGG-2. Jeder Strich bedeutet eine Doppellipidschicht. Nachdruck mit freundlicher Genehmigung durch Company of Biologists LTD, Journal of Cell Science, (Fazeli, Trinkwalder et al. 2016), Vol 129, S. 3721-3731

5. Zusammenfassung

Bei der Teilung einer Zelle werden das Genom und die Zellbestandteile zwischen zwei Tochterzellen aufgeteilt. Dies erfordert verschiedene fein aufeinander abgestimmte Vorgänge. Unter anderem ist eine proteinreiche Struktur beteiligt, die 1891 entdeckt wurde: der Mittelkörper. In vorliegender Arbeit wurden gezielt gekennzeichnete Mittelkörperproteine analysiert und verschiedene Phasen des Transports unterschieden. Es erfolgten erstmals Messungen unter Nutzung der ZF1-Methode. Zudem wird anhand der ZF1-Technik nachgewiesen, dass im Rahmen der Zellteilung die Trennung der interzellulären Brücke zu beiden Seiten des Mittelkörpers stattfindet, woraufhin dieser nach extrazellulär abgegeben wird und über einen der Phagozytose ähnlichen und von Aktin abhängigen Mechanismus von einer Tochterzelle oder unverwandten Nachbarzelle aufgenommen wird.

6. Literatur- und Abbildungsverzeichnis

Quellenangaben:

- Alberti, A., X. Michelet, A. Djeddi and R. Legouis (2010). "The autophagosomal protein LGG-2 acts synergistically with LGG-1 in dauer formation and longevity in *C. elegans*." Autophagy **6**(5): 622-633.
- Anderson, D. C., J. S. Gill, R. M. Cinalli and J. Nance (2008). "Polarization of the *C. elegans* embryo by RhoGAP-mediated exclusion of PAR-6 from cell contacts." Science **320**(5884): 1771-1774.
- Audhya, A., F. Hyndman, I. X. McLeod, A. S. Maddox, J. R. Yates, 3rd, A. Desai and K. Oegema (2005). "A complex containing the Sm protein CAR-1 and the RNA helicase CGH-1 is required for embryonic cytokinesis in *Caenorhabditis elegans*." J Cell Biol **171**(2): 267-279.
- Brenner, S. (1974). "The genetics of *Caenorhabditis elegans*." Genetics **77**(1): 71-94.
- Buck, R. C. and J. M. Tisdale (1962). "The fine structure of the mid-body of the rat erythroblast." J Cell Biol **13**: 109-115.
- Chai, Y., D. Tian, Y. Yang, G. Feng, Z. Cheng, W. Li and G. Ou (2012). "Apoptotic regulators promote cytokinetic midbody degradation in *C. elegans*." J Cell Biol **199**(7): 1047-1055.
- Chen, C. T., A. W. Ettinger, W. B. Huttner and S. J. Doxsey (2013). "Resurrecting remnants: the lives of post-mitotic midbodies." Trends Cell Biol **23**(3): 118-128.
- Chen, D., Y. Jian, X. Liu, Y. Zhang, J. Liang, X. Qi, H. Du, W. Zou, L. Chen, Y. Chai, G. Ou, L. Miao, Y. Wang and C. Yang (2013). "Clathrin and AP2 are required for phagocytic receptor-mediated apoptotic cell clearance in *Caenorhabditis elegans*." PLoS Genet **9**(5): e1003517.
- Crowell, E. F., A. L. Gaffuri, B. Gayraud-Morel, S. Tajbakhsh and A. Echard (2014). "Engulfment of the midbody remnant after cytokinesis in mammalian cells." J Cell Sci **127**(Pt 17): 3840-3851.
- D'Avino, P. P., M. G. Giansanti and M. Petronczki (2015). "Cytokinesis in animal cells." Cold Spring Harb Perspect Biol **7**(4): a015834.
- Darland-Ransom, M., X. Wang, C. L. Sun, J. Mapes, K. Gengyo-Ando, S. Mitani and D. Xue (2008). "Role of *C. elegans* TAT-1 protein in maintaining plasma membrane phosphatidylserine asymmetry." Science **320**(5875): 528-531.
- DeRenzo, C., K. J. Reese and G. Seydoux (2003). "Exclusion of germ plasm proteins from somatic lineages by cullin-dependent degradation." Nature **424**(6949): 685-689.
- Dubreuil, V., A. M. Marzesco, D. Corbeil, W. B. Huttner and M. Wilsch-Brauninger (2007). "Midbody and primary cilium of neural progenitors release extracellular membrane particles enriched in the stem cell marker prominin-1." J Cell Biol **176**(4): 483-495.
- Elia, N., R. Sougrat, T. A. Spurlin, J. H. Hurley and J. Lippincott-Schwartz (2011). "Dynamics of endosomal sorting complex required for transport (ESCRT) machinery during cytokinesis and its role in abscission." Proc Natl Acad Sci U S A **108**(12): 4846-4851.

Emoto, K., T. Kobayashi, A. Yamaji, H. Aizawa, I. Yahara, K. Inoue and M. Umeda (1996). "Redistribution of phosphatidylethanolamine at the cleavage furrow of dividing cells during cytokinesis." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(23): 12867-12872.

Ettinger, A. W., M. Wilsch-Brauninger, A. M. Marzesco, M. Bickle, A. Lohmann, Z. Maliga, J. Karbanova, D. Corbeil, A. A. Hyman and W. B. Huttner (2011). "Proliferating versus differentiating stem and cancer cells exhibit distinct midbody-release behaviour." Nat Commun **2**: 503.

Fadok, V. A., D. L. Bratton, S. C. Frasch, M. L. Warner and P. M. Henson (1998). "The role of phosphatidylserine in recognition of apoptotic cells by phagocytes." Cell Death Differ **5**(7): 551-562.

Fazeli, G., M. Trinkwalder, L. Irmisch and A. M. Wehman (2016). "C. elegans midbodies are released, phagocytosed and undergo LC3-dependent degradation independent of macroautophagy." J Cell Sci **129**(20): 3721-3731.

Fazeli, G. and A. M. Wehman (2017). "Safely removing cell debris with LC3-associated phagocytosis." Biol Cell.

Flemming, W. (1891). "Neue Beiträge zur Kenntnis der Zelle." Arch Mikrosk Anat. **37**: 685-751.

Fraser, A. G., R. S. Kamath, P. Zipperlen, M. Martinez-Campos, M. Sohrmann and J. Ahringer (2000). "Functional genomic analysis of C. elegans chromosome I by systematic RNA interference." Nature **408**(6810): 325-330.

Freeman, S. A. and S. Grinstein (2014). "Phagocytosis: receptors, signal integration, and the cytoskeleton." Immunol Rev **262**(1): 193-215.

Funderburk, S. F., Q. J. Wang and Z. Yue (2010). "The Beclin 1-VPS34 complex--at the crossroads of autophagy and beyond." Trends Cell Biol **20**(6): 355-362.

Glotzer, M. (2001). "Animal cell cytokinesis." Annu Rev Cell Dev Biol **17**: 351-386.

Gomes, J. E. and B. Bowerman (2002). "Caenorhabditis elegans par genes." Curr Biol **12**(13): R444.

Green, R. A., J. R. Mayers, S. Wang, L. Lewellyn, A. Desai, A. Audhya and K. Oegema (2013). "The midbody ring scaffolds the abscission machinery in the absence of midbody microtubules." J Cell Biol **203**(3): 505-520.

Green, R. A., E. Paluch and K. Oegema (2012). "Cytokinesis in animal cells." Annu Rev Cell Dev Biol **28**: 29-58.

Guizetti, J. and D. W. Gerlich (2010). "Cytokinetic abscission in animal cells." Semin Cell Dev Biol **21**(9): 909-916.

Guizetti, J., L. Schermelleh, J. Mantler, S. Maar, I. Poser, H. Leonhardt, T. Muller-Reichert and D. W. Gerlich (2011). "Cortical constriction during abscission involves helices of ESCRT-III-dependent filaments." Science **331**(6024): 1616-1620.

Guo, S. and K. J. Kemphues (1996). "A non-muscle myosin required for embryonic polarity in Caenorhabditis elegans." Nature **382**(6590): 455-458.

Hall, A. and C. Nobes (2000). "Rho GTPases: molecular switches that control the organization and dynamics of the actin cytoskeleton." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **355**(1399): 965-970.

Hu, C. K., M. Coughlin and T. J. Mitchison (2012). "Midbody assembly and its regulation during cytokinesis." Mol Biol Cell **23**(6): 1024-1034.

Huang, S., K. Jia, Y. Wang, Z. Zhou and B. Levine (2013). "Autophagy genes function in apoptotic cell corpse clearance during *C. elegans* embryonic development." *Autophagy* **9**(2): 138-149.

Hurwitz, M. E., P. J. Vanderzalm, L. Bloom, J. Goldman, G. Garriga and H. R. Horvitz (2009). "Abl kinase inhibits the engulfment of apoptotic [corrected] cells in *Caenorhabditis elegans*." *PLoS Biol* **7**(4): e99.

Isakson, P., A. H. Lystad, K. Breen, G. Koster, H. Stenmark and A. Simonsen (2013). "TRAF6 mediates ubiquitination of KIF23/MKLP1 and is required for midbody ring degradation by selective autophagy." *Autophagy* **9**(12): 1955-1964.

Jensen, M. S. and D. F. Bainton (1973). "Temporal changes in pH within the phagocytic vacuole of the polymorphonuclear neutrophilic leukocyte." *J Cell Biol* **56**(2): 379-388.

Kim, S. E. and M. Overholtzer (2013). "Autophagy proteins regulate cell engulfment mechanisms that participate in cancer." *Semin Cancer Biol* **23**(5): 329-336.

Kinchen, J. M., K. Doukometzidis, J. Almendinger, L. Stergiou, A. Tosello-Trampont, C. D. Sifri, M. O. Hengartner and K. S. Ravichandran (2008). "A pathway for phagosome maturation during engulfment of apoptotic cells." *Nat Cell Biol* **10**(5): 556-566.

Kneen, M., J. Farinas, Y. Li and A. S. Verkman (1998). "Green fluorescent protein as a noninvasive intracellular pH indicator." *Biophys J* **74**(3): 1591-1599.

Konig, J., E. B. Frankel, A. Audhya and T. Muller-Reichert (2017). "Membrane remodeling during embryonic abscission in *Caenorhabditis elegans*." *J Cell Biol* **216**(5): 1277-1286.

Kuo, T. C., C. T. Chen, D. Baron, T. T. Onder, S. Loewer, S. Almeida, C. M. Weismann, P. Xu, J. M. Houghton, F. B. Gao, G. Q. Daley and S. Doxsey (2011). "Midbody accumulation through evasion of autophagy contributes to cellular reprogramming and tumorigenicity." *Nat Cell Biol* **13**(10): 1214-1223.

Lai, S. C. and R. J. Devenish (2012). "LC3-Associated Phagocytosis (LAP): Connections with Host Autophagy." *Cells* **1**(3): 396-408.

Lamb, C. A., T. Yoshimori and S. A. Tooze (2013). "The autophagosome: origins unknown, biogenesis complex." *Nat Rev Mol Cell Biol* **14**(12): 759-774.

Levine, B., R. Liu, X. Dong and Q. Zhong (2015). "Beclin orthologs: integrative hubs of cell signaling, membrane trafficking, and physiology." *Trends Cell Biol* **25**(9): 533-544.

Lucin, K. M., C. E. O'Brien, G. Bieri, E. Czirr, K. I. Mosher, R. J. Abbey, D. F. Mastroeni, J. Rogers, B. Spencer, E. Masliah and T. Wyss-Coray (2013). "Microglial beclin 1 regulates retromer trafficking and phagocytosis and is impaired in Alzheimer's disease." *Neuron* **79**(5): 873-886.

Manil-Segalen, M., E. Culetto, R. Legouis and C. Lefebvre (2014). "Interactions between endosomal maturation and autophagy: analysis of ESCRT machinery during *Caenorhabditis elegans* development." *Methods Enzymol* **534**: 93-118.

Martinez, J., J. Almendinger, A. Oberst, R. Ness, C. P. Dillon, P. Fitzgerald, M. O. Hengartner and D. R. Green (2011). "Microtubule-associated protein 1 light chain 3 alpha (LC3)-associated phagocytosis is required for the efficient clearance of dead cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**(42): 17396-17401.

Melendez, A., Z. Talloczy, M. Seaman, E. L. Eskelinen, D. H. Hall and B. Levine (2003). "Autophagy genes are essential for dauer development and life-span extension in *C. elegans*." Science **301**(5638): 1387-1391.

Mullins, J. M. and J. R. McIntosh (1982). "Isolation and initial characterization of the mammalian midbody." J Cell Biol **94**(3): 654-661.

Munro, E., J. Nance and J. R. Priess (2004). "Cortical flows powered by asymmetrical contraction transport PAR proteins to establish and maintain anterior-posterior polarity in the early *C. elegans* embryo." Dev Cell **7**(3): 413-424.

Nance, J., E. M. Munro and J. R. Priess (2003). "*C. elegans* PAR-3 and PAR-6 are required for apicobasal asymmetries associated with cell adhesion and gastrulation." Development **130**(22): 5339-5350.

Neukomm, L. J., S. Zeng, A. P. Frei, P. A. Huegli and M. O. Hengartner (2014). "Small GTPase CDC-42 promotes apoptotic cell corpse clearance in response to PAT-2 and CED-1 in *C. elegans*." Cell Death Differ **21**(6): 845-853.

Ou, G., C. Gentili and P. Gonczy (2014). "Stereotyped distribution of midbody remnants in early *C. elegans* embryos requires cell death genes and is dispensable for development." Cell Res **24**(2): 251-253.

Paweletz, N. (1967). "[On the function of the "Flemming body" during division of animal cells]." Naturwissenschaften **54**(20): 533-535.

Pohl, C. (2017). "The Midbody and its Remnant in Cell Polarization and Asymmetric Cell Division." Results Probl Cell Differ **61**: 165-182.

Pohl, C. and S. Jentsch (2008). "Final stages of cytokinesis and midbody ring formation are controlled by BRUCE." Cell **132**(5): 832-845.

Pohl, C. and S. Jentsch (2009). "Midbody ring disposal by autophagy is a post-abscission event of cytokinesis." Nat Cell Biol **11**(1): 65-70.

Reddien, P. W. and H. R. Horvitz (2000). "CED-2/CrklI and CED-10/Rac control phagocytosis and cell migration in *Caenorhabditis elegans*." Nat Cell Biol **2**(3): 131-136.

Reese, K. J., M. A. Dunn, J. A. Waddle and G. Seydoux (2000). "Asymmetric segregation of PIE-1 in *C. elegans* is mediated by two complementary mechanisms that act through separate PIE-1 protein domains." Mol Cell **6**(2): 445-455.

Riedl, J., A. H. Crevenna, K. Kessenbrock, J. H. Yu, D. Neukirchen, M. Bista, F. Bradke, D. Jenne, T. A. Holak, Z. Werb, M. Sixt and R. Wedlich-Soldner (2008). "Lifeact: a versatile marker to visualize F-actin." Nat Methods **5**(7): 605-607.

Roggo, L., V. Bernard, A. L. Kovacs, A. M. Rose, F. Savoy, M. Zetka, M. P. Wymann and F. Muller (2002). "Membrane transport in *Caenorhabditis elegans*: an essential role for VPS34 at the nuclear membrane." EMBO J **21**(7): 1673-1683.

Salzmann, V., C. Chen, C. Y. Chiang, A. Tiyaboonchai, M. Mayer and Y. M. Yamashita (2014). "Centrosome-dependent asymmetric inheritance of the midbody ring in *Drosophila* germline stem cell division." Mol Biol Cell **25**(2): 267-275.

Sanjuan, M. A., C. P. Dillon, S. W. Tait, S. Moshich, F. Dorsey, S. Connell, M. Komatsu, K. Tanaka, J. L. Cleveland, S. Withoff and D. R. Green (2007). "Toll-like receptor signalling in macrophages links the autophagy pathway to phagocytosis." Nature **450**(7173): 1253-1257.

- Schiel, J. A., C. Childs and R. Prekeris (2013). "Endocytic transport and cytokinesis: from regulation of the cytoskeleton to midbody inheritance." Trends Cell Biol **23**(7): 319-327.
- Schiel, J. A. and R. Prekeris (2010). "Making the final cut - mechanisms mediating the abscission step of cytokinesis." ScientificWorldJournal **10**: 1424-1434.
- Shelton, C. A., J. C. Carter, G. C. Ellis and B. Bowerman (1999). "The nonmuscle myosin regulatory light chain gene *mlc-4* is required for cytokinesis, anterior-posterior polarity, and body morphology during *Caenorhabditis elegans* embryogenesis." J Cell Biol **146**(2): 439-451.
- Singh, D. and C. Pohl (2014). "Coupling of rotational cortical flow, asymmetric midbody positioning, and spindle rotation mediates dorsoventral axis formation in *C. elegans*." Dev Cell **28**(3): 253-267.
- Singh, D. and C. Pohl (2014). "A function for the midbody remnant in embryonic patterning." Commun Integr Biol **7**: e28533.
- Sulston, J. E., E. Schierenberg, J. G. White and J. N. Thomson (1983). "The embryonic cell lineage of the nematode *Caenorhabditis elegans*." Dev Biol **100**(1): 64-119.
- Thoresen, S. B., N. M. Pedersen, K. Liestol and H. Stenmark (2010). "A phosphatidylinositol 3-kinase class III sub-complex containing VPS15, VPS34, Beclin 1, UVRAG and BIF-1 regulates cytokinesis and degradative endocytic traffic." Exp Cell Res **316**(20): 3368-3378.
- Wehman, A. M., C. Poggioli, P. Schweinsberg, B. D. Grant and J. Nance (2011). "The P4-ATPase TAT-5 inhibits the budding of extracellular vesicles in *C. elegans* embryos." Curr Biol **21**(23): 1951-1959.

Abbildungsverzeichnis:

ABBILDUNG 1: SCHEMATISIERTE DARSTELLUNG DER VERSCHIEDENEN STADIEN DER ZELLEILUNG IN TIERISCHEN ZELLEN.....	1
ABBILDUNG 2: ERSTE ELEKTRONENMIKROSKOPISCHE DARSTELLUNG DES MITTELKÖRPERS 1967 DURCH N. PAWELETZ.	4
ABBILDUNG 3: ASYMMETRISCHE ABSZSSION:	5
ABBILDUNG 4: SYMMETRISCHE ABSZSSION:	0
ABBILDUNG 5: MAKROAUTOPHAGIE DES MITTELKÖRPERS	2
ABBILDUNG 6: PHAGOZYTOSE DES MITTELKÖRPERS	3
ABBILDUNG 7: GEGENÜBERSTELLUNG VON PHAGOZYTOSE UND AUTOPHAGIE.	4
ABBILDUNG 8: SCHEMA DER FRÜHEN EMBRYONALENTWICKLUNG BEI <i>C. ELEGANS</i>	6
ABBILDUNG 9: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DES ENTSTEHUNGS- UND INTERNALISIERUNGSVERHALTENS.....	7
ABBILDUNG 10: GENETISCHES MODELL DER BILDUNG EINES AKTINGERÜSTS ZUR PHAGOZYTOSE.	9
ABBILDUNG 11: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DES ZF1-ABBAUS WÄHREND DER FRÜHEN EMBRYONALENTWICKLUNG BEI <i>C. ELEGANS</i>	12
ABBILDUNG 12: ERMITTLUNG DES ZEITPUNKTES 0 BEI EINEM WEH51 WILDTYP-EMBRYO.	16
ABBILDUNG 13: ZEITPUNKT DER INTERNALISIERUNG:	17
ABBILDUNG 14: ÜBERPRÜFUNG DER ZELLEILUNGEN BEI DER ZF1-REPORTER-LINIE WEH51 (N=11).	25
ABBILDUNG 15: ÜBERPRÜFUNG DER ZELLEILUNGEN BEI DER ZF1-REPORTER-LINIE LP162 (N=8).	26
ABBILDUNG 16: VERGLEICH VON VIER REPORTER-LINIEN MIT VERSCHIEDENEN NMY-2 TRANSGENEN.	27
ABBILDUNG 17: WILDTYP WEH51 IM 4-ZELLSTADIUM.....	28
ABBILDUNG 18: FLUORESZENZINTENSITÄT VON P0 MITTELKÖRPERN BEI KONTROLLEN	29
ABBILDUNG 19: ZWEI VERSCHIEDENE MÖGLICHKEITEN DER BEZIEHUNG DES MITTELKÖRPERS ZUM ZYTOPLASMA NACH DER ZELLEILUNG:.....	30
ABBILDUNG 20: FLUORESZENZVERLUST DER MITTELKÖRPER IST UNABHÄNGIG VOM INTRAZELLULÄREN ZF1-ABBAU	31
ABBILDUNG 21: FLUORESZENZVERLUST DER P0 MITTELKÖRPER AB INTERNALISIERUNG.....	33
ABBILDUNG 22: MCHERRY PERSISTIERT LÄNGER IM PHAGOSOM ALS GFP.....	34
ABBILDUNG 23: <i>ced-2</i> MUTANT IM 15-ZELLSTADIUM (RECHTS), ZUM VERGLEICH KONTROLLE (LINKS).....	36
ABBILDUNG 24: BEI <i>ced-1</i> SOWIE <i>ced-2</i> MUTANTEN WIRD DER ZF1-REPORTER DER P0 MITTELKÖRPER NICHT ABGEBAUT.	37
ABBILDUNG 25: FLUORESZENZ DER INTERNALISIERTEN P0 MITTELKÖRPER BEI <i>abi-1</i> RNAi MUTANTEN,	38
ABBILDUNG 26: FLUORESZENZ VON NICHT INTERNALISIERTEN MITTELKÖRPERN BEI <i>abi-1</i> RNAi MUTANTEN,	39
ABBILDUNG 27: FLUORESZENZ DER MITTELKÖRPER VON <i>pat-3</i> RNAi MUTANTEN:.....	40
ABBILDUNG 28: AKTIN (BLAU) AKKUMULIERT UM DEN P0 MITTELKÖRPER (GELB) VOR DER INTERNALISIERUNG	42
ABBILDUNG 29: ZWEI WELLEN DER AKTINAKKUMULATION UM DEN P0 MITTELKÖRPER.....	43
ABBILDUNG 30: DIE ZWEITE WELLE DER AKTINANSAMMLUNG STIMMT MIT DEM PHAGOZYTOSE-ZEITPUNKT ÜBEREIN.....	44
ABBILDUNG 31: <i>ced-2</i> MUTANT IM VIERZELLSTADIUM;	45
ABBILDUNG 32: BEI AUSBLEIBENDER INTERNALISIERUNG IST KEINE ZWEITE AKTINWELLE ZU SEHEN.	46

ABBILDUNG 33: DIE BEIDEN WELLEN DER AKTINANSAMMLUNG SIND GENETISCH TRENNBAR UND VERLAUFEN VONEINANDER UNABHÄNGIG.	47
ABBILDUNG 34: BEI <i>TAT-1</i> MUTANTEN VERLIEREN MITTELKÖRPER AN FLUORESZENZ.	49
ABBILDUNG 35: KEINE INTERNALISIERUNG UND ERHALTENE FLUORESZENZINTENSITÄT BEI <i>TAT-5</i> MUTANT.	51
ABBILDUNG 36: MITTELKÖRPER BEI <i>TAT-5</i> RNAi MUTANTEN ZEIGEN KONSTANTE FLUORESZENZ.	52
ABBILDUNG 37: <i>TAT-5</i> RNAi MUTANTEN ZEIGEN IM VIERZELLSTADIUM KEINE AKTINANREICHERUNG UM DEN P0 MITTELKÖRPER,	53
ABBILDUNG 38: LANGSAMERE GESCHWINDIGKEIT DER ZELLYKLEN BEI PI3K III MUTANTEN;	56
ABBILDUNG 39: <i>vps-34</i> MUTANT IM 15-ZELLSTADIUM (LINKS), ZUM VERGLEICH KONTROLLE (RECHTS);	57
ABBILDUNG 40: MITTELKÖRPER BEI PI3K III MUTANTEN VERLIEREN KAUM AN FLUORESZENZ;	59
ABBILDUNG 41: PI3K III IST BEI PHAGOZYTOSE BETEILIGT.	60
ABBILDUNG 42: AUTOPHAGIE-PROTEINE SIND NICHT ZUR INTERNALISIERUNG DER MITTELKÖRPER NÖTIG;	62
ABBILDUNG 43: FÜR DEN ABBAU DES MITTELKÖRPERS IST AUTOPHAGIE NÖTIG.	63
ABBILDUNG 44: MODELLHAFTER WEG DES MITTELKÖRPERS:	67

Tabelle 1: Analyierte *C. elegans* Mutanten mit Angabe des Genotyps sowie der Herkunft, Nachdruck mit freundlicher Genehmigung durch Company of Biologists LTD, Journal of Cell Science, Vol 129, S. 3721-3731, (Fazeli, Trinkwalder et al. 2016)

Linie	Genotyp	Herkunft
BV113	zuls45[nmy-2::NMY-2::GFP+unc-119(+)]IV; zbls2[pie-1::lifeACT::RFP+unc-119(+)]	Singh and Pohl 2014a
LP162	nmy-2(cp13[nmy-2::gfp+LoxP]) I.	Dickinson et al. 2013
WEH02	ltls38[pie-1::GFP::PH(PLC1δ1)+unc-119(+)] xnls8[pJN343: nmy-2::NMY-2::mCherry+unc- 119(+)]unc-119(ed3) III	Fazeli et al. 2016
WEH51	unc-119(ed3) III; xnls65[nmy-2::gfp::zf1+unc- 119(+)]IV; ltls44[pie-1::mCherry::PH(PLCδ1)+unc- 119(+)] V	Fazeli et al. 2016
WEH55	vps-34(h510) dpy-5(e61) I; ltls38[pie- 1::GFP::PH(PLC1δ1)+unc-119(+)] xnls8[pJN343: nmy-2::NMY-2::mCherry+unc-119(+)] unc- 119(ed3) III; enEx441[vps-34(+); ced-1C::mRFP]	Fazeli et al. 2016
WEH61	ced-1(e1735) I; xnls65[nmy-2::gfp::zf1+unc- 119(+)] IV; ltls44[pie- 1p::mCherry::PH(PLC1δ1)+unc-119(+)] V	Fazeli et al. 2016
WEH69	bec-1(ok691) xnls65[nmy-2::gfp::zf1 + unc- 119(+)] /nT1 IV; ltls44 [pie- 1p::mCherry::PH(PLC1δ1) + unc-119(+)] / nT1[qls51] V	Fazeli et al. 2016
WEH71	ced-2(e1752) XNLS65[NMY-2::GFP::ZF1 + UNC-119(+)] IV; ltls44 [pie-1p::mCherry::PH(PLC1δ1) + unc- 119(+)] V	Fazeli et al. 2016
WEH73	vps-34(h510) dpy-5(e61) I; unc-119(ed3) III; xnls65[nmy-2::gfp::zf1 + unc-119(+)] IV; ltls44[pie-1p::mCherry::PH(PLC1δ1) + unc-119(+)] V; enEx441[vps-34(+)+ced-1C::mRFP]	Fazeli et al. 2016
WEH75	tat-1(kr15:Mos) III; xnls65[nmy-2::gfp::zf1 + unc- (+)] IV; ltls44 [pie-1p::mCherry::PH(PLC1δ1) + unc-119(+)] V	Fazeli et al. 2016
WEH78	ltls38[pie-1::GFP::PH(PLC1δ1) + unc-119(+)] xnls8 [pJN343: nmy-2::NMY-2::mCherry + unc-119(+)] unc-119(ed3) III; ced-2(e1752) IV	Fazeli et al. 2016
WEH85	ced-2(e1752) zuls45[nmy-2::NMY-2::GFP + unc- 119(+)] IV; zbls2 [pie-1::lifeACT::RFP + unc-119(+)]	Fazeli et al. 2016
WEH93	tat-1(kr15:Mos) III; zuls45[nmy-2::NMY-2::GFP + unc-119(+)] IV; zbls2 [pie-1::lifeACT::RFP + unc- 119(+)]	Fazeli et al. 2016
WEH95	unc-119(ed3) III; pie-1::mCherry::HistoneH2B; xnls390 [pie-1::GFP::ZF1::PH(PLC1δ1) + unc- 119(+)]	Fazeli et al. 2016

WEH98	lgg-1(tm3489)II; ltIs38[pie-1::GFP::PH(PLC1 δ 1) + unc-119(+)] xnIs8 [pJN343: nmy-2::NMY-2::mCherry + unc-119(+)] unc-119(ed3) III; lgg-2(tm5755) IV; wurIs36[lgg-1::gfp fosmid WRM068A_G10]	Fazeli et al. 2016
WEH106	zbls2 [pie-1::lifeACT::RFP + unc-119(+)]I; bec-1(ok691) zuls45[nmy-2::NMY-2::GFP + unc-119(+)]IV / nT1[qIs51] (IV; V)	Fazeli et al. 2016

Linie	Internalisierung des P0 Mittelkörpers				Internalisierung des AB Mittelkörpers				Internalisierung des P1 Mittelkörpers			
	Anzahl (n)	3-8 Zell-Stadium	12 Zell-Stadium und mehr	Keine Internalisierung*	n	4-15 Zell-Stadium	16 Zell-Stadium und mehr	Keine Internalisierung*	n	4-15 Zell-Stadium	16-Zell-Stadium und mehr	Keine Internalisierung*
Kontrollen												
WEH02 (NMY-2::mCherry)	28	100%	0%	0%	20	95%	5%	0%	18	94%	6%	0%
WEH51 (NMY-2::GFP::ZF1)	28	96%	4%	0%	28	93%	0%	7%	28	93%	0%	7%
BV113 (NMY-2::GFP)	15	100%	0%	0%	13	100%	0%	0%	14	100%	0%	0%
Phagozytose Mutanten												
<i>ced-1</i>	17	0%	0%	100%	16	0%	0%	100%	17	0%	0%	100%
<i>ced-2</i>	21	0%	0%	100%	21	0%	0%	100%	21	10%	0%	90%
<i>abi-1</i> RNAi	12	66%	0%	33%	18	28%	5%	67%	18	46%	5%	50%
<i>pat-3</i> RNAi	12	100%	0%	0%	11	100%	0%	0%	10	100%	0%	0%
Autophagie Mutanten												
<i>lgg-1; lgg-2</i> RNAi	12	100%	0%	0%	12	100%	0%	0%	12	100%	0%	0%
<i>bec-1</i>	50	0%	0%	100%	22	0%	0%	100%	19	0%	0%	100%
<i>vps-34</i>	18	11%	6%	83%	18	22%	0%	78%	18	17%	5%	78%
Lipid Regulator Mutanten												
<i>tat-1</i>	12	100%	0%	0%	12	100%	0%	0%	12	100%	0%	0%
<i>tat-5</i>	11	0%	0%	100%	11	9%	0%	91%	11	0%	0%	100%

Tabelle 2: zeitliches Verhalten der Internalisierung der ersten drei Mittelkörper bei *C. elegans* Embryonen, *die Internalisierung des Mittelkörpers in die Zelle ist bis zum Ende des Films (60 bis 90 Minuten) noch nicht erfolgt; veränderter Nachdruck mit freundlicher Genehmigung durch Company of Biologists LTD, Journal of Cell Science, Vol 129, S. 3721-3731, Fazeli, Trinkwalder et al. (2016)