

Nukleation pflanzlicher Mikrotubuli: Expression relevanter Gene

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades

„Doktor der Naturwissenschaften“

Am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität
Mainz

Sven Schlag
geboren in Karlsruhe

Mainz 2008

*Wer allen etwas vorgedacht,
wird jahrelang erst ausgelacht;
begreift man die Entdeckung endlich
sagt jeder: Selbstverständlich!*

Walter Jensen

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe.

Mörfelden-Walldorf, den 10.04.2008

Sven Schlag

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Das Cytoskelett	1
1.1.1 Actinfilamente	4
1.1.2 Mikrotubuli	5
1.1.2.1 Aufbau der Mikrotubuli	5
1.1.2.2 Mikrotubuli während der Zellteilung bei Pflanzen	9
1.1.2.3 Kortikal Mikrotubuli in der Interphase	9
1.1.3 Mikrotubuli-organisierende Zentren (MTOCs)	10
1.1.4 γ -Tubulin und MTOCs	12
1.1.5 Nachweis von γ -Tubulin in Pflanzen	16
1.1.6 γ -Tubulin-Sequenzen und mögliche funktionelle Domänen	17
1.2 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit	19
2 Material und Methode	22
2.1 Sterilisation der benötigten Labormaterialien	22
2.2 Versuchsmaterial	22
2.2.1 Pflanzenmaterial	22
2.2.1.1 BY-2 Zellkultur aus <i>Nicotiana tabacum</i>	22
2.2.1.2 <i>Nicotiana tabacum</i> (SR1)	25
2.2.1.3 Wintergerste <i>Hordeum vulgare</i>	27
2.2.2 Bakterienstämme und Medien	28
2.2.2.1 Anzucht der Bakterien	28
2.2.2.1.1 Plattenkultur	28
2.2.2.1.2 Flüssigkultur	29
2.2.2.1.3 Dauerkultur	29
2.2.2.2 Herstellung der Bakterien-Nährmedien	29
2.2.2.3 Vernichtung von Bakterien	30
2.3 Charakterisierung des Pflanzenmaterials	31
2.3.1 BY-2 Zellkultur aus <i>Nicotiana tabacum</i>	31
2.3.1.1 Mikroskopie	31
2.3.2 <i>Nicotiana tabacum</i> (SR1)	31
2.3.2.1 Beobachtung des Wachstumsverhaltens	32
2.3.3 Wintergerste <i>Hordeum vulgare</i>	32

2.4 Molekularbiologischer Teil	33
2.4.1 Nukleinsäurepräparation.....	33
2.4.1.1 Präzipitation der Nukleinsäuren.....	33
2.4.1.2 Probenvorbereitung für Nukleinsäureextraktion.....	33
2.4.1.3 Extraktion von gesamt-RNA (gRNA).....	33
2.4.1.3.1 Isolation von gRNA mit PeqGold RNA Pure™.....	34
2.4.2 Nukleinsäure-Nachweismethoden.....	34
2.4.2.1 Photometrische Bestimmung.....	34
2.4.2.2 Ethidiumbromidfärbung.....	34
2.4.3 Agarose Gelelektrophorese.....	35
2.4.3.1 Längenstandard für Agarosegele.....	36
2.4.3.2 Durchführung der Agarose-Gelelektrophorese (Minigel) und Proben- vorbereitung.....	36
2.4.3.3 Dokumentation der Agarosegele.....	38
2.4.4 Reverse Transkription.....	38
2.4.5 Polymerasekettenreaktion (PCR) und Oligonukleotidprimer.....	39
2.4.5.1 Oligonukleotid-Primer.....	41
2.4.5.2 Anfertigen einer PCR-Sättigungskurve.....	43
2.4.5.3 Kolonie-PCR.....	43
2.4.6 Restriktion von DNA.....	43
2.4.7 Aufreinigung von DNA.....	44
2.4.7.1 Aufreinigung aus dem Agarosegel.....	45
2.4.7.2 Aufreinigung von Restiktionsverdau und PCR-Ansatz.....	46
2.4.8 Ligation.....	47
2.4.8.1 pGEM®-T Vektor System.....	47
2.4.8.2 GeneJet™ PCR Cloning Kit.....	48
2.4.8.3 pET-44a(+)-Vektor.....	49
2.4.9 Klonierung.....	50
2.4.9.1 Herstellung von kompetenten Bakterien.....	50
2.4.9.1.1 Kompetente XL 1-Blue MRF'-Zellen.....	50
2.4.9.1.2 Kompetente DH5α- und BL21-Zellen.....	50
2.4.9.2 Transformation.....	51
2.4.9.3 Selektion der Transformanten.....	51
2.4.9.3.1 Blau-Weiß-Selektion.....	52
2.4.9.3.2 Selektion über Lethal-Faktor.....	52
2.4.9.4 DNA-Sequenzierung.....	52
2.4.10 Proteinexpression von γ -Tubulin in <i>E. coli</i> und Induktion der Überexpression	53
2.5 Proteinbiochemischer Teil.....	54
2.5.1 Herstellung eines polyklonalen Antikörpers gegen γ -Tubulin.....	54

2.5.1.1 Polyklonaler Antikörper gegen pflanzlichen γ -B-Peptid-Bereich aus γ -Tubulin	55
2.5.1.2 Polyklonaler Antikörper gegen pflanzespezifische JOSHI-Domäne	56
2.5.1.3 Antikörperaufreinigung des γ -B-Peptid Antikörpers von Kaninchen KN 340 und KN341 mittels EAH-Sepharose	56
2.5.1.3.1 Kopplung der γ -B-Peptid-Sequenz an EAH Sepharose 4 B.....	57
2.5.1.3.2 Durchführung der Antikörperaufreinigung von Kaninchen KN 340 und KN 341	57
2.5.1.4 Nachweis von potentiellm γ -Tubulin im Western-Blot	58
2.5.2 Aufschuß des Pflanzenmaterials.....	59
2.5.3 Proteinbestimmung nach Bradford.....	60
2.5.3.1 Bestimmung des Proteingehalts	60
2.5.4 SDS-Gelelektrophorese von Proteinen.....	61
2.5.4.1 Molekulargewichtsmarker für die SDS-Gelelektrophorese	62
2.5.4.2 Herstellung der Gele	62
2.5.4.3 Probenvorbereitung und Durchführung der SDS-Gelelektrophorese ...	63
2.5.4.4 Gesamtproteinfärbung im Gel.....	65
2.5.4.5. Dokumentation der Gele	65
2.5.5 Western Blot.....	66
2.5.5.1 Proteintransfer auf die Membran	67
2.5.5.2 Gesamtfärbung auf dem Blot	68
2.5.5.2.1 Ponceau-Red Färbung der Membran.....	68
2.5.5.2.2 Amidoschwarz-Färbung der Membran.....	68
2.5.6 Immunochemischer Proteinnachweis.....	69
2.5.7 ECL-Detektionssystem.....	71
2.6 Computergestützte Sequenzanalysen	73
3 Ergebnisse	74
3.1 Auswahl des Pflanzenmaterials	74
3.1.1 Zellsuspensionskultur (BY-2) aus <i>Nicotiana tabacum</i>	74
3.1.1.1 Wachstumsverhalten der Zellsuspensionskultur (BY-2)	74
3.1.2 <i>Nicotiana tabacum</i> (SR1)	77
3.1.2.1 Wachstumsverhalten der Pflanzen	77
3.1.2.2 Wachstumsverhalten 11. Blatt	79
3.1.3 Wintergerste <i>Hordeum vulgare</i>	81
3.1.3.1 Zellulärer Entwicklungsgradient im Gerstblatt.....	81
3.2 Molekularbiologischer Teil	82
3.2.1 Nukleinsäureextraktionen.....	82

3.2.1.1	Resultate der gRNA-Extraktionen und Ansetzen der RT	83
3.2.1.2	Gelelektrophorese der RNA	83
3.2.3	Aufnahme einer Sättigungskurve für die PCR von Actin, α - und γ -Tubulin	84
3.2.4	Nachweis von Actin, α - und γ -Tubulin in verschiedenen Zellstadien	86
3.2.4.1	Nachweis der untersuchten mRNA in den Zellkultur (BY-2)	86
3.2.4.2	Nachweis der untersuchten mRNA bei der Tabakpflanze (SR1)	87
3.2.5	Sequenzierung der nachgewiesenen spezifischen mRNA in den ältesten Stadien von der Zellkultur (BY-2) und Tabakpflanze (SR1).....	90
3.2.6	Neues Housekeeping-Gen und Zellteilungsmarker in der PCR für die Zell- suspensionskultur (BY-2)	90
3.2.6.1	Aufnahme einer Sättigungskurve in der PCR von Histon H4 und Elongationsfactor-1 α	91
3.2.6.2	Nachweis von Histon H4 und Elongationsfactor-1 α in den Stadien der Zellsuspensionskultur (BY-2)	91
3.3	Proteinbiochemischer Teil.....	91
3.3.1	Gesamtproteingehalt der Extraktionen Zellkultur (BY-2), Tabakpflanze (SR1) und Gerste.....	91
3.3.2	Polyklonale Antikörper gegen den γ -B-Peptidbereich von γ -Tubulin	92
3.3.2.1	Testen von Präimmenserum und Serum von Kaninchen KN 334 im Western-Blot	92
3.3.2.2	Testen von Präimmenserum und verschiedenen Blutentnahmen von Kaninchen KN340 und KN 341 im Western-Blot.....	92
3.3.2.3	Aufreinigung der Seren von Kaninchen KN 340 und KN 341 mittels EAH-Sepharose.....	95
3.3.2.3.1	Photometrische Bestimmung der Eluate von Kaninchen KN 340 und KN 341 von der EAH-Säule.....	95
3.3.2.3.2	Testen der Eluate von Kaninchen KN 340 und KN 341 im Western-Blot	95
3.3.3	Polyklonaler Antikörper gegen den pflanzenspezifischen JOSHI-Bereich.....	97
3.3.3.1	Selektion der Kaninchen zur Immunisierung.....	97
3.3.3.2	Testen der verschiedenen Blutentnahmen von Kaninchen KN 714 und KN 746	98
3.3.3.3	Testen des aufgereinigten Antikörpers D81 von KN 746 auf Zell- Suspensionskultur (BY-2) und Gerste.....	99
3.3.3.4	Proteinnachweis in den Stadien des 2. Blatts der Gerste	100
3.3.3.5	Testen des aufgereinigten polyklonalen Antikörpers D81 von KN 746 auf überexprimiertes γ -Tubulin.....	101
3.3.4	Proteinnachweis in verschiedenen Zellentwicklungsstadien.....	102
3.3.4.1	Nachweis in den Stadien der Zellsuspensionskultur (BY-2)	102
3.3.4.2	Nachweis in den Stadien des 11.Blatts der Tabakpflanze (SR1).....	103
3.3.5	Test der Spezifität des Antikörpers auf γ -Tubulin bei anderen Pflanzen	106

4 Diskussion	107
4.1 Auswahl des Pflanzenmaterials und Wachstumsverhalten	109
4.2 Neues Housekeeping-Gen und Zellteilungsmarker in der PCR.....	111
4.3. Sequenzierung der detektierten Signale	112
4.4 Entwicklung eines pflanzenspezifischen γ-Tubulin-Antikörpers	112
4.4.1 Polyklonaler Antikörper gegen die pflanzliche γ -B-Peptid Sequenz	115
4.4.2 Polyklonaler Antikörper gegen die pflanzenspezifische JOSHI-Domäne	117
4.5 Vergleich der Expression von cytoskelett-relevanten Proteinen	118
4.5.1 Zellsuspensionskultur (BY-2)	119
4.5.2 Tabakpflanze (SR1).....	121
4.6 Funktion von γ-Tubulin in verschiedenen Zellentwicklungsstadien...	124
4.7 Test der Spezifität des Antikörpers auf γ-Tubulin bei anderen Pflanzen	125
4.8 Ausblick.....	125
5 Zusammenfassung.....	127
6 Literaturverzeichnis.....	129
7 Anhang	146
7.1 Verwendete Chemikalien	146
7.2 Abkürzungen	147
7.3 Symbole für die Darstellung der Aminosäuren.....	149
7.4 Alignment von γ-Tubulin-Sequenzen	149
7.5 Sequenzen für die im Rahmen der Arbeit neu entwickelten Primer ..	155

7.5.1 Actin (255bp)	155
7.5.2 Histon H4 (205bp).....	156
7.5.3 Elongationsfactor-1 α	157
7.6 Extinktionswerte der Photometrie und Berechnungen der gRNA.....	158
7.6.1 Zellsuspensionskultur (BY-2)	158
7.6.2 Tabakpflanze (SR1).....	158
7.7 Extinktionswerte der Proteinbestimmung und Berechnung des Gesamtproteins.....	159
7.7.1 Zellsuspensionskultur (BY-2)	159
7.7.2 Tabakpflanze (SR1).....	159
7.7.3 Gerste.....	160
7.8 Ergebnisse der Sequenzierungen.....	160
7.8.1 Sequenzier-Ergebnisse der Zellsuspensionskultur (BY-2).....	160
7.8.1.1 γ -Tubulin von Stadium 12.....	160
7.8.1.2 α -Tubulin von Stadium 12	161
7.8.1.3 Actin von Stadium 12	161
7.8.1.4 Histon H4 von Stadium 12.....	162
7.8.1.5 Elongationsfactor-1 α von Stadium 0 und 6	162
7.8.2 Sequenzier-Ergebnisse der Tabakpflanze (SR1).....	163
7.8.2.1 γ -Tubulin im alten Blattstadium	163
7.8.2.2 α -Tubulin im alten Blattstadium	164
7.8.2.3 Actin im alten Blattstadium	164

1 Einleitung

1.1 Das Cytoskelett

Das Cytoskelett von eukaryotischen Zellen stellt eine höchst dynamische Struktur dar und ist an den Bewegungsprozessen innerhalb und außerhalb der Zelle entscheidend beteiligt. Das Cytoskelett besteht aus einem Geflecht von Proteinfilamenten, die sich durch das gesamte Cytoplasma erstrecken. Zum Einen dient es der räumlichen Organisation der Zellorganellen innerhalb der Zelle, zum Anderen der Stabilisierung und Formgebung der Zelle und den Bewegungsvorgängen innerhalb der Zelle und Ihres Zellinhalts. Dadurch ist es der Zelle möglich, verschiedene Formen anzunehmen, sowie gerichtete Bewegungen, zusammen mit krafterzeugenden Proteinen (z.B. Myosin, Kinesin, Dynein), auszuführen (ALBERTS *et al.*, 2004).

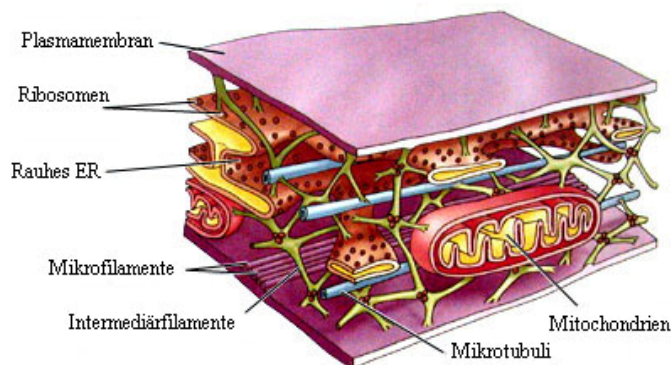


Abb. 1-1: Schematischer Aufbau einer Zelle mit Bestandteilen des Cytosketts

Das Cytoskelett beinhaltet drei Hauptgruppen von Proteinfilamenten: die Aktin-Filamente, die Intermediärfilamente und die Mikrotubuli (ALBERTS *et al.*, 2004; BASKIN, 2002). Diese Einteilung richtet sich nach der Größe und dem Durchmesser. Die Actinfilamente (Abb. 1-2 A), oder auch Mikrofilamente haben einen Durchmesser von ungefähr 8nm. Sie bestehen aus einem zweisträngigen helikalen Polymer, welches aus Untereinheiten von globulären Actin (G-Actin) gebildet wird. In Gegenwart von ATP kommt es zur Polymerisation zu einem biegsamen, spiraligem Filament (F-Actin). Aufgrund ihrer gleichgerichteten Anordnung der Monomere besitzen die Actinfilamente eine strukturelle und funktionelle Polarität (LODISH *et al.*, 2001). Die Hauptaufgabe

der Actinfilamente liegt in der Beteiligung an Bewegungsvorgängen mit Hilfe des Motorproteins Myosin (SITTE et al., 1998, LODISH et al., 2001; ALBERTS et al., 2004). Sie sind beispielsweise am Vesikeltransport, an der Phagozytose und der Cytokinese beteiligt. Auch der Transport von Organellen in Pflanzenzellen wird von den Actinfilamenten durchgeführt.

Ein weiterer Bestandteil des Cytoskeletts sind die Intermediärfilamente (Abb. 1-2 B). Dabei handelt es sich um kräftige, seilartige Fasern mit einem Durchmesser von ungefähr 10nm. Die Bezeichnung Intermediärfilamente kommt daher, dass ihr Durchmesser zwischen den dünnen Actinfilamenten und den dickeren Myosinfilamenten der glatten Muskelzellen liegt, bei denen sie zuerst entdeckt wurden (Alberts, 2004). Sie bestehen aus Intermediärfilament-Proteinen, welche eine große und heterogene Familie darstellen. Alle Intermediärfilament-Proteine sind aus einer stabförmigen, konservativen Domäne mit unterschiedlichen Köpfen aufgebaut.

Bei tierischen Organismen bildet ein Typ von Intermediärfilamenten ein Netzwerk, die Nuklearlamina, unterhalb der inneren nukleären Membran. Andere Typen erstrecken sich durch das gesamte Cytoplasma, und geben der Zelle mechanische Stabilität. In der Zellperipherie sind sie häufig im Bereich der Plasmamembran an Zell-Zell-Verbindungen, wie den Desmosomen, verankert. Dort ist die Membranaußenseite mit der einer anderen Zelle verknüpft (Alberts, 2004).

Bei Pflanzenzellen ist noch nicht eindeutig geklärt, ob homologe Proteine zu den tierischen Intermediärfilamenten existieren. Der Nachweis bei Pflanzen erweist sich aufgrund der starken Heterogenität als sehr schwierig (MENZEL, 1993). Bei Pflanzen wurden Proteine nachgewiesen, die strukturelle und funktionelle Ähnlichkeit zu den Intermediärfilamenten aufweisen. Viele Aufgaben der Intermediärfilamente in tierischen Zellen werden in Pflanzenzellen von der Zellwand übernommen, daher ist der Bedarf an einem solchen Skelettprotein vielleicht auch nicht so groß wie in tierischen Zellen ohne feste Zellwand (BASKIN, 2000).

Der dritte Bestandteil des Cytoskeletts sind die Mikrotubuli (Abb. 1-2 C). Die röhrenförmigen Mikrotubuli haben einen Außendurchmesser von 25nm und einen Innendurchmesser von etwa 19nm. Bei Pflanzenzellen können Mikrotubulus-Längen von 2,5-30µm gemessen werden. Mikrotubuli und Mikrofilamente können Kolokalisation miteinander eingehen (KUMAGAI, 2000; SHIBAOKA, 1993). Sie sind

wie die Mikrofilamente polar aufgebaut und sind in ihrer Grundeinheit aus Dimeren von α - und β -Tubulin zusammengesetzt. Mikrotubuli sind an mehreren Prozessen in der eukaryotischen Zelle maßgeblich beteiligt. Sie sind wie die Mikrofilamente in der Lage, intrazelluläre Translokationen cytoplasmatischer Bestandteile durchzuführen (LUDUENA, 1998), wie z.B. gerichteter Transport in Verbindung mit krafterzeugenden Proteinen, wie Dynein und Kinesin und Verschiebung von Chromosomen innerhalb der Kernspindel während der Mitose. Die Kolokalisation kortikaler Mikrotubuli mit Cellulose-Mikrofibrillen weist auf eine wichtige Rolle bei der Steuerung der Cellulosesynthase-Komplexe hin (ALBERTS, 2004) (s. auch Kap. 1.1.2.3). Sie spielen eine große Rolle bei den fundamentalen Ereignissen der Zellentwicklung wie Zellteilung, Wachstum und Differenzierung (z.B. CYR und PALEVITZ, 1995). Weiterhin sind sie auch an der Motilität von begeißelten Organismen (CHAPMAN *et al.*, 2000) wie den Cilien und den Flagellen zusammen mit den Mikrotubuli-assoziiierenden Proteinen (MAPs) beteiligt.

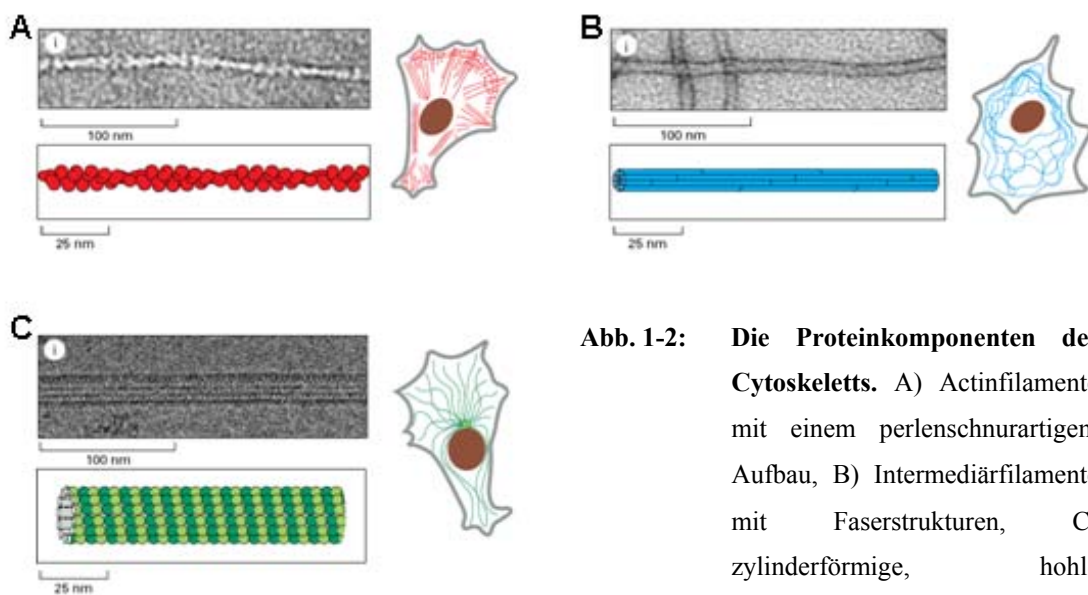


Abb. 1-2: Die Proteinkomponenten des Cytoskeletts. A) Actinfilamente mit einem perlenschnurartigem Aufbau, B) Intermediärfilamente mit Faserstrukturen, C) zylinderförmige, hohle Mikrotubuli; jeweils eine immunfluoreszenzmikroskopische Aufnahme und ein Modell. (Quelle: verändert nach ALBERTS *et al.*, 2004)

1.1.1 Actinfilamente

Actin wurde zunächst aus Muskelfasern isoliert. Später wurde seine Verbreitung auch in Eucyten nachgewiesen. Actin ist das häufigste Protein in einer eukaryotischen Zelle und eines der wichtigsten Proteine in Verbindung mit Myosin, wodurch kontraktile Elemente entstehen. In den höheren Pflanzen und Tieren wird Actin durch eine Genfamilie kodiert, wobei die Aminosäuresequenzen der Actine in der Evolution der Eukaryoten sehr stark konserviert sind (Strassburger, 2002)

Globuläres Actin (G-Actin) besteht aus zwei blattartigen Hälften, die durch eine tiefe Spalte (ATPase-Falte) voneinander getrennt sind. Das G-Actin hat einen Durchmesser von 4nm und eine Masse von 42kDa. Das Filament-Actin (F-Actin) besteht aus zwei helikal umeinander umwundenen Ketten von G-Actinuntereinheiten. Jedes G-Actin enthält in der ATPase-Falte ein mit ATP oder ADP komplexiertes Mg^{2+} -Ion (Abb. 1-3).

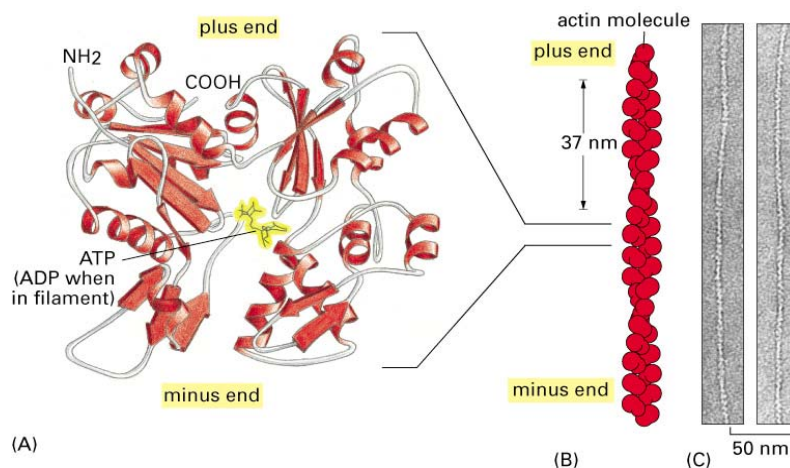


Abb. 1-3: Struktur von einem Actin-Monomer und Actin-Filament. A: Actin-Monomer hat eine Nucleotid-Bindestelle (ATP oder ADP) in der Spalte im Zentrum des Moleküls. B: Anordnung der Monomere im Filament. C: Elektronenmikroskopische Aufnahme von negativ gefärbten Actin-Filamenten (nach ALBERTS, 2004)

Durch Zugabe von Ionen (Mg^{2+} , K^+ oder Na^+) zu einer G-Actin-Lösung wird die Polymerisation von G-Actin unter Bildung von F-Actinfilamenten induziert. Dieser Vorgang ist reversibel, denn F-Actin depolymerisiert, wenn die Ionenstärke der Lösung erniedrigt wird. Die in-vitro hergestellten F-Actinfilamente können nicht von den Mikrofilamenten unterschieden werden, die aus Zellen isoliert wurden. Daher sind andere Faktoren, wie etwa weitere Proteine, zur Polymerisation von Actin in-vivo nicht erforderlich. Die im F-Actin vorhandene Polarität rührt daher, dass die ATP-

Bindungstasche einer Actin-Untereinheit nur vom „Minus-Ende“ des Filaments her erreichbar ist. Bei der Zusammenlagerung von G-Actin zu F-Actin wird ATP zu ADP und P_i hydrolysiert, wobei die Hydrolyse von ATP lediglich die Geschwindigkeit der Polymerisation beeinflusst (LODISH, 2001).

Obwohl Actinfilamente spontan entstehen können, konnte in neueren Untersuchungen an Protozoen, Pilzen und tierischen Zellen nachgewiesen werden, dass auch Proteinkomplexe eine Schlüsselrolle in der de novo Polymerisation von Actinfilamenten spielen (MACHEWSKY und GOULD, 1999). Durch Untersuchungen an *Arabidopsis thaliana* konnten auch in Pflanzenzellen ähnlichen Proteinen eine Beteiligung an der Nukleation von Actinfilamenten nachgewiesen werden (MATHUR et al., 2003). Folgende Untersuchungen an BY-2 Zellen von *Nicotiana tabacum* zeigten, dass im kortikalen Cytoplasma und an der Kernhülle Nukleationsstellen vorliegen, die ähnlich wie die Bildungsstellen der Mikrotubuli als „Nucleation Sites“ für Actinfilamente dienen (POKORNA et al., 2004).

Actinfilamente weisen kinetische Polarität auf. Der Einbau weiterer Actinmoleküle erfolgt überwiegend am sogenannten Plus-Ende. Die Filamentbildung startet in der lebenden Zelle an besonderen Nukleationsorten, die mit Actin-bindenden Proteinen besetzt sind (α -Actinin). Interessanter Weise sitzt an diesen Bildungszentren das Plus-Ende des Filaments fest. Das Wachstum von Mikrofilamenten erfolgt durch die Verlängerung am fixierten, nicht am freien Ende (Mikrotubuli verhalten sich in dieser Hinsicht entgegengesetzt) (Strasburger, 2002)

1.1.2 Mikrotubuli

1.1.2.1 Aufbau der Mikrotubuli

Mikrotubuli (Abb. 1-4) sind röhrenförmige Filamente die sich meist aus 13 parallel angeordneten Protofilamenten zusammensetzen. Die Protofilamente sind aus einer linearen Kette von Heterodimeren, von jeweils strukturell nah verwandten globulären Proteinen dem α - und β -Tubulin, aufgebaut. Die Heterodimere sind entlang der Längsachse eines Mikrotubulus leicht gegeneinander verschoben, wodurch eine spiralige Anordnung der Heterodimere im Gitternetz der Mikrotubuluswand entsteht (MANDELKOV, 1994; BASKIN, 2002).

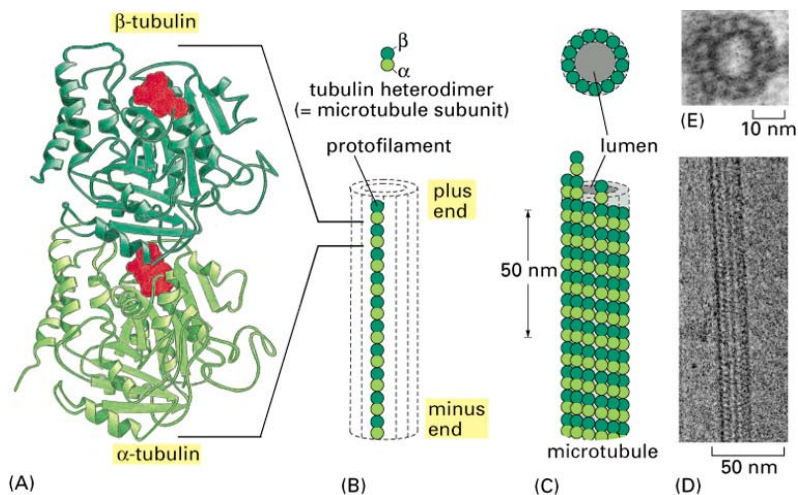


Abb. 1-4: Struktur von einem Mikrotubulus und seiner Untereinheiten. (A) Die Untereinheit von jedem Protofilament ist ein Tubulin-Dimer aus α - und β -Tubulin. Das GTP (rot) am α -Tubulin ist fest gebunden, das GTP am β -Tubulin ist weniger stark gebunden und spielt eine wichtige Rolle in der Filament Dynamik. (B) eine Tubulin-Untereinheit (α - und β -Tubulin Heterodimer) und ein Protofilament. (C) Mikrotubulus-Röhre aus 13 Protofilamenten. (D) kurzes Segment eines Mikrotubulus im Elektronenmikroskop (nach ALBERTS, 2004)

Die Mikrotubuli besitzen eine polare Struktur. Eine wichtige Eigenschaft der Mikrotubuli ist die Bindung von GTP an jede Untereinheit. Dabei spielt das an α -Tubulin gebundene GTP wahrscheinlich eine strukturelle Rolle. Es kann nicht hydrolysiert werden (MANDELKOV, 1994). Im Gegensatz kann das an β -Tubulin gebundene GTP im Verlauf des Mikrotubuli-Aufbaus zu GDP hydrolysiert werden. Diese Hydrolyse ist die Grundlage des in Mikrotubuli überwiegenden dynamischen Verhaltens: der dynamischen Instabilität (s. Abb. 1-5).

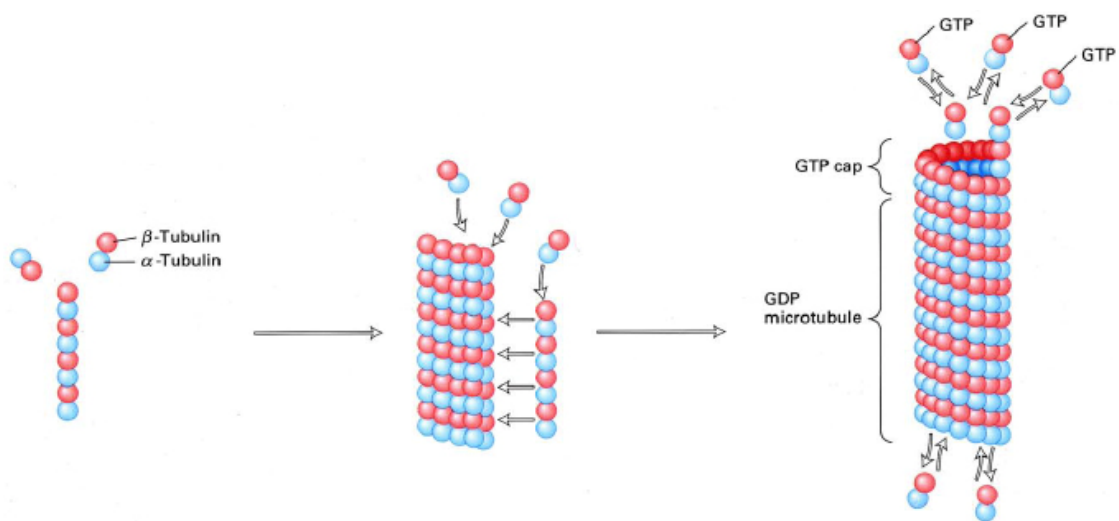


Abb. 1-5: Aufbau von Mikrotubuli. Nach Anlagerung freier $\alpha\beta$ -Tubulineinheiten zu kurzen Protofilamenten können sich flächige Strukturen und dann zylinderförmige Mikrotubuli zusammenlagern. Anschließendes Wachstum erfolgt durch die Anlagerung von GTP-Tubulindimeren am Plus-Ende. (Quelle LODISH *et al.*, 2005)

Die Assemblierung der Tubuline zu Mikrotubuli erfolgt auf der Stufe von GTP-aktivierten Heterodimeren. Diese aktivierten Heterodimere werden an den Enden der Mikrotubuli eingebaut. Aufgrund der raschen Hydrolyse zum instabileren GDP-Tubulin kann das Wachstum der Mikrotubuli nur dann erfolgen, wenn genügend GTP-Tubulin nachgeliefert wird. Daher weisen wachsende Mikrotubuli nur an ihren Enden einen hohen Anteil an GTP-Tubulinen auf, dem so genannten GTP-Cap. Dieser GTP-Cap wirkt strukturstabilisierend, wogegen GDP eher eine destabilisierende Wirkung besitzt und den Abbau des Mikrotubulus fördert (Abb. 1-6). Dabei wird das Mikrotubuli-Ende, an dem eine Anlagerung von GTP-Tubulin erfolgt, als Plusende bezeichnet, wogegen das Mikrotubuli-Ende mit GDP-Tubulin und Abbauerscheinungen als Minusende bezeichnet wird (s. Abb. 1-5) (BASKIN 2002). Verschiebt sich das Verhältnis von Anlagerung und Ablösung wieder zugunsten der Anlagerung von Dimeren, kommt es zum erneuten Wachstum des Mikrotubulus (ALBERTS *et al.*, 2004; AMOS, 2004).

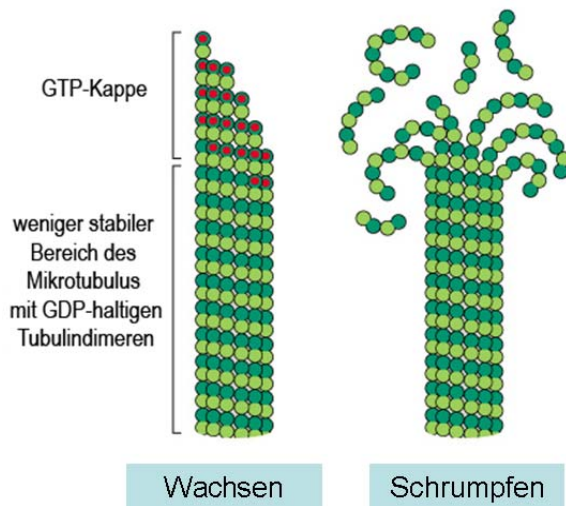


Abb. 1-6: Dynamische Instabilität; Wachsen und Schrumpfen von Mikrotubuli. Der wachsende Mikrotubulus wird durch die „GTP-Kappe“ stabilisiert. Geht die stabilisierende Kappe verloren, „franst“ der Mikrotubulus aus. (Quelle ALBERTS, 2004)

Die Depolymerisation von pflanzlichen Mikrotubuli zeigt allgemein eine höhere Abbaurate als die tierischer Zellen. Diese unterschiedlichen Abbauraten werden wahrscheinlich durch unterschiedliche Isoformen des pflanzlichen α - und β -Tubulins verursacht. Diese werden bei höheren Pflanzen durch eine Genfamilie codiert. Verschiedene Untersuchungen haben gezeigt, dass pflanzliches Tubulin aus unterschiedlichen Untereinheiten gebildet wird. Diese Isoformen unterscheiden sich dabei in ihrer Aminosäuresequenz und auch im Grad der posttranskriptionellen Modifikation (MOORE et al., 1997). Diese Hypothese legt den Schluss nahe, dass eine Pflanzenzelle die dynamischen Eigenschaften und die Struktur direkt durch den Einbau der unterschiedlichen Isoformen beeinflussen kann (PANDA et al., 1994). So werden beispielsweise Mikrotubuli bei Eintritt der Zelle in die Mitose anfangs dynamischer und wechseln sehr häufig zwischen Wachstum und Schrumpfen, als dies cytoplasmatische Mikrotubuli normalerweise tun (ALBERTS, 2004).

Struktur und dynamisches Verhalten werden zum großen Teil auch durch die Assoziation von Mikrotubuli-assoziierten Proteine (MAPs) reguliert. MAPs können Mikrotubuli stabilisieren und so ihren Zerfall verhindern. Andere Proteine verbinden Mikrotubuli mit anderen Zellkomponenten, einschließlich anderer Filamenttypen des Cytoskeletts.

Tubulin-Dimere sind grundsätzlich zur Selbstassemblierung in der Lage, haben *in vivo* jedoch meist ihren Ursprung in MTOCs (microtubule organizing centers). MTOCs sind

Nukleationsstellen für Mikrotubuli und schützen die Minusenden vor unkontrollierter Depolarisation.

1.1.2.2 Mikrotubuli während der Zellteilung bei Pflanzen

Die höchste Instabilität weisen die Mikrotubuli während der Mitose auf. Diese ist essentiell für die Mitose, da die Mikrotubuli je nach den wechselnden Bedürfnissen der Zelle polymerisieren und depolymerisieren (LODISH, 2001).

In der Interphase liegen die Mikrotubuli relativ gleichmäßig in einer meist parallelen Anordnung im Cortex der Zelle vor und spielen eine wichtige Rolle für die Zellmorphogenese. Die Organisation der transversal orientierten kortikalen Mikrotubuli könnte bestimmend für die Form der Zelle sein. Die Orientierung der von membranständigen Cellulose-Synthase-Komplexen synthetisierten Cellulose-Mikrofibrillen entspricht der parallelen Anordnung der dicht gepackten Mikrotubulistränge. Zu Beginn der Mitose sammeln sich die Mikrotubuli am Zelläquator, wodurch die cortikale Interphaseanordnung durch das Präprophaseband (PPB) ersetzt wird. Durch das PPB wird vermutlich die Zellteilungsebene determiniert. Mit Beginn der Prophase wird das Präprophaseband zurückgebildet und zum Zeitpunkt der Kernhüllen-Auflösung durch die Mitosespindel ersetzt, die für die exakte Verteilung der Chromosomen verantwortlich ist. Während der Telophase wird die Mitosespindel abgebaut. Am Zelläquator werden die Mikrotubuli in großer Zahl angeordnet, die senkrecht zur Äquatorebene orientiert sind. Diese bilden den sogenannten Phragmoplasten. In der Umgebung der Phragmoplasten sammeln sich die Dictyosomen, von denen mit Zellwandmatrix gefüllte GOLGI-Vesikel in den Phragmoplasten einwandern, sich in der Äquatorebene in einer Schicht anordnen und miteinander verschmelzen. Auf diese Art entsteht als erstes die Mittellamelle und dann Zellwand zwischen den Tochterzellen (z.B. NULTSCH, 2001; CYR und PALEVITZ, 1995).

1.1.2.3 Kortikale Mikrotubuli in der Interphase

Bei tierischen Organismen resultieren die Mikrotubuli in der Interphase aus der Nukleationsaktivität des Centrosoms (SHU, 1995). Die kortikalen Mikrotubuli liegen bei Pflanzenzellen unterhalb der Plasmamembran. Diese richten sich parallel zueinander aus, wobei der Mechanismus der Ausrichtung noch weitgehend unbekannt ist. Denkbar

ist eine Ausrichtung der kortikalen Mikrotubuli über Signaltransduktionsketten, die durch Signale von außerhalb der Zelle beeinflusst werden kann (BASKIN, 2004)

Die auffallende Kolo-kalisation kortikaler Mikrotubuli mit Cellulose-Mikro-fibrillen bei Pflanzen läßt darüber hinaus vermuten, daß Mikrotubuli hier eine Funktion bei der Steuerung der Cellulose-Synthase-Komplexe übernehmen (Abb. 1-7). Die kortikalen Mikrotubuli dienen auf noch unbekannt-e Weise den Cellulose-Synthase-Komplexen auf der Außenseite der Plasmamembran als Schienen. Neu gebildete Cellulosefibrillen werden so parallel zu den Mikrotubulibändern abgelagert. Dies führt zu einer Versteifung der Zelle, die ein seitliches Wachsen verhindert, wodurch das Wachstum in Zellexpansionsrichtung kanalisiert wird (BASKIN, 2004; LLOYD und CHAN, 2002; GRANGER und CYR, 2001).

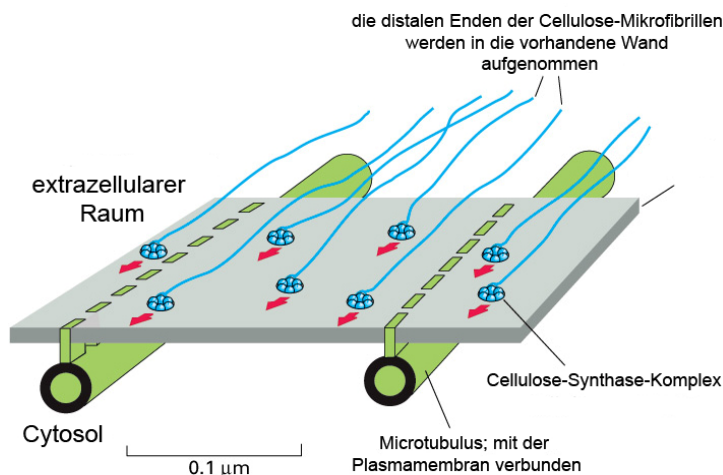


Abb. 1-7: Lage der kortikaler Mikrotubuli an der Plasmamembran. Hypothetisches Modell für den Mechanismus, durch den aufgrund der Orientierung der Mikrotubuli die Richtung von neu eingelagerter Cellulose-Mikro-fibrillen bestimmt wird. (verändert nach ALBERTS, 2004)

1.1.3 Mikrotubuli-organisierende-Zentren (MTOCs)

In vielen Organismen gehen die Mikrotubuli aus morphologischen Strukturen hervor, die erstmals 1969 von PICKET-HEAPS als Mikrotubuli-organisierende-Zentren (MTOCs) beschrieben wurden (OVECHINKA und OAKLEY, 2002). Einen Prototyp der MTOCs stellt das Centrosom der tierischen Zellen dar. Das Centrosom ist in den tierischen Zellen das wichtigste Mikrotubuli-organisierende-Zentrum. Es besteht aus zwei rechtwinklig zueinander stehenden Centriolen, die von einer amorphen Matrix,

dem pericentriolaren Material (PCM), umgeben sind. Die Centriolen gleichen Zylinder, die aus neun radiär angeordneten Mikrotubuli-Triplets aufgebaut sind (PREBLE *et al.*, 2000). Die pericentriolare Matrix ist der Ausgangspunkt für die Polymerisation der Mikrotubuli (KELLOG *et al.*, 1994). Auch die Basalkörper der Flagellen und Cilien sind auf diese Weise aufgebaut.

Das Centrosom und die Centriolen verdoppeln sich in der Interphase (Abb. 1-8) und wandern zu Beginn der Mitose zu entgegengesetzten Seiten des Zellkerns und bilden die Mitosespindel. Nach der Telophase erhält jede Tochterzelle ein Centrosom.

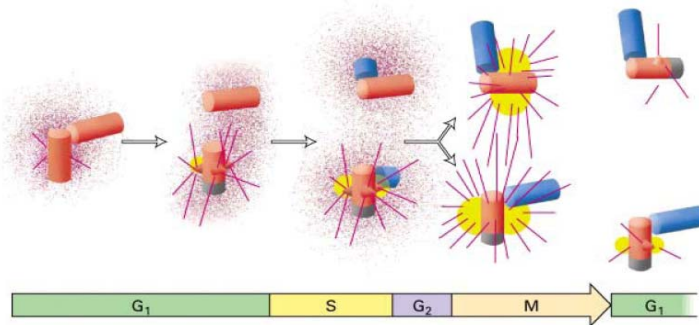


Abb. 1-8: Verdopplung des Centrosoms im Verlauf des Zellzyklus. Die Replikation der Centriolen beginnt mit der Trennung des Centriolenpaares. Die Tochtercentriole entsteht durch „Knospung“ an der Seite jedes Centriolenpaares. In der G₂-Phase sind die Tochtercentriolen zur vollständigen Größe herangewachsen, verbleiben aber in einem Centrosom. In einem frühen Mitosestadium teilt sich das Centrosom, wodurch beide Centriolenpaare zu gegenüberliegenden Enden der Zelle wandern. (Quelle: LODISH *et al.*, 2001)

Die im Tierreich weit verbreiteten Centriolen kommen im Pflanzenreich jedoch nur bei einigen Algen, bei der Spermatogenese in Bryophyten und wenigen Gymnospermen vor. Über die Lage und das Auftreten von MTOCs ist bei Pflanzen noch wenig bekannt. Es werden verschiedene Modelle diskutiert. MTOCs in höheren Pflanzen scheinen unter anderem diffus in den kortikalen Bereichen des Cytoplasmas oder in dem an der Kernhülle grenzenden Cytoplasma aufzutreten (VAUGHN und HARPER, 1998).

Das γ -Tubulin, ein Mitglied der Tubulin-Superfamilie, wurde als spezifischer Bestandteil der MTOCs identifiziert und spielt vermutlich eine Rolle bei der Nukleation und Assemblierung der Mikrotubuli (OAKLEY, 2000).

1.1.4 γ -Tubulin und MTOCs

Bei genetischen Untersuchungen von *Aspergillus nidulans* wurde eine weitere Variante der Tubulinfamilie, das γ -Tubulin entdeckt. Dabei fand man heraus, dass der Unterschied der Sequenzen von α - und β -Tubulin im Vergleich zum γ -Tubulin genauso groß ist, wie der Unterschied zwischen dem α - und dem β -Tubulin untereinander (OAKLEY und OAKLEY, 1989). Anschließende Untersuchungen ergaben zu dem in *Aspergillus nidulans* gefundenen γ -Tubulin homologe Sequenzen in Drosophila und Mensch (ZHENG *et al.*, 1991), in der Maus (JOSHI *et al.*, 1992), in Xenopus (STEARNS *et al.*, 1991) und *Schizosaccharomyces pombe* (HORIO *et al.*, 1991). Bei einem Vergleich mit den Sequenzen des α - und des β -Tubulins stellte man fest, dass sich das γ -Tubulin recht deutlich unterscheidet (BURNS, 1991). α - und β -Tubulin, die Hauptbestandteile eines Mikrotubulus, zeigen eine Homologie von 35-40% zueinander, das γ -Tubulin weist einen Homologiegrad von ca. 35% zu α - und β -Tubulin auf. Daher ist das γ -Tubulin nicht als ein Isotyp der α - oder β -Tubulinfamilie anzusehen, sondern als ein weiteres Mitglied der Tubulin-Superfamilie (STEARNS *et al.*, 1991).

Versuche mit Antikörpern gegen γ -Tubulin zeigten, dass γ -Tubulin eine Komponente der MTOCs bei Tieren darstellt und im Bereich der Centrosomen nachzuweisen ist. Dadurch spielt es vermutlich auch eine Rolle bei der Mikrotubuli-Nucleation. So wurde nachgewiesen, dass bei mit γ -Tubulin Antikörpern behandelten Zellen die Neubildung der Mikrotubuli verhindert wird (LODISH *et al.*, 2001). Weitere Versuche zeigten, dass es bei einer Deletion oder Mutation des γ -Tubulins zu starker Verminderung der Mikrotubuli in der Zelle kommt (OAKLEY, 2000). Daher wird vermutet, dass γ -Tubulin in den MTOCs mit α - und β -Tubulin in Wechselwirkung tritt und die Nukleation der Mikrotubuli bewirkt.

Aufgrund der bei Tieren gewonnenen Erkenntnisse wurde auch bei Pflanzen nach γ -Tubulinen gesucht. Mit Antikörpern gegen einen konservierten Sequenzbereich des γ -Tubulins konnten in Pflanzen γ -Tubuline identifiziert werden (LIU *et al.*, 1993 und OAKLEY, 2000). Das erste γ -Tubulin Gen in Pflanzen wurde aus dem Farn *Anemia phyllitides* isoliert und sequenziert (FUCHS *et al.*, 1993). Desweiteren wurden die γ -Tubuline in *Arabidopsis thaliana* (LIU *et al.*, 1995) und *Zea mays* (JOSHI *et al.*, 1996) identifiziert, sowie in der eigenen Arbeitsgruppe die γ -Tubulinsequenzen von *Nicotiana tabacum* und *Hordeum vulgare* (SCHRÖDER *et al.*, 2002). Aufgrund der Nachweise von γ -Tubulin im Pflanzenreich, kann man sagen, dass γ -Tubulin sehr weit verbreitet

und konserviert ist. Anti- γ -Tubulin Antikörper konnten in Pflanzen an kortikalen Mikrotubuli, PPB und Phragmoplasten sowie an Kernhüllen und Spindelpolregionen assoziiert werden (GODDARD *et al.*, 1994). Durch die Möglichkeit von Tieren gewonnene Antikörper gegen γ -Tubulin immunochemisch einzusetzen, konnte in Pflanzen, unabhängig von morphologischen sichtbaren Markern wie Centriolen, γ -Tubulin lokalisiert werden (MARC, 1997).

Von Oakley wurde ein Modell eines γ -Tubulin-Ringkomplexes (s. Abb. 1-9) beschrieben, der einen Ausgangspunkt für die Nukleation von 13 Protofilamenten darstellt (OAKLEY, 2000). Es wurde der biochemische und ultrastrukturelle Beweis geliefert, dass γ -Tubulin von *Drosophila* einen Multi-Protein-Ringkomplex (γ -TuRC) formt (MORITZ *et al.*, 1995).

Ebenso konnte in *Xenopus* Eiern erstmals ein 2000 kDa großer Komplex aus 7 Proteinen isoliert werden, der aus α - und β -Tubulin und auch aus 10-14 Molekülen γ -Tubulin bestand sowie mindestens sechs weiteren Proteinen. (ZHENG *et al.*, 1995). Zu diesen Proteinen zählen Xgrip 109 und Xgrip 110 in *Xenopus*, die homolog sind zu Dgrip 84 und Dgrip91 in *Drosophila* und Spc 97 und Spc 98 bei *Sacharomyces cerevisiae*. Zwei γ -Tubulin-Moleküle bilden mit je einer Kopie von Dgrip 84 und Dgrip91 eine Untereinheit des γ -TuRC, die als γ -Tubulin-Small Complex (γ -TuSC) bezeichnet wird. Man geht davon aus, daß ein γ -TuRC sechs oder sieben γ -TuSC-Untereinheiten enthält. In *Drosophila* wurden neben Dgrip84 und Dgrip91 weitere Proteine nachgewiesen, die den γ -TuRC aufbauen (MORITZ und AGARD, 2001).

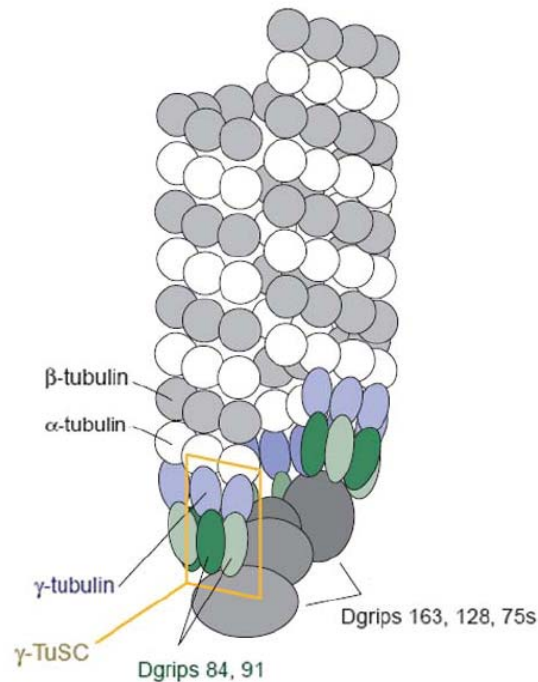


Abb. 1-9: Modell zum Aufbau eines γ -TuRC. Der γ -TuRC ist aus sechs oder sieben γ -TuSC aufgebaut. Jeder γ -TuSC besteht aus zwei γ -Tubulin und je einem Dgrip 84- sowie einem Dgrip 91-Molekül. (Quelle: MORITZ et al., 2000)

Es scheint sehr wahrscheinlich, daß der γ -TuRC zumindest zwei Funktionen in der Zelle erfüllt: Die Nukleation von Mikrotubuli an Mikrotubuli-organisierenden Zentren (MTOCs) oder „nucleation sites“ und das „kappenartige“ Versiegeln des Minus-Endes, das das freie GDP-Ende des Mikrotubulus vor Depolymerisation schützt (MORITZ et al., 2000; WIESE und ZHENG, 2000).

Obwohl in Zellen höherer Pflanzen bisher keine Centrosomen-ähnlichen Organellen gefunden wurden, konnten doch γ -Tubulin und zu Spc97 und Spc 98 homologe Proteine (Spc 97p und Spc 98p) nachgewiesen werden. Spc98p interagiert mit γ -Tubulin und Spc97p mit Spc98p, daher könnte Spc98p als Marker für Mikrotubuli-bildende Komplexe betrachtet werden (ERHARDT et al., 2002). Spc98p ist mit γ -Tubulin entlang der Nucleus-Oberfläche kolokalisiert, die schon als „nucleation site“ höherer Pflanzen gilt, ebenso wie nahe der Plasmamembran. Nukleationskomplexe an dieser Stelle deuten darauf hin, dass kortikale Mikrotubuli möglicherweise direkt hier ausgebildet werden könnten und nicht von der Nucleus-Oberfläche aus transportiert werden müssen. Das entlang der Mikrotubuli-Arrays gefundene γ -Tubulin ist dagegen

nicht mit Spc98p kolokalisiert, es erfüllt somit vermutlich eine andere Funktion als die der Nukleation, beispielsweise könnte es Einfluß auf die Eigenschaften der Mikrotubuli nehmen oder eine Transport- oder Speicherform darstellen (ERHARDT et al., 2002). Diese Ergebnisse sind aber als fragwürdig zu erachten, da hier mit isolierten Nuclei gearbeitet wurde, und diese Signale auch als Versuchsartefakte anzusehen sind.

STOPPIN-MELLETT et al. (2000) identifizierten zwei γ -Tubulin enthaltende Komplexe unterschiedlicher Größe in Mais-Zellen. Der größere der beiden Komplexe ($>1500\text{kDa}$) wies ein Proteinprofil auf, ähnlich dem tierischer Tubulin-Komplexen, so dass es sich hierbei möglicherweise um Homologa handeln könnte. Der zweite, kleinere Komplex (750kDa) scheint sich unter anderem aus γ -Tubulin und Hitzeschockproteinen zusammensetzen. Bei Letzterem wird eine Faltungs- oder Modulationsaufgabe bei Mikrotubuli vermutet (STOPPIN-MELLETT et al., 2000). Über die Regulation von γ -Tubulin-Komplexen ist bisher nur wenig bekannt. Man glaubt, dass die Phosphorylierung von Spc98p und die Bindung von Guanin-Nukleotiden an γ -Tubulin eine Rolle spielen (SCHIEBEL, 2000) könnten.

Wie nun aber γ -Tubulin mit α - und β -Tubulin in Wechselwirkung tritt, wird momentan an verschiedenen Modellen diskutiert. Aufgrund der Struktur des γ -TuRC werden zwei Modellvorstellungen favorisiert (Abb. 1-10). Beim ‚template‘-Modell (Abb. 1-10 links) wird der γ -TuRC als offener Ring aus 10-14 lateral interagierenden γ -Tubulin-Molekülen betrachtet, mit Längskontakten einerseits zu den übrigen Proteinen des Komplexes und andererseits zu den Tubulin-Heterodimeren, so daß letztlich jedes γ -Tubulin-Molekül an der Basis eines Protofilamentes sitzt (ZHENG et al., 1995). Das ‚protofilament‘-Modell (s. Abb 1-10 rechts) postuliert einen Ring aus längsgerichtet aneinander gebundenen γ -Tubulin-Molekülen. Zur Nukleation soll sich ein Teil des Komplexes strecken und so das initiale Protofilament eines Mikrotubulus darstellen, an das sich wiederum lateral und longitudinal α - und β -Tubulin anlagern können (ERICKSON und STOFFLER, 1996). Beide Modelle werden mit fortschreitenden Erkenntnissen überarbeitet und angepaßt (zur Übersicht ERICKSON, 2000; MORITZ und AGARD, 2001).

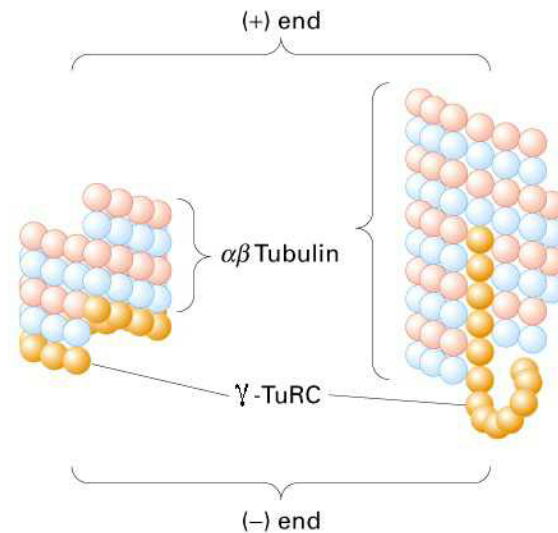


Abb. 1-10: Modelle für die Funktion von γ -Tubulin beim Zusammenbau der Mikrotubuli. γ -Tubulin (orange) dient als Keim für das Wachstum entweder als mit Proteinen assoziierter Ringkomplex (links) oder als Protofilament (rechts), an das sich $\alpha\beta$ -Dimere anlagern können. (Quelle: verändert nach LODISH *et al.*, 2001)

1.1.5 Nachweis von γ -Tubulin in Pflanzen

Mittels immunfluoreszenz-mikroskopischer Aufnahmen wurde γ -Tubulin in pflanzlichen Zellen in Form eines punktierten Muster an den kortikalen Mikrotubuli von Interphasezellen, dem PPB und an Teilen des Phragmoplasten, sowie an der Nucleus-Oberfläche beobachtet (LIU *et al.*, 1993; PANTERIS *et al.*, 2000; MURATA *et al.*, 2005). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass γ -Tubulin unter anderem in den MTOCs lokalisiert ist und dort eine Funktion bei der Nukleation von Mikrotubuli übernimmt.

Punktförmige Signale an den Kortikalen Mikrotubuli, die von den Minus-Enden zu den Plus-Enden der Mikrotubuli schwächer werden, könnten bedeuten, dass γ -Tubulin an den Minus-Enden kurzer Mikrotubuli sitzt, die ihrerseits zu Arrays gebündelt sind, oder aber, dass γ -Tubulin an den Seiten der Mikrotubuli bindet oder mit eingebaut wird (OAKLEY, 2000).

WASTENEY (2000) führt die Punktierung auf eine Mikrotubuli-abhängige Mikrotubuli-Nukleation zurück. Dabei werden an bestehende kortikale Mikrotubuli cytosolische γ -Tubulin-Komplexe seitlich gebunden, woraufhin im ungefähren 40° Winkel ein neuer Mikrotubulus nukleiert wird. Bei Depolymerisation des ersten Mikrotubulus bleibt das Minus-Ende des neuerzeugten Mikrotubulus stabil. Erst bei

Depolymerisation des neuerzeugten Mikrotubulus über die dynamische Instabilität des Plus-Endes wird der γ -Tubulin-Komplex wieder frei. Die Anordnung der Mikrotubuli soll anschließend über MAPs erfolgen (MURATA et al., 2005)

Trotz der bisherigen Ergebnisse ist noch nicht genau geklärt, wie γ -Tubulin als Schlüsselement der MTOCs genau funktioniert, wie es reguliert wird und ob es noch andere Aufgaben im komplexen System der Mikrotubuli übernimmt.

1.1.6 γ -Tubulin-Sequenzen und mögliche funktionelle Domänen

Pflanzliche γ -Tubuline weisen untereinander eine 90%ige Homologie auf, dagegen beträgt die Homologie zu den γ -Tubulinen von Pilzen, Algen und Metazoen nur 60-70% (MARC, 1997). Bei vergleichenden Untersuchungen von bekannten γ -Tubulin Sequenzen und den Homologien zu α - und β -Tubulin wurde festgestellt, dass der N-terminale Bereich von γ -Tubulin eine Homologie von ungefähr 40% zu α - und β -Tubulin zeigt, wogegen der C-terminale Bereich nur eine Homologie von ungefähr 23% zeigt. Aufgrund dieser Untersuchung wird vermutet, dass es sich hier um funktionelle Domänen des γ -Tubulins handelt. Dabei wird spekuliert, dass der N-terminale Bereich des γ -Tubulins an die $\alpha\beta$ -Dimere bindet, wogegen der C-terminale Bereich mit centrosomalen Proteinen zu interagieren scheint (BURNS, 1995).

BURNS (1995) beschrieb, dass γ -Tubulin zwei auffallend divergente Peptidbereiche beinhaltet, die als γ -A-Peptid und γ -B-Peptid bezeichnet werden (s. Abb. 1-11 und Abb. 1-12 für die Lage der beiden Peptidbereiche im γ -Tubulin). Diese beiden Peptidsequenzen liegen im C-terminalen Bereich und besitzen von Spezies zu Spezies eine variable Anzahl von Deletionen und Insertionen. Die flankierenden Bereiche des γ -A-Peptid und γ -B-Peptid weisen hingegen sehr starke Homologien auf. Es wird vermutet, dass die beiden Peptidbereiche im gefalteten Protein an der Außenseite exponiert liegen und so mit assoziierenden Proteinen interagieren könnten (BURNS, 1995; INCLAN und NOGALES, 2001).

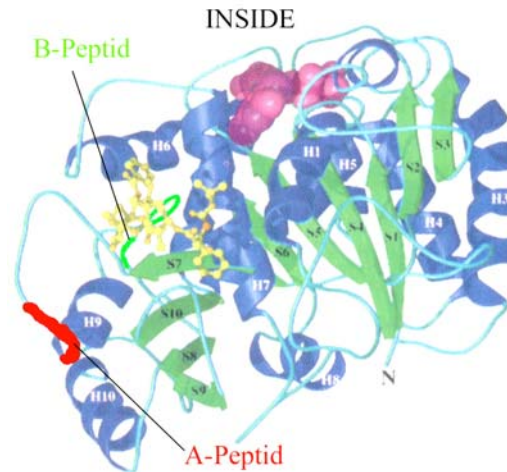


Abb. 1-11: Lage des A-Peptid und B-Peptid in γ -Tubulin. Ansicht von innen aus dem γ -Tubulin heraus (Strukturberechnungen des γ -Tubulins aufgrund der Struktur von β -Tubulin). (Quelle: verändert nach INCLAN und NOGALES 2001)

	γ-A-Peptid		γ-B-Peptid
	*	300	*
Nicotiana_tab	: YTPLTVERQA-----NVIRKTTVLDMRRLQLQTKNIMV	320	SYARTKEASQAKYISILNII
Arabid_thalia	:N.....
Hordeum_vulg	:V-----	
Oryza_sativa	:V-----		...N.....
Zea_mays	:V-----	
Physcom_pat	:A.....	
Anemia_phyll	:A.....	
Chlamydo_reinh	:A.NA.G-QVTSN.....		P.....HT...DIAN.....
Homo_sap1	:TD-----QSVAS.....		P.....GRDRQ--.NHC..A.....
Homo_sap2	:TD-----QSVAS.....		P.....GRDRQ--.NHC..A.....
Canis_famil	:TD-----QSVAS.....		P.....GRDRQ--.NHC..A.....
Dros_melano1	:SDSDIHTQQLVN.....		P.....GPDKS--NHH.....
Dros_melano2	:MSDC..KTS-----		P.....ALTDKQ--.RQC.....
Sacch_cerev	: ...F.SDYIHD--DIAH.GH.SY...LD..DPS.S...		AMN-----NPT.FN.Y.T.
Caeno_eleg	: I...VDPN.N-----FT.....A..T.F..KPTS...		AS.V.--PNDCM..AYMF.
Eugl_gracilis	:DPNIQ---MT.....		SP.....AST-----RGC.....
Asperg_nidul	: ...F.GDNIDQ---AKT.....		P..R...INP---SKSSC.....
Ustilago_violac	: ...F.SD.IEQ---AKA.....		P..R...MPTTP--SRH..C.....
Schizosacch_jap	: ...F.S.QVED---ART.....		P..R...VNP----GK..SC.....
Schizosacch_pom	: ...F.N.QVEE---AKA.....		LP..Q...VNP----SKKSC.....
Cochlio_hetero	: ..-F.G.NVEQ---AKT.....		P..R...NPT---SHKSC.....
Physarum_polyc	:D..R-----QN.H.....		PQ.....SM-----NG.....
Guillardia_thet	: INIDI..LSKLR-----K..P...ENKTNQ.NEIS.N.D		LKSG-----N...S.E.S

Abb. 1-12: Übersicht über das γ -A-Peptid und γ -B-Peptid bei verschiedenen Organismen.

Vergleichsuntersuchungen der γ -A- und γ -B-Peptidbereiche von bekannten γ -Tubulin-Sequenzen zeigten eine starke Konservierung bei höheren Pflanzen, wogegen sehr starke Unterschiede zu den Tieren und Pilzen festzustellen sind (BURNS, 1995). Im Verlaufe der Evolution von Pflanzen kommt es zu einem Verlust der Centrosomen während des Zellteilungszyklus, sowie zu dem Verlust der Zellmobilität einhergehend

mit dem Verlust der Begeißelung (CANADAY, 2000). Es wird vermutet, dass dieser Verlust in sehr enger Beziehung mit dem γ -A- und γ -B-Peptid zusammenhängen könnte (SCHRÖDER *et al.*, 2002). Diese beiden Sequenzbereiche könnten dem γ -Tubulin ermöglichen, unabhängig von typischen Centrosomen seine speziellen Funktionen auszuüben.

Eine weiterer auffälliger Sequenzbereich des γ -Tubulins wurde von JOSHI *et al.* (1992) definiert. Dieser befindet sich im N-terminalen Bereich des γ -Tubulins und zeigte innerhalb der bis dahin untersuchten Organismen einigermaßen eine Homologie bei Tieren. Daher wurde dieser Bereich für die Entwicklung eines Antikörpers gegen γ -Tubulin verwendet und zeigte bei tierischen Organismen ein deutliches Signal.

1.2 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Mikrotubuli spielen eine essentielle Rolle in den verschiedenen Entwicklungsstadien von Pflanzenzellen. Dazu zählen die Mitose, die Cytokinese und die Zellexpansion. Das γ -Tubulin wird inzwischen als essentieller Mikrotubuli-Nukleator betrachtet (OAKLEY, 2000). Der Mechanismus und Ort der pflanzlichen Mikrotubuli-Nukleation sind jedoch bis heute ungeklärt. Sequenzvergleiche mit pflanzlichem Spc 98 und γ -Tubulin mit den jeweiligen Homologa bei tierischen Zellen, sowie der Identifikation von Komplexen bei Pflanzen, die dem Proteinprofil von tierischen γ -TuRCs ähneln, lassen die Vermutung zu, dass die Nukleation von pflanzlichen Mikrotubuli ähnlich wie in tierischen MTOCs erfolgen könnte (SCHMITT, 2002). Nachweise konnten dafür aber noch nicht erbracht werden. Als Orte der Mikrotubuli-Nukleation werden die Nucleus-Oberfläche und die kortikalen Bereiche des Cytoplasmas diskutiert (VAUGHN und HARPER, 1998; CANADAY *et al.*, 2000; SAIBO *et al.*, 2004).

Neben der Nukleation der Mikrotubuli wird auch diskutiert, inwieweit es zu einer Kollokalisierung von γ -Tubulin, über die Nukleation hinaus mit den Mikrotubuli kommt und welche Funktionen diese erfüllen könnte. Verschiedene Studien kamen zu unterschiedlichen Ergebnissen, die sich in der Abundanz des detektierten γ -Tubulin und dessen Verteilung entlang der Mikrotubuli unterscheiden. Dort gibt es Beschreibungen von gleichförmiger Verteilung über die Mikrotubuli, bis die Minus-Enden meidend (z. B. LIU *et al.*, 1993; PANTERIS *et al.*, 2000; MURATA *et al.*, 2005). Anhand der unterschiedlichen Ergebnisse werden auch verschiedene Funktionen und Formen des γ -

Tubulins diskutiert, wie z. B. der Einfluß auf die Eigenschaften der Mikrotubuli, Mikrotubuli-abhängige Nukleation von Mikrotubuli und inaktive Speicher- und Transportformen von γ -Tubulin (ERHARDT et al., 2002; MURATA et al., 2005).

Eine Erklärung für die abweichenden Ergebnisse ist vielleicht in der Verwendung von verschiedenen Antikörpern zu suchen, die teilweise gegen tierisches γ -Tubulin gerichtet waren, und für die Detektion von pflanzlichem γ -Tubulin verwendet wurden. Diese geringen Abweichungen in der zu erkennenden Peptidsequenz können schon bewirken, dass die Spezifität der Antikörper nicht mehr gewährleistet ist.

Um Hinweise auf mögliche Funktionen von γ -Tubulin in sich teilenden, expandierenden und expandierten Pflanzenzellen zu erhalten, ist es notwendig die Expression und die Lokalisation des Proteins im Verlauf der Zelldifferenzierung zu untersuchen.

Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit das Vorkommen von γ -Tubulin und anderer Cytoskelett-relevanten Proteine im Verlauf der Zelldifferenzierung einer Zellkultur, der BY-2 Zellkultur, und die Zelldifferenzierung an Blättern von *Nicotiana tabacum* untersucht.

Auf molekularbiologischer Ebene wurden Versuche durchgeführt, die durch Nachweis der mRNA Aufschluß über die Transkription von γ -Tubulin geben sollten. Um dieses Ziel zu erreichen, wurde aus den verschiedenen Zellentwicklungsstadien (von teilungsaktiven Stadien bis zu Stadien über die Zellteilung hinaus) die mRNA extrahiert, in cDNA umgeschrieben und mittels PCR amplifiziert. Der semiquantitative Vergleich der Expression in den einzelnen Stadien sollte Aufschluß darüber geben, in welchem Umfang γ -Tubulin in elongierten Zellen (BY-2 Zellkultur) bzw. in expandierten Blättern (SR1 Pflanze) noch exprimiert wird.

Auf der proteinbiochemischen Ebene wurde ein semiquantitativer Vergleich angestrebt. Hierzu sollte der Gesamtproteingehalt der unterschiedlichen Zellstadien extrahiert und der Nachweis der zu untersuchenden Proteine mittels Western-Blot und immunochemischen Methoden durchgeführt werden. Um γ -Tubulin nachzuweisen, musste ein Antikörper speziell auf pflanzliches γ -Tubulin entwickelt werden. Dafür kamen im Bezug auf die Pflanzenspezifität zwei verschiedene Peptidbereiche in Betracht. Zum einen der γ -B-Peptidbereich der schon während der Diplomarbeit von SCHLAG (2002) verwendet wurde, sowie der JOSHI-Bereich (JOSHI et al., 1992), der sich im Vergleich mit der tierischen Sequenz um drei Aminosäuren zu den Pflanzen

unterscheidet. Ein Antikörper gegen die gleiche pflanzliche Sequenz wurde auch schon von DIBBAYAWAN et al. (2001) verwendet.

Durch die Untersuchung des eventuellen Vorhandenseins der mRNA für γ -Tubulin und dem Nachweis des Proteins lassen sich die möglichen Aufgaben und Funktionen von γ -Tubulin, über die Zellteilung hinaus in den verschiedenen Zellstadien erforschen.

Als Referenz zur Absicherung der Ergebnisse wurden α -Tubulin, ein ständiger Bestandteil der Mikrotubuli, und Actin verwendet. Durch die Untersuchung dieser Proteine sollte die These bestätigt werden, dass Actin über den gesamten Zellzyklus konstitutiv expremiert wird (HELLMANN, 1995). Auch sollte untersucht werden, ob der Gehalt an α -Tubulin mit dem Gehalt von γ -Tubulin korreliert.

2 Material und Methode

2.1 Sterilisation der benötigten Labormaterialien

Zur Vermeidung von Kontaminationen (z.B. durch RNAsen) wurden alle für die Versuche benötigten Materialien sterilisiert. Die Materialien aus hitzeunempfindlichem Kunststoff (z.B. Teflon und Polycarbonat) wurden für 15min bei 2 bar und 120°C autoklaviert (Varioklav Dampfsterilisationen, Neuried; Sectroid BST 300, Schweiz). Die hitzeunempfindlichen Glaspipetten und Erlenmeyerkolben wurden durch eine Inkubation bei 180°C für 3 Stunden in einem Wärmeschrank (Mettler Elektronik Typ U50) sterilisiert.

Puffer und Medien wurden, wenn möglich, autoklaviert. Ausgenommen waren Puffer und Medien, bei denen Komponenten durch das Autoklavieren ausfallen konnten. In diesen Fällen wurde eine Sterilfiltration durchgeführt (Millipore-Filtrationseinheit, Filtertyp 0,22 µm GV).

Zur Verhinderung einer Kontamination während der Versuche fand der größte Teil (z.B. Überimpfen der Kulturen) unter einer Laminar-Air-Flow-Bank (BDK Luft- und Raumtechnik GmbH) statt.

2.2 Versuchsmaterial

2.2.1 Pflanzenmaterial

2.2.1.1 Zellkultur aus *Nicotiana tabacum* (BY-2)

Für die Durchführung der Versuche wurden die Zellen der BY-2 Zellkultur (NAGATA *et al.*, 1992) aus *Nicotiana tabacum* verwendet, die im `Central Research Institute of the Japan Tobacco and Salt Public Corporation` erstmals aus einem Kallus gewonnen wurde (KATO *et al.*, 1972).

Diese Zellsuspensionskultur eignet sich sehr gut für molekulare und zelluläre Forschung bei Pflanzenzellen, da sie sich durch eine hohe Vermehrungsrate und Homogenität auszeichnet. Dabei handelt es sich um eine sehr stabile Kultur. Versuche mit Arabidopsis-Zellkulturen haben gezeigt, dass diese Kulturen einen kurzen Zellzyklus besitzen und nicht zu synchronisieren sind (NAGATA *et al.*, 1992; N.V. GEELLEN *et al.*, 2001). Im Vergleich zu intakten Pflanzen, wo die Meristeme aufgrund

verschiedener ausgebildeter Zellorgane in sich sehr heterogen sind, besteht die BY-2 Suspensionskultur aus homogenen Zellen, und ist nur geringfügig heterogen innerhalb des Zellzyklus. Durch Hormonzugabe ist auf Entwicklungsprozesse leichter Einfluss zu nehmen als bei intakten Pflanzenzellen.

Durch Zugabe von Auxin in das Kulturmedium können die Zellen in einem teilungsaktiven Zustand gehalten werden. Beim Reduzieren der Auxinmenge oder Wegnahme von Auxin aus dem Kulturmedium lässt die Zellteilung nach und die Zellen beginnen zu elongieren (SHIBAOKA, 1993). Bei einer Zellkultur können Veränderungen im Cytoskelett, bei sich differenzierenden Zellen, beobachtet werden, ohne Rücksicht auf die Differenzierung und Ausbildung von Pflanzenorganen nehmen zu müssen.

Ein weiterer Vorteil der Zellkultur sind im Vergleich zu Zellen aus intakten Gewebeverbänden die dünnwandigeren Zellwände, die sie leichter für Farbstoffe oder Antikörper durchlässig machen. Bei der Zellkultur handelt es sich um mehr oder minder vereinzelte Zellen, sie liegen nicht in einem kompakten Zellverband vor. Dadurch ist eine mikroskopische Betrachtung leichter durchzuführen. Die Zellen der BY-2 Kultur eignen sich hervorragend für Studien des Cytoskeletts, da an ihnen die typischen Strukturen wie kortikale Mikrotubuli, das PPB, die Mitosespindel und der Phragmoplast beobachtet werden können (NAGATA *et al.*, 1992; N.V. GEELLEN *et al.*, 2001).

Die Zellkultur wurde unserer Arbeitsgruppe von der Arbeitsgruppe Prof. D. Menzel der Universität Bonn überlassen. Kultiviert wurde sie als Zellsuspensionskultur und als Kalluskultur.

Die Zellsuspensionskultur stellte das eigentliche Versuchsmaterial dar. Neben der Zellsuspensionskultur diente eine Kalluskultur diente als Reserve, sollte es z.B. zum Kollabieren der Zellsuspensionskultur kommen. Diese zeichnete sich durch langsames Wachstum auf festem Medium aus und musste somit nicht jede Woche überimpft werden.

Die Zellsuspensionskultur wurde im Klimaraum unter standardisierten Bedingungen bei $23^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ im Dunkeln auf einem Rotationsschüttler (Infors AG, Bottmingen, Schweiz) bei ca. 100rpm kultiviert. Die Anzucht der Kultur fand in 100ml Erlenmeyerkolben mit jeweils 25ml Nährmedium statt. Der Erhaltungskultur wurde zusätzlich 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure (2,4-D) zugegeben, um Zellteilungen zu erreichen.

Um Zellen ohne Zellteilung aber mit Zellstreckung zu erhalten, wurden auch Kulturansätze ohne Auxinzugabe herangezogen. Eine Erhaltungskultur wurde als Suspensionskultur wöchentlich mit einem Titer von 0,5ml in frisches Nährmedium überimpft. Für die Kultur ohne Hormon wurde jeweils 1ml von einer drei Tage alten Erhaltungskultur in frisches, hormonfreies Medium überimpft. Das Überimpfen der Kultur fand grundsätzlich unter einer Sterilbank statt (BDK Luft- und Reinraumtechnik GmbH).

Zur Verwendung kam ein LS-Medium (LINSMAIER und SKOOG, 1965), welches nach NAGATA *et al.* (1992) modifiziert wurde.

Ansetzen des LS-Mediums für BY-2 Zellkultur (1000ml):

Lösung I (LS I) (10x):	KNO ₃	19	g/l
	NH ₄ NO ₃	16,5	g/l
	CaCl ₂ x 2H ₂ O	4,4	g/l
	MgSO ₄ x 7H ₂ O	3,7	g/l
	KH ₂ PO ₄	3,7	g/l

Zugabe: 100ml/l LS Medium

Lösung II (MS II) (100x):	MnSO ₄ x H ₂ O	1690	mg/l
	ZnSO ₄ x 7H ₂ O	860	mg/l
	H ₃ BO ₃	620	mg/l
	KI	83	mg/l
	Na ₂ MoO ₄ x 2H ₂ O	25	mg/l
	CoCl ₂ x 6H ₂ O	2,5	mg/l
	CuSO ₄ x 5H ₂ O	2,5	mg/l

Zugabe: 10ml/l LS-Medium

Lösung III (LS III)(1000x):	Thiamin HCl	100	mg/100ml
-----------------------------	-------------	-----	----------

Zugabe: 1ml/l LS-Medium

Lösung IV (MS IV)(100x):	FeSO ₄ x 7H ₂ O	2,78	g/l (separat lösen)
	Na ₂ EDTA x 2H ₂ O	3,73	g/l

Zugabe: 10ml/l LS-Medium

	2,4-D	0,2	mg/l
--	-------	-----	------

Zugabe: 500µl/l LS-Medium (nur bei Erhaltungskultur)

myo-Inosit	100	mg/l
Saccharose	30	g/l

Das LS-Medium wurde aus den Komponenten zusammengestellt und anschließend der pH = 6,0 eingestellt. Danach wurde das fertige LS-Medium autoklaviert.

Für die „Ernte“ der zu untersuchenden Stadien wurde jeweils ein Kölbchen verwendet. Folgende Stadien wurden „geerntet“ (s. Kap. 3.1):

3 Tage alt	(Erhaltungskultur mit Auxin; 0)
3 Tage alt	(ohne Auxin; 3)
6 Tage alt	(ohne Auxin; 6)
9 Tage alt	(ohne Auxin; 9)
12 Tage alt	(ohne Auxin; 12)

Zur Gewinnung der Frischmasse wurde die Zellsuspension auf ein Nylonsieb (Züricher Beuteltuchfabrik) mit einer Maschendichte von 100µm gegeben. Für die Proteinbiochemie wurden dann 200mg Frischmasse der zu untersuchenden Zellstadien und für die Nukleinsäureextraktion 200mg Frischmasse der Zellen bei auxinhaltigen und 400mg Frischmasse der Zellen bei auxinfreien Stadien, in Aluminiumbriefchen abgewogen, sofort in flüssigem Stickstoff bei -196°C schockgefroren und bei -20°C gelagert.

2.2.1.2 Tabakpflanze *Nicotiana tabacum* (SR1)

Neben der Zellkultur kam auch Blattmaterial von *Nicotiana tabacum* cv. Petite Havanna SR1 von aus Samen (eigene Ernte) angezogenen Pflanzen.

Die Samen wurden für 3min in Natriumhypochlorid-Lösung (Klorix, Verdünnung 1:3) oberflächensterilisiert und viermal mit sddH₂O gewaschen. Danach wurden die Samen zur Keimung auf steriles ½ x konzentriertes MS-Aussaatmedium nach MURASHI und SKOOG (1962) in Polystyrol-Petrisschalen (Greiner Labortechnik, Nürtingen) ausgebracht (15h Licht / 9h Dunkel, Leuchtstoffröhren: Osram L36W/25 Universal White, Bestrahlungsstärke auf Tischhöhe: 12µmol / m² * s, Temperatur: 23°C ± 1°C). Nach drei Wochen (4-Blatt-Stadium) wurden je drei Keimpflanzen auf steriles Aussaatmedium in Glasgefäße (Einweckgläser) umgesetzt und für weitere drei Wochen angezogen.

Ansetzen des 0,5x konzentrierten MS-Aussaatmediums (1000ml):

Lösung I (MS I) (10x):	KNO ₃	19	g/l
	NH ₄ NO ₃	16,5	g/l
	CaCl ₂ x 2H ₂ O	4,4	g/l
	MgSO ₄ x 7H ₂ O	3,7	g/l
	KH ₂ PO ₄	1,7	g/l
Zugabe: 50ml/l ½ MS-Medium			
Lösung II (MS II) (100x):	MnSO ₄ x H ₂ O	1690	mg/l
	ZnSO ₄ x 7H ₂ O	860	mg/l
	H ₃ BO ₃	620	mg/l
	KI	83	mg/l
	Na ₂ MoO ₄ x 2H ₂ O	25	mg/l
	CoCl ₂ x 6H ₂ O	2,5	mg/l
	CuSO ₄ x 5H ₂ O	2,5	mg/l
Zugabe: 5ml/l ½ MS-Medium			
Lösung IV (MS IV)(100x):	FeSO ₄ x 7H ₂ O 2,78	2,78	g/l (separat lösen)
	Na ₂ EDTA x 2H ₂ O	3,73	g/l
Zugabe: 10ml/l ½ MS-Medium			
	Saccharose	5	g/l
	Gelrite	2,5	g/l

Das 0,5x konzentrierte MS-Aussaatmedium wurde aus den oben genannten Komponenten zusammengestellt und anschließend der pH = 6,0 eingestellt. Danach wurde das fertige Aussaatmedium autoklaviert.

Nach dreiwöchiger Aufzucht in den Einweckgläsern befanden sich die Pflanzen in einem 6-7 Blatt-Stadium und wurden unsteril in 10 x 10cm Kunststofföpfchen mit Tonsubstrat (Lecaton[®], Leca Deutschland GmbH, Rinneberg) umgesetzt (15h Licht / 9h Dunkel, Leuchtstoffröhren: OsramL36W/25 Weiss-Universal-White Bestrahlungsstärke auf Substrathöhe: 44µmol / m² * s, Temperatur: 24°C ± 1°C), und in Kunststoffwannen mit Hoagland-Lösung gestellt. Dazu wurden die Pflanzen zunächst den Einweckgläsern entnommen und das Aussaatmedium von den Wurzeln abgestreift. Nach dem Durchzählen der Blätter (unter Auslassen der Keimblätter) wurde das sechste Blatt mit einem Faden markiert. Anhand der Markierung konnten dann sukzessiv die nachfolgenden Blätter der Blattfolge zugeordnet werden.

Frische Nährstofflösung wurde einmal wöchentlich zugegeben.

Nährlösung nach Hoagland:

Stammlösung A	Ca (NO) ₂ x 4H ₂ O	95	g/l
Stammlösung B	(NH ₄)H ₂ PO ₄	12	g/l
Stammlösung C	KNO ₃	61	g/l
	MgSO ₄ x 7H ₂ O	49	g/l
Stammlösung D	H ₃ BO ₃	6	mg/l
	MnCl ₂ x 4H ₂ O	40	mg/l
	ZnSO ₄ x 7H ₂ O	9	mg/l
	CuSO ₄ x 5H ₂ O	5	mg/l
	H ₂ MoO	1,5	mg/l
	Co (NO ₃) ₂	2,5	mg/l
Stammlösung E1	FeSO ₄ x 7H ₂ O	2,49	g/l
	Na ₂ EDTA	3,32	g/l
Stammlösung E2	NaOH	0,5	g/l

2.2.1.3 Wintergerste *Hordeum vulgare*

Zur Verwendung kam handelsübliches mit Arbosan® gebeiztes Saatgut der Wintergerste *Hordeum vulgare* (L.) cv. Igri (Ackermann & Co., Irlbach). Die Getreidekörner wurden auf Verniculit in 10 x 10cm Kunststofföpfchen ausgesät (30-40 Getreidekörner pro Topf), mit Verniculit in einer Dicke von 10-15mm bedeckt und mit Leitungswasser gefüllten Kunststoffwannen gestellt. Die Keimung und die Anzucht erfolgten im Klimaraum unter standardisierten Bedingungen bei 23°C ± 1°C bei einer Bestrahlungsdauer von 15h mit einer Bestrahlungstärke von ca. 18Wm⁻² (Leuchtstoffröhren Osram L36W/25 Weiss-Universal-White).

Pflanzenmaterial, mit dem die Versuche durchgeführt wurden, wurde nach etwa 14 Tagen geerntet. Dabei war die Länge der zweiten Blätter entscheidend, die zwischen 10-12cm liegen sollte. Nach Entfernen des Getreidekorns wurde das freipräparierte zweite Blatt in 2cm lange Stücke unterteilt, auf angefeuchtetem Filterpapier aufbewahrt. Für die Proteinbiochemie wurden dann 200mg Frischmasse der verschiedenen Segmente in

Alubriefchen abgewogen und anschließend sofort in flüssigem Stickstoff bei -196°C schockgefroren und bei -20°C gelagert.

2.2.2 Bakterienstämme und Medien

Für alle Transformationen wurde im Zusammenhang mit dem pGEM[®]-T Vektor-System (Promega, Mannheim) und dem GeneJET[™] PCR Cloning Kit (Fermentas, St. Leon-Rot) der Wirtstamm *E. coli* XL 1-Blue MRF' (Stratagene, Amsterdam, Niederlande) und der *E. coli* DH5 α (Invitrogen, Karlsruhe) verwendet. Für die Überexpression von γ -Tubulin wurde der *E. coli* BL21 (DE3) (Invitrogen, Karlsruhe) verwendet.

XL 1-Blue MRF' :	Genotyp:	$\Delta(\text{mcrA})183 \Delta(\text{mcrCB-hsdSMR-mrr})173 \text{ endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac}[\text{F}' \text{ proAB lacI}^q\text{Z}\Delta\text{M15 Tn 10 (Tet}^r\text{)}]$
DH5α:	Genotyp:	$\text{F}^- \phi 80\text{dlacZ}\Delta\text{M15 } \Delta(\text{lacZYA-argF}) \text{ U169 recA1 endA1 hsdR17}(\text{r}_k^-, \text{m}_k^+) \text{ phoA supE44 } \lambda^- \text{ thi-1 gyra96 relA1}$
BL21 (DE3):	Genotyp:	$\text{F}^- \text{ ompT hsdS}_B(\text{r}_B^-, \text{m}_B^-) \text{ gal dcm}$

2.2.2.1 Anzucht der Bakterien

Die Anzucht der Bakterien erfolgte sowohl unter Verwendung von Plattenkulturen, Flüssigkulturen und Dauerkulturen.

2.2.2.1.1 Plattenkultur

Die Plattenkultur ermöglichte, vereinzelte Bakterienkolonien zu erhalten. Dafür wurde von einer Dauerkultur eine kleine Menge Bakterien entnommen. Für die Anzucht und Wachstum auf LB-Platten wurden die Bakterien mit einer ausgeglühten Impföse oder mit Hilfe eines Drigalski-Spatel ausplattiert. Die Kulturen wurden über Nacht bei 37°C in einem Brutschrank (B290 Heraeus, Hanau) inkubiert. Bewachsene Kulturplatten konnten dann durch Nesco-Film (Nippon Kaisha Ltd., Osaka, Japan), vor Austrocknung geschützt, im Kühlschrank bei 4°C für eine Woche aufbewahrt werden.

2.2.2.1.2 Flüssigkultur

Für die Bakterienanzucht in einer Flüssigkultur wurde eine vereinzelt Kolonie mit einer ausgeglühten Impföse von einer LB-Platte entnommen und diese in 10-100ml (abhängig vom Versuchsansatz) Flüssigmedium überführt. Die Kultur wurde dann in einem Schüttelwasserbad (GFL 1086, GFLmbH, Burgwedel) bei 37°C bis zum Erreichen einer optischen Dichte (OD_{600} ca. 0,5), z.B. zur Herstellung kompetenter Bakterien, oder über Nacht inkubiert.

2.2.2.1.3 Dauerkultur

Eine Dauerkultur konnte durch Zugabe von 40% (v/v) autoklaviertem Glycerin zu einer über-Nacht Flüssigkultur angelegt werden. Diese Kulturen konnten dann aliquotiert, mit flüssigem Stickstoff eingefroren und über einen längeren Zeitraum bei -75°C eingelagert werden.

2.2.2.2 Herstellung der Bakterien-Nährmedien

Alle hergestellten Medien wurden autoklaviert (Varioklav Dampfsterilisationen, Neuried; Sectroid BST 300, Schweiz), die optionale Zugabe von sterilfiltrierten Antibiotika erfolgte erst nach einer Abkühlung der Medien auf 50°C.

LB-Medium:	1 %	Bacto-Trypton
(Luria-Bertani)	0,5 %	Bacto-Hefeextrakt
	1 %	NaCl
	pH = 7	
LB-Agar Medium:	LB-Flüssigmedium mit 1,5 % Bacto-Agar	
SOB-Medium:	2 %	Bacto-Trypton
	0,5 %	Bacto-Hefeextrakt
	0,05 %	NaCl
	2,5mM	KCl
	10mM	MgCl ₂
	pH = 7	
SOC-Medium:	SOB-Medium mit 20 mM Glucose	
	pH = 7	

TFB-Medium:	10mM MES (pH 6)
	45mM $\text{MnCl}_2 \times 4 \text{H}_2\text{O}$
	10mM $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$
	100mM KCl
	3 mM Hexamin – CoCl_3
Tfb I-Medium:	30mM K-Acetat
	100mM KCl
	10mM CaCl_2
	50mM MnCl_2
	15% Glycerin (v/v)
Tfb II-Medium:	75mM CaCl_2
	10mM Na-MOPS
	10mM KCl
	15% Glycerin (v/v)
	pH = 7
TYM-Broth-Medium:	2% Bacto-Trypton
	0,5% Bacto-Hefextrakt
	100mM NaCl
	10mM MgCl_2
	pH = 7,5
FSB-Medium:	10mM K – Acetat (statt MES)
	6 % Glycerin
	übrige Komponenten wie TFB – Medium

2.2.2.3 Vernichtung von Bakterien

Alle Lösungen und Materialien, die mit Bakterien oder genetisch veränderten Organismen (GVOs) in Berührung kamen, wurden im Anschluss im Autoklaven (bei 134°C und 2bar für 15min) abgetötet.

Danach konnten die Einwegmaterialien und verwendete Lösungen verworfen werden. Wieder verwendbare Materialien wurden gespült und konnten nach erneutem Autoklavieren wieder verwendet werden.

2.3 Charakterisierung des Pflanzenmaterials

2.3.1 Zellkultur (BY-2) aus *Nicotiana tabacum*

2.3.1.1 Mikroskopie

Um zu gewährleisten, dass die Zellen der BY-2 Kultur der einzelnen Stadien vor dem Einfrieren intakt waren, wurde eine mikroskopische Kontrolle durchgeführt.

Dazu wurde ein Mikroskop Zeiss Axioplan mit folgender Ausstattung verwendet:

Objektive: 10-fach/n.A. 0,30 Planneofluar
20-fach/n.A. 0,50 Planneofluar
40-fach/n.A. 0,75 Planneofluar
63-fach/n.A. 1,25 Planneofluar

Differentialinterferenz-Kontrast (DIC) und Hellfeld:

Alle Objektive mit im Revolver integrierten entsprechenden DIC-Prismen, Schieber mit DIC-Analysator für den Tubus, DIC-Kondensator (Wollaston-Prismen, Polarisator) 0,3-0,4 und 0,5-1,3 Hellfeldkondensator

Für die Bildaufnahmen am Zeiss Axioplan-Mikroskop (s.o.) wurde ein CCD-Digitalkamerasystem (CF 8/1 DX von Kappa, Göttingen) eingesetzt. Dabei handelte es sich um ein schwarz/weiss-Kamerasystem bei dem über ein PC-Interface alle Parameter am PC eingestellt und die Bilder auf der Festplatte gespeichert werden konnten.

Die digitalisierten Bilder wurden anschließend mit dem Bildbearbeitungsprogramm „Adobe Photoshop 6.0“ (Adobe Systems Incorporated, 2000) bearbeitet.

2.3.2. Tabakpflanze *Nicotiana tabacum* (SR1)

Als weiteres Gewebe für die Untersuchungen wurden neben der Zellkultur auch Blätter der Tabakpflanze *Nicotiana tabacum* verwendet. Es wurden Untersuchungen an Geweben unterschiedlicher Entwicklungsstadien durchgeführt.

Bei dikotylen Pflanzen sind in den jungen Blättern meristematische Zonen über die gesamte Blattbreite verteilt. Mit zunehmendem Alter der Blätter nimmt die mitotische Aktivität der Zellen von der Blattspitze an beginnende zur Basis hin ab, und es setzt das Streckungswachstum der Zellen ein, das zur endgültigen Blattgröße führt und die Blattentwicklung abschließt (STEEVES und SUSSEX, 1989). Somit entsteht ein

schwach basipetaler Gradient. Da dikotyle Pflanzen anders als Monokotyle keine distinkten Wachstumszonen in den hier hauptsächlich untersuchten Stadien der Blattexpansion aufweisen, wurden Laubblätter verschieden alter Pflanzen verwendet, um Gewebe unterschiedlicher Entwicklungsstadien zu erhalten.

Da selbst bei standardisierten Bedingungen das Wachstum der Pflanzen uneinheitlich ausfallen kann, wurde das Wachstumsverhalten der Pflanzen beobachtet, um verschiedene Stadien der Pflanze und deren Blätter zu charakterisieren (vgl. HOLZHÄUSER, 1992 und HELLMANN, 1995). Dies war angemessen, aufgrund eines inzwischen erfolgten Umbaus der Klimmakammer. Auf der Beobachtung des Wachstumsverhaltens basierend wurden die zu untersuchenden Entwicklungsstadien festgesetzt.

2.3.2.1 Beobachtung des Wachstumsverhaltens

Das Wachstumsverhalten wurde in Anlehnung an vorausgegangene Untersuchungen (HOLZHÄUSER, 1992; HELLMANN, 1995) exemplarisch am elften Blatt von 4 Pflanzen beobachtet. Dafür wurde die Länge und die Breite des Blattes gemessen, sowie die Flächenbestimmung über das Zeichnen des Umrisses der Blattspreite durchgeführt. Die gesammelten Umrisse wurden anschließend in ein halbautomatisches Bildauswertegerät (MOP Videoplan, Firma Kontron, Bildanalyse GmbH, München) eingegeben.

2.3.3. Wintergerste *Hordeum vulgare*

Ein weiteres Ausgangsgewebe war die Wintergerste *Hordeum vulgare*. Es wurden wie bei der SR1-Pflanze von *Nicotiana tabacum* Untersuchungen an Geweben unterschiedlicher Entwicklungsstadien durchgeführt.

Blätter von monokotylen Pflanzen zeigen einen basipetalen Entwicklungsgradienten. Die Zellen eines Blattes gehen aus der meristemalen Zone an der Blattbasis aus. Somit befinden sich an der Blattbasis ungestreckte teilungsaktive Zellen, an der Blattspitze befinden sich ausgewachsene entwickelte Zellen. Zwischen Meristem und Blattspitze befinden sich Zellen in unterschiedlichen Entwicklungsstadien zwischen jung und alt. Die einzelnen Blattbereiche wurden in vorangegangenen Arbeiten charakterisiert (HELLMANN 1995; SCHRÖDER 2000).

2.4 Molekularbiologischer Teil

2.4.1 Nukleinsäurepräparation

2.4.1.1 Präzipitation von Nukleinsäuren

Durch Zugabe von monovalenten Kationen und Alkohol lassen sich Nukleinsäuren aus wässrigen Lösungen fällen. Bei den hier verwendeten Extraktionsmethoden geschah dies mit der Zugabe von 0,7 Vol Isopropanol oder mit 2,5 Vol Ethanol. Hatte die Lösung nicht bereits eine Salzkonzentration von mindestens 300mM, wurde 0,1 Vol 3M Na-Acetat zugegeben. Anschließend wurden die Proben gemischt und entweder 15min bei RT mit der Isopropanolfällung oder 30min bei -20°C mit der ethanolischen Fällung gefällt. Sofern es das Volumen des Gefäßes zuließ, wurde ethanolisch gefällt, da unter Verwendung von Ethanol eine Kopräzipitation von Salzen und Zuckern weniger zu befürchten ist (SAMBROOK *et al.* 1989). Danach wurde die Probe bei 4°C mit 12000x g für 30min (Beckman J2-21/Sigma 202-MK) zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand vorsichtig abgenommen und das Pellet zweimal mit 75%igem Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert. Nach ca. 5-minütiger Lufttrocknung wurde das Pellet in ddH_2O (RNA-Extraktion) gelöst. Die Lagerung der RNA-Proben erfolgte bei -20°C.

2.4.1.2 Probenvorbereitung für Nukleinsäureextraktion

Das tiefgefrorene Pflanzenmaterial der einzelnen Stadien wurde in einen vorgekühlten, mit flüssigem Stickstoff gefüllten Mörser überführt und aufgeschlossen. Dazu wurde das tiefgefrorene Pflanzenmaterial mit einem Pistill pulverisiert. Es war darauf zu achten, dass die Probe bis zur Überführung in den jeweiligen Extraktionspuffer nicht auftaute, um den Abbau der Nukleinsäure durch Nukleasen zu verhindern, da diese bei sehr niedrigen Temperaturen nicht einwirken kann.

2.4.1.3 Extraktion von gesamt-RNA (gRNA)

Da es bei den Extraktionen von gRNA sehr leicht zu Kontaminationen mit Ribonukleasen kommen kann, wurden ausschließlich hitzesterilisierte bzw. autoklavierte Gerätschaften und Lösungen verwendet. Desweiteren wurden

sicherheitshalber bei sämtlichen Schritten Latexhandschuhe getragen, um eine Kontamination mit an der Hand haftenden Ribonukleasen zu vermeiden.

2.4.1.3.1 Isolation von gRNA mit PeqGold RNAPure™

Bei peqGOLD RNAPure™ handelt es sich um ein Reagenz, das Phenol und Guanidin-isothiocyanat in einphasiger Lösung für eine RNA Extraktion enthält. Nach der Zugabe von Chloroform und durch anschließende Zentrifugation wird das Homogenisat in drei Phasen aufgetrennt. Die RNA befindet sich in der wässrigen Oberphase (siehe Standardprotokoll PeqGold RNAPure™, PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen) und kann anschließend mit Ethanol oder Isopropanol gefällt werden

2.4.2 Nukleinsäure-Nachweismethoden

2.4.2.1 Photometrische Bestimmung

Die in Nukleinsäuren enthaltenen Basen absorbieren ultraviolettes Licht. Sie besitzen ein Absorptionsmaximum bei 260nm. Bei dieser Wellenlänge wird die Probe zur Quantifizierung gemessen. Die optische Dichte (OD_{260}) von 1 entspricht einer Konzentration von 50µg/ml bei doppelsträngiger DNA und 40µg/ml bei einzelsträngiger DNA oder RNA (SAMBROOK *et al.*, 1989).

Für die Messung wurden 1:100 Verdünnungen der nukleinsäurehaltigen Lösungen hergestellt und in eine Quarzküvette überführt. Als Referenz für die Photometrie diente $sddH_2O$. Die Messung erfolgte in einem Spektralphotometer (Typ U-1100, Hitachi). Zur Überprüfung der Reinheit einer Präparation wurde auch die OD_{280} gemessen und aus dem Quotient (Q) OD_{260}/OD_{280} die Reinheit einer Nukleinsäureprobe bestimmt.

Für reine DNA erhält man einen $Q_{260/280}$ von 1,8-1,9 und für reine RNA einen $Q_{260/280}$ von >2,0 (SAMBROOK *et al.*, 1989).

Niedrigere Werte geben einen Hinweis über Verunreinigung mit Phenolen und/oder Proteinen.

2.4.2.2 Ethidiumbromidfärbung

Bei Ethidiumbromid (3,8-Diamino-5-Ethyl-6-phenylphenanthridiniumbromid) handelt es sich um einen organischen Farbstoff, der mit DNA und RNA interkaliert (s. Abb. 2-

1). Dies ist aufgrund der planaren Struktur von Ethidiumbromid möglich. Es interagieren die aromatischen Ringe des Ethidiumbromids mit den heteroaromatischen Ringen der Nukleinsäurebasen. Aufgrund der stöchiometrischen Interkalation des Ethidiumbromids können Nukleinsäuren im Agarosegel quantifiziert werden (SAMBROOK *et al.*, 1989).

Der interkalierende Farbstoff wird durch UV-Licht (254-366nm) angeregt und emittiert Licht im orange-roten Bereich der Wellenlänge 590nm. Die Anlagerung an die Nukleinsäuren bewirkt eine Verstärkung der Fluoreszenz, so dass die Färbung auch in Gegenwart von freiem Ethidiumbromid im Agarosegel deutlich zu sehen ist.

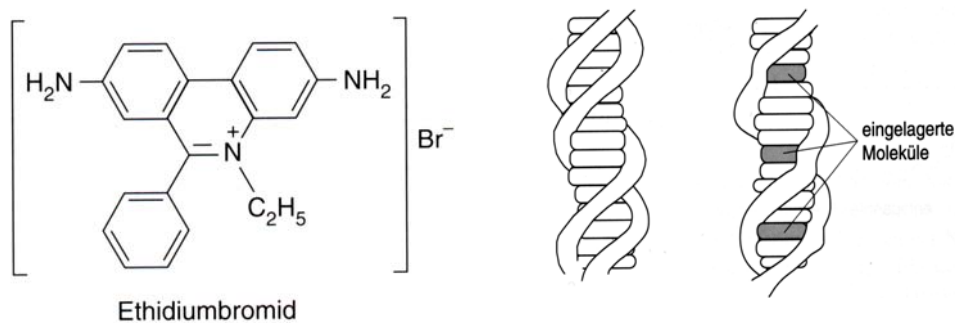


Abb. 2-1: Strukturformel von Ethidiumbromid. Interkalierende Moleküle in doppelsträngiger DNA. (Quelle: Lottspeich und Zorbas 1998)

2.4.3 Agarose-Gelelektrophorese

Mit Hilfe der Agarosegele ist es möglich Nukleinsäuren nach ihrer Größe (Molekulargewicht) aufzutrennen. Die Wanderungsgeschwindigkeit und die Auftrennung der Nukleinsäuren hängt in erster Linie von der Konformation, vom pH-Wert und der Zusammensetzung des Gelpuffers, sowie von der angelegten Spannung und von der Agarosekonzentration ab. Die Auftrennung der Nukleinsäuren geschieht in einem elektrischen Feld aufgrund ihrer, bei neutralem pH-Wert, negativ geladenen Phosphatgruppen. Hierbei wandern die kleineren DNA- und RNA-Fragmente schneller durch die Agarose-Matrix als die großen, da diese den kleineren weniger Widerstand bietet.

2.4.3.1 Längenstandard für Agarosegele

Für die Agarose-Gelelektrophorese wurde der Längenstandard von der Firma Carl Roth in Karlsruhe verwendet.

- 100bp Ladder (0,5µg/10µl) (Fragmentgrößen von 100bp bis 1000bp)

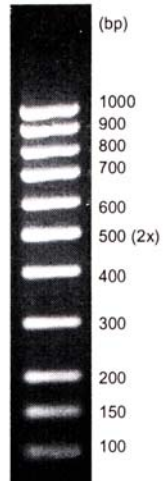


Abb. 2-2: Längenmarker 100bp ladder

2.4.3.2 Durchführung der Agarose-Gelelektrophorese (Minigel) und Probenvorbereitung

Zur Auftrennung und Analyse von Nukleinsäure-Fragmenten wurden je nach Probenanzahl zwei verschiedene horizontale Elektrophoresekammern (Mini sub cell bzw. Mini wide cell, Biorad, München) genutzt. Die entsprechenden Gelträger hatten die Größen 7 x 6cm bzw. 7 x 15cm. Für die Agarose-Gelelektrophorese können Agarose-Konzentrationen von 0,7-2,0% eingesetzt werden, abhängig von der Größe der zu trennenden Fragmente.

Agarose [%]	Größe der aufzutrennenden DNA-/RNA-Fragmente
0,7	1 – 30
1,0	0,5 – 10
1,2	0,4 – 7
1,5	0,2 – 3
2,0	0,05 – 2

Tab. 2-1: Übersicht der geeigneten Gelkonzentrationen für die Auftrennung verschieden großer DNA-Fragmente.

Die Agarose wurde entsprechend der gewünschten Konzentration des Gels abgewogen und in 30 bzw. 60ml 0,5x TBE-Puffer gegeben und anschließend in einem Mikrowellengerät (Micro Chef FM 350, Moulinex) aufgekocht und gelöst, bis in der Lösung keine Schlieren mehr zu erkennen waren. Der durch verdampftes H₂O entstandene Gewichtsverlust wurde mit entsprechendem Volumen ddH₂O ergänzt. Nun konnte das Gel auf den, im Gelgießstand eingespannten Gelträger mit eingesetztem Probenkamm (10, 15, 20 Taschen) ausgegossen werden. Nach dem Aushärten wurde der Probenkamm entfernt und das Gel in der mit 0,5x TBE-Puffer gefüllten Elektrophoresekammer platziert.

Die Nukleinsäureproben wurden auf einem Nesco-Film-Streifen (Nescofilm, Roth, Karlsruhe) mit 1/5 Volumen 6x Probenpuffer (Orange G) versetzt.

Bei Verwendung der Gotaq[®] Flexi DNA-Polymerase (Pormega, Mannheim) (s. Kap. 2.4.6) war das Versetzen mit Probenpuffer nicht notwendig. Der Polymerasenpuffer enthielt schon Glycerin und Farbstoff.

0,5x TBE-Puffer: (5x konz. Ansetzen)	Tris	89mM
	Borat	89mM
	Na ₂ -EDTA	2mM
	pH = 8 einstellen	
6x Probenpuffer Orange G:	Orange G	0,2%
	Xylene Cyanol FF	0,05%
	Glycerol	60%
	Na ₂ -EDTA	60mM

2.4.3.3 Dokumentation der Agarosegele

Die Elektrophorese wurde auf dem UV-Tisch (TF-20.M-Bioblock Scientific, Illkirch, Frankreich) mit Erregerfilter UG1 auf Eignung zur Auswertung geprüft und mit einem gekühlten, empfindlichen CCD-Digitalkamerasystem (CF 8/1 DX von Kappa, Göttingen) mit vorgeschalteten Filtern (Schott GG495 und BG18) zur späteren Dokumentation fotografiert. Die Bilder konnten auf einem Thermodrucker ausgedruckt und digital abgespeichert werden. Bei Bedarf konnten die Bilder mit dem Bildbearbeitungsprogramm Adobe Photoshop CS (Adobe System Incorporated, 2003) bearbeitet werden.

2.4.4 Reverse Transkription

Mit Hilfe der reversen Transkription ist es möglich RNA in copy-DNA (cDNA) umzuschreiben (s. Abb. 2-3), die dann über eine anschließende Polymerasekettenreaktion (PCR) weiter vervielfältigt und charakterisiert werden kann. Als reverse Transkriptase wurde das Enzym RevertAidTM H Minus M Mu-LV Reverse Transkriptase (Fermentas, St.Leon-Rot) verwendet, das aus dem murinen Leukämie-Virus isoliert wurde. Diese RNA abhängige DNA Polymerase ist für cDNA-Synthese mit langen RNA-Templates (>5kb) geeignet. Von einem oligo(dT)-Primer ausgehend wird von der M-MLV Reverse Transkriptase (H-) in 3'-Richtung selektiv der Komplementärstrang der mRNA synthetisiert. Dadurch entsteht ein Hybriddoppelstrang von DNA/RNA.

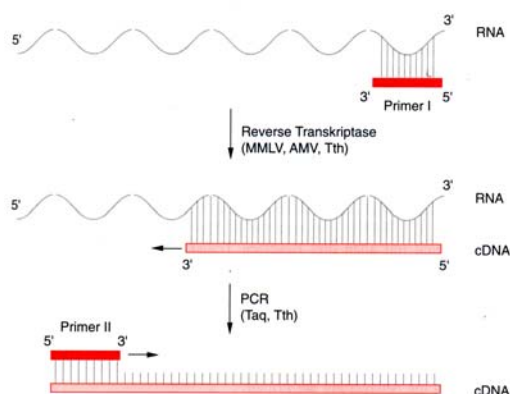


Abb. 2-3: Schematische Darstellung der RT-PCR. Da die RNA nicht direkt durch die PCR amplifiziert werden kann, muss sie zunächst in cDNA umgeschrieben werden. (Quelle: Lottspeich und Zorbas, 1998)

Die Durchführung erfolgte nach der Vorschrift von Fermentas (St. Leon-Rot). Da während der Arbeit ein semiquantitatives Verhältnis der untersuchten Cytoskelettrelevanten-RNAs aufgestellt werden sollte, war im RT-Ansatz darauf zu achten, dass bei allen RT-Schritten mit den verschiedenen Zellstadien die gleiche Menge an gRNA eingesetzt wurde. Zur Konzentrationbestimmung der gRNA wurde die Photometrie (s.o.) herangezogen. Bei allen Ansätzen wurde ein gRNA-Gehalt von 0,68µg eingesetzt. Das restliche Volumen wurde dann auf 11µl aufgefüllt.

Reaktionsansatz (rev. Transkription):	x µl	gRNA (0,68µg)
(20µl Ansatz)	1 µl	Oligo d(T) ₁₅ -Primer (500 µg/µl)
	x µl	sddH ₂ O (auf 11µl auffüllen)
	4 µl	M-MLV RT 5x Reaktionspuffer
	1 µl	RNase-Inhibitor
	2 µl	dNTP-Mix
	1 µl	M-MLV RT (H-) (200units)

2.4.5 Polymerasekettenreaktion (PCR) und Oligonukleotid-Primer

Die Methode der PCR (polymerase chain reaction) ist ein Verfahren zur Amplifikation beliebiger Nukleinsäuren. Die DNA-Amplifikation erfolgte in Anlehnung an die Protokolle von SAMBROOK *et al.* (1989). Das Prinzip beruht auf einer Hitzedenaturierung eines zu amplifizierenden DNA- (bzw. RNA/DNA-) Doppelstrangs mit anschließender Anlagerung von Oligonukleotid-Primern (15 - 30 bp) mit definierter Sequenz. Diese synthetischen Oligonukleotid-Primer binden an den ihnen komplementären Sequenzen der Matrizen-DNA an und leiten die Amplifikation (Polymerisation oder Elongation) des dazwischenliegenden Sequenzabschnitts ein. Dabei erfolgt die Synthese des Stranges vom 3'-OH-Ende der Primer durch eine hitzestabile DNA-Polymerase (Taq-Polymerase, Promega, Mannheim). Nach einer erneuten Hitzedenaturierung beginnt der Zyklus von vorne. Auf diese Weise erreicht man eine theoretisch exponentielle Amplifikation der durch die Primer flankierten gewünschten DNA-Sequenz. Als limitierender Faktor bei der PCR fungieren die „Verbrauchsmaterialien“, wie die dNTP's und die Primer.

Anzahl der Zyklen	Denaturierung	Annealing	Polymerisation
1	94°C, 90s		
30	94°C, 60s	62,5°C, 45s	72°C, 120s
1	94°C, 30s	62,5°C, 60s	72°C, 10min

Tab. 2-2: Mögliches Profil eines PCR-Programms (für α -Tubulinprimer).

Primerpaare für die Amplifikation von	Annealingtemperatur
α -Tubulin	62,5°C
γ -Tubulin; Actin	61,9°C
γ -Tubulin Volllänge	56,9°C
Elongationsfactor-1 ^a	54°C
Histon H4	53°C

Tab. 2-3: Annealingtemperaturen der untersuchten RNAs

Bei der PCR handelt es sich um ein theoretisch exponentielles Vermehrungssystem bei dem es aufgrund der „Verbrauchsmaterialien“ zu einer Sättigung kommen kann. Dadurch muss bei einer Quantifizierung der Produkte gewährleistet sein, dass die PCR im linearen Bereich verläuft.

Sämtliche PCR-Experimente wurden in einem Thermozykler (Primus 25, MWG Biotech, Ebersberg) durchgeführt. Dieser Thermozykler besitzt einen temperierbaren Reaktionsraum, in dem die Proben platziert werden, und einen beheizbaren Deckel. Dadurch wird die Kondensation der Proben am Deckel der PCR-Tubes verhindert.

Im Rahmen der Arbeit wurde die Gotaq[®] Flexi DNA-Polymerase (Promega, Mannheim) und die TrueStart[™] Taq DNA Polymerase (Fermentas St. Leon-Rot) verwendet.

Die GoTaq[®] Flexi DNA-Polymerase wird mit zwei Reaktionspuffern geliefert, ein grüner Gotaq[™] Reaktionspuffer und ein farbloser Gotaq[™] Reaktionspuffer. Bei Verwendung des grünen Reaktionspuffers ist es möglich, nach der PCR die Probe direkt auf ein Agarosegel aufzutragen, da hier schon das Glycerin (zum Absenken der Probe) und die Farbstoffe (zum Verfolgen des Gellaufs) enthalten sind. Der Reaktionspuffer

enthält nur Glycerin, wodurch dieser z.B. für Fluoreszenzmessungen bei einer Real-Time PCR eingesetzt werden kann.

Bei der TrueStart™ Taq DNA Polymerase handelt es sich um eine Hot Start DNA Polymerase welche bei Raumtemperatur inaktiv ist. Diese wird erst während des PCR-Laufs beim Denaturierungsschritt bei 95°C aktiviert, somit kommt es nicht zur unspezifischen Amplifikation von Primer-Dimeren oder unspezifischen Primerbindungen. Die TrueStart™ Taq DNA Polymerase wurde für die Amplifikation der γ -Tubulin Volllänge verwendet.

Die PCR-Reaktionen wurden in 12,5 μ l, 25 μ l bzw. 50 μ l Ansätzen durchgeführt. Nach Pipetieren des Ansatzes wurde dieser gut durchmischt und kurz abzentrifugiert (Centrifuge 5415C Eppendorf, Wesseling-Berzdorf). Nachdem der PCR-Block auf 94°C vorgeheizt war, konnten die Ansätze in den Block gestellt werden.

Reaktionsansatz mit GoTaq® Flexi: (50 μ l Ansatz)	10 μ l	5x GoTaq® Flexi Puffer (grün oder farblos)
	6 μ l	MgCl ₂ (25mM)
	4 μ l	dNTPs (10mM)
	0,5 μ l	Upstream Primer
	0,5 μ l	Downstream Primer
	0,25 μ l	GoTaq® DNA Polymerase (5u/ μ l)
	5 μ l	Template DNA
	27,75 μ l	sddH ₂ O
Reaktionsansatz mit TrueStart™: (50 μ l Ansatz)	5 μ l	10x TrueStart™ Puffer
	4 μ l	MgCl ₂ (25mM)
	4 μ l	dNTPs (10mM)
	0,5 μ l	Ustream Primer
	0,5 μ l	Downstream Primer
	0,25 μ l	TrueStart™ DNA Polymerase (1,25 u/ μ l)
	5 μ l	Template DNA
	30,75 μ l	sddH ₂ O

2.4.5.1 Oligonukleotid-Primer

Im Folgenden werden alle zur Verfügung gestellten und verwendeten Primer aufgeführt. Bei den α -Tubulin-Primern handelt es sich um umbenannte Primer (214 = Gollum; 212 = Saruman), die in der Arbeit von SCHRÖDER (2002) verwendet wurden. Die γ -

Tubulin-Primer wurden von SCHRÖDER entwickelt. In der Examensarbeit von DEBUS (2004) wurden die Annealingtemperaturen für die PCR optimiert. Die restlichen verwendeten Primer für Actin, Elongationsfakto-1 α und Histon H4 wurden im Laufe der Arbeit selbst entwickelt (s. Sequenzvergleiche Anhang). Die Primer für die γ -Tubulin-Volllänge wurden im Rahmen der Arbeit von OSTERTAG (2008) entwickelt. Alle Primersynthesen wurden bei der Firma MWG-Biotech, Ebersberg in Auftrag gegeben. Die Vektorprimer waren in den jeweilig verwendeten Transformationskits enthalten.

Degenerierte α -Tubulin Primer:

Gollum: 5'-AA(CT) TC(AGCT) CC(CT) TCC AT(ATCT) CC-3'
 Saruman: 5'-GG(AGCT) AA(AG) TA(CT) ATG GC(AGCT) TG(CT) TG-3'

Spezifische γ -Tubulin Primer auf *Nicotiana tabacum*:

Frodo: 5'-ATG TCA TGA GAA GGC TCC-3'
 Bilbo: 5'-CCT GAG TGG GAT CAA CTT-3'

Spezifische γ -Tubulin Primer auf *Nicotiana tabacum* mit NdeI und Sal I –Schnittstelle:

gtub_fw_89_cDNA: 5'-CAG TAA AAA **CAT ATG** CCG AGA GA-3' **Nde I-Schnittstelle**
 gTub_rev_1536_cD: 5'-AGT AAG CTG **TCG ACT** AAA GAT AAC-3' **Sal I –Schnittstelle**

Spezifische Actin Primer auf *Nicotiana tabacum*:

Harry: 5'-TGC ATA TGT TGG TGA TGA AG-3'
 Potter: 5'-ATG GCG ACA TAC ATA GCA G-3'

Degenerierte Histon H4 Primer auf *Nicotiana tabacum*:

H4 vorne deg: 5'-G(AGCT) (AC)G(ACT) GG(ACT) AA(AG) GG(ACT) GG(AC)-3'
 H4 hinten deg: 5'-(AG)AC (AG)G(AC) GTC (AG)CG (AG)AT (AGC)AC (AG)-3'

Degenerierte Elongationsfaktor-1 α Primer auf *Nicotiana tabacum*:

NT_elong1a_fw: 5'-ATT GGT ACT GTC CCT GTT G-3'
 NT_elong1a_rev: 5'-TGA GAT CCT TAA C(CT)G CAA C-3'

Vektorprimer für pGEM[®]-T-Vektor:

M13 uni: 5'-TGT AAA ACG ACG GCC AGT-3'
 M13 reverse: 5'-CAG GAA ACA GCT ATG ACC-3'

Vektorprimer für pJET1/blunt-Vektor:

pJET1 forward: 5'-GCC TGA ACA CCA TAT CC A TCC-3'
 pJET1 reverse: 5'-GCA GCT GAG AAT ATT GTA GGA GAT C-3'

2.4.5.2 Anfertigen einer PCR-Sättigungskurve

Die Bestimmung des Sättigungsbereichs der PCR wurde in Anlehnung an die Arbeit KINOSHITA *et al.* (1992) durchgeführt. Die Markierung der Amplifikate erfolgte dabei nicht-radioaktiv, sondern wurde nach dem Auftrennen in einem Agarosegel mit Farbstoffen detektiert.

Dafür wurden mehrere 12,5µl PCR-Ansätze für γ -Tubulin, α -Tubulin, Actin, Histon H4 und Elongationsfactor-1 α pipettiert. Nach 20 Zyklen wurde je ein PCR-Tube entnommen, dann alle 5 Zyklen ein weiteres, bis zu insgesamt 50 Zyklen. Diese Proben wurden bei -20°C eingefroren.

Von jedem Reaktionstube wurde ein Aliquot auf ein Agarosegel aufgetragen. Die Intensität der Banden wurde gemessen und der Sättigungsbereich der jeweiligen PCR-Reaktion visuell bestimmt.

2.4.5.3 Kolonie-PCR

Die Kolonie-PCR wird zum Nachweis von Genen in Bakterien eingesetzt. Anstatt isolierter cDNA werden die Bakterienkolonien direkt verwendet.

Dazu wurden zum fertigen PCR-Ansatz anstatt des Templates Bakterien in den Ansatz gegeben, indem die Kolonien mit einer Sterilen Pipettenspitze „gepickt“ und im Ansatz gelöst wurden.

Durch die hohe Temperatur beim Denaturierungsschritt wird die Bakterien-Membran zerstört. Die Nukleinsäuren gehen in Lösung, so dass sich die Primer anlagern und die DNA-Polymerase angreifen kann. Mit Hilfe dieser Methode ist es möglich einfach und schnell viele Klone nach einer Transformation zu überprüfen.

2.4.6 Restriktion von DNA

Um PCR-Produkte oder DNA im Allgemeinen gerichtet in einen Vektor zu ligieren kann die DNA und der Vektor mit Restriktionsenzymen geschnitten werden. Damit die γ -Tubulin-Sequenz im Expressionsvektor pET-44a(+) überexpressiert werden konnte war es nötig den Vektor und die DNA-Amplifikat der γ -Tubulin Volllänge mit den gleichen Restriktionsenzymen zu schneiden.

Die γ -Tubulin cDNA- Volllänge-sequenz wurde mittels spezifischer Nukleotidsubstitutionen in den Oligonukleotide um zwei Schnittstellen ergänzt (s. Kap. 2.4.6.2).

Zur Expression eines unmodifizierten und C-Terminal um einen His-Tag erweiterten γ -Tubulins war aufgrund ihrer Schnittstelle die Verwendung der Restriktionsenzyme Nde I und Xho I durch den Vektor (s. Kap. 2.4.8.3) vorgegeben. Da die γ -Tubulin-Volllänge-sequenz jedoch bereits zwei Xho I –Schnittstellen an den Positionen 285 und 494 (KAUTZ und SCHRÖDER, 2000) trägt, wurde das Amplifikat mit Sal I geschnitten, da es möglich ist, einen mit Sal I geschnittenen Doppelstrang mit einem Xho I geschnittenen Doppelstrang zu ligieren. Bei Sal I und Xho I geschnittenen Doppelsträngen entstehen zueinander komplementäre Überhänge, die dann wieder ligiert werden können.

Zur Verwendung kamen die FastDigest™ Restriktionsenzyme (Fermentas, St. Leon-Rot).

Die Restriktionsansätze wurden leicht gevortext und danach kurz abzentrifugiert, bevor sie für je 15min bei 37°C im Thermocycler (Primus 25, MWG) inkubiert wurden. Ein abschließender Inaktivierungsschritt bei 65°C bzw. 80°C führte zur Inaktivität der Restriktionsenzyme.

Reaktionsansatz der Restriktion:	2 μ l	10x FastDigest Puffer
(PCR-Amplifikat in Subklonierungsvektor)	6,3 μ l	γ -Tub in Subklonierungsvektor
	1 μ l	Nde I
	1 μ l	Sal I
	9,7 μ l	sdd H2O
Reaktionsansatz der Restriktion:	2 μ l	10x FastDigest Puffer
(Überexpressionsvektor)	4,3 μ l	pET-44a(+) Expressionsvektor
	1 μ l	Nde I
	1 μ l	Xho I
	11,7 μ l	sdd H2O

2.4.7 Aufreinigung von DNA

Mit Hilfe von Aufreinigungsverfahren können die Reaktionsbedingungen in einer Lösung neutralisiert werden, sofern es für die weiterführenden Reaktionen notwendig ist. Bei diesem Vorgang werden z.B. Enzyme, Salze und Primer-Dimere entfernt, um

eine vermeintliche Fehlligation in Vektoren (z.B. von Primer-Dimeren oder unvollständigen Amplifikate) zu verhindern. Die Aufreinigung erfolgte entweder aus dem Agarosegel, wobei die Banden ausgeschnitten wurden, oder aber aus dem PCR-Ansatz direkt.

Für die Aufreinigung wurde das NucleoSpin[®] Extract II- Extraktionssystem (Macherey & Nagel, Düren) verwendet.

Dieses basiert auf einer Silika-Membran an der DNA unter Anwesenheit von chaotropen Salzen bindet. Die Agenzien entziehen der DNA die Hydrathülle, wodurch die DNA an die Silika-Membran binden kann. Dabei werden die kurzen DNA-Stücke (unter 65 Basenpaare) nicht gebunden, wie z.B. Primerdimere und unbenutzte Primer, die bei einer anschließenden Ligation zu Falschinsertionen führen könnten. Durch anschließende Waschschrte werden die Verunreinigungen (Agarose, Enzyme, Salze und Farbstoffe) entfernt. Danach wird die DNA von der Silika-Membran eluiert.











	Gel extraction	PCR clean-up
1 Excise DNA fragment		
2 Gel lysis / Adjust binding conditions	 200 µl NT / 100 mg 50 °C 5-10 min	 200 µl NT / 100 µl
3 Bind DNA	 	1 min 11,000 x g
4 Wash silica membrane	 	600 µl NT3 1 min 11,000 x g
5 Dry silica membrane		2 min 11,000 x g
6 Elute DNA	 	15-50 µl NE 1 min RT 1 min 11,000 x g

Abb. 2-4: Übersichtsschema über die Wirkungsweise und Versuchsdurchführung des NucleoSpin[®]- Extract II-Extraktionssystem (Quelle: Macherey & Nagel)

2.4.7.1 Aufreinigung aus dem Agarose-Gel

Nach einer Gelelektrophorese wurde auf dem UV-Tisch mit einem Skalpell die gewünschte DNA-Bande aus dem Agarosegel ausgeschnitten und in ein Eppendorfreaktionsgefäß überführt. Auf das Gelstück wurden pro 100mg Agarose 200µl NT-Puffer hinzugegeben. Die Probe wurde dann in einem Wasserbad bei 50°C für 5-10min inkubiert und gelegentlich gevortext, bis die Gelstücke vollständig gelöst

waren. Anschließend wurde die Lösung auf eine NucleoSpin-Säule aufgebracht und in ein 2ml Reaktionsgefäß in einer Eppendorffzentrifuge (1min; 11000x g) abzentrifugiert. Dabei kam es zu einer Bindung der DNA an die Silika-Membran. Das Waschen der Silika-Membran erfolgte mit 600µl NT3-Waschpuffer und Zentrifugation (1min; 11000x g). Die Silika-Membran wurde durch Zentrifugation (2min; 11000x g) getrocknet. Zum Eluieren der DNA wurde die NucleoSpin-Säule auf ein neues steriles 1,5ml Eppendorffgefäß gesteckt. Es wurden 15-50µl ddH₂O auf die Membran aufgegeben und nach 1minütiger Inkubationszeit die DNA-haltige Lösung abzentrifugiert (1min; 11000x g) und für weitere Untersuchungen bei 4°C im Kühlschrank aufbewahrt.

2.4.7.2 Aufreinigung von Restriktionsverdau und PCR-Ansatz

Die Aufreinigung des Restriktionsverdau und direkt aus dem PCR-Ansatz erfolgte wie unter 2.4.7.1 beschrieben, mit dem Unterschied, dass dem PCR-Ansatz das 2fache Volumen von NT-Puffer zugegeben und die Lösung anschließend auf die NucleoSpin-Säule aufgetragen wurde.

2.4.8 Ligation

Die Voraussetzung für die Vermehrung von DNA-Fragmenten mit Hilfe von Bakterien ist die Ligation in geeignete Vektorplasmide. Dabei kamen das pGEM[®]-T Vektor System (Promega, Mannheim) und das GeneJet[™] PCR Cloning Kit (Fermentas, St. Leon-Rot). Dabei werden die Phosphodiesterbindungen durch eine T4-Ligase katalysiert.

2.4.8.1 pGEM[®]-T Vektor System

Mit dem pGEM[®]-T Vektor System ist es möglich PCR-Produkte zu klonieren. Dabei liegt das Plasmid in linearisierter Form vor, da der pGEM[®]-T Vektor zuvor mit dem Enzym EcoR V geschnitten wurde und am 3'-Ende ein Thymidin-Überhang gebildet wird. Durch diesen T-Überhang an der Schnittstelle ist es möglich, PCR-Produkte mit einem Adenin-Überhang unter Vermittlung einer T4-Ligase in den Vektor einzubringen

und wieder zu rezirkularisieren. Dabei wird ATP als Co-Faktor für die Reaktion verwendet.

Der Vektor besitzt ein Ampicillin-Resistenzgen, das den Bakterien mit dem aufgenommenen Vektor die Möglichkeit gibt, auf Ampicillin-haltigem Medium zu wachsen. Die Ligation erfolgt in die für die β -Galactosidase kodierenden Bereich (*lacZ*) und ermöglicht die Überprüfung über Blau-Weiß-Selektion (s. Kap. 2.4.9.3.1).

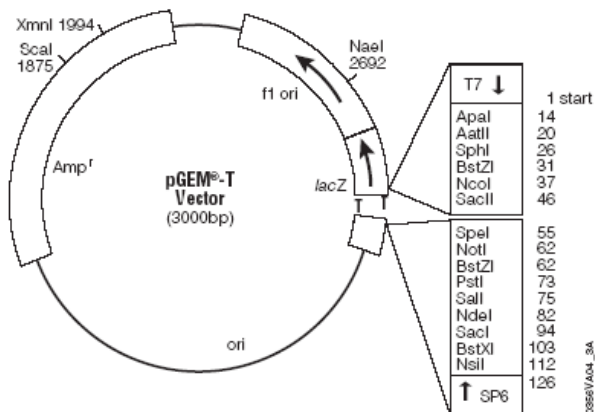


Abb. 2-5: pGEM[®]-T Vektor (Quelle: Promega, Mannheim)

Für die Ligation wurde ein Molaritätsverhältnis von 3:1 (Insert:Vektor) eingesetzt. Die entsprechende Menge des einzusetzenden Inserts konnte mit der nachfolgenden Formel berechnet werden.

$$\frac{(\text{ng Vektor} \times \text{kb Insert}) \times \text{gewünschtem Insert/Vektor-Verhältnis}}{\text{kb Vektor}} = \text{ng Insert}$$

Ligationsansatz:

5 μ l	2x Ligations-Puffer
1 μ l	pGEM [®] -T Vektor
x μ l	PCR-Produkt
auf 10 μ l mit sdd H ₂ O auffüllen	

Der Ligationsansatz wurde auf Eis zusammenpipettiert und gemischt. Die Inkubation erfolgte entweder für 1h bei 37°C oder über Nacht bei 4°C, bevor er für die Transformation eingesetzt wurde.

2.4.8.2 GeneJet™ PCR Cloning Kit

Als weiteres Klonierungskit kam das GeneJet™ PCR Cloning Kit der Firma Fermentas (St. Leon-Rot) zum Einsatz. Dies ermöglicht PCR-Produkte zu ligieren, die mit Pfu DNA Polymerase, Taq DNA Polymerase oder anderen temperaturstabilen DNA Polymerasen amplifiziert wurden.

Der im Kit beinhaltete pJET1/blunt Vektor liegt linearisiert vor. Er ist für die Ligation mit Blunt oder blunted PCR-Produkten geeignet. Die 5'-Enden der DNA auf der Vector Cloning Site beinhalten phosphorierte Gruppen. Dadurch können Blunt-End PCR-Produkte die mit Proofreading DNA-Polymerasen erstellt wurden direkt in den pJET1/blunt Vektor ligiert werden. PCR-Produkte mit 3'-Adenin Überhang die mit Taq DNA-Polymerasen erstellt wurden müssen erst mit dem im Kit vorliegenden DNA Blunting Enzym geblunted werden.

Die Selektion der transformierten *E. coli* Zellen erfolgt über einen Lethal-Faktor (s. Kap. 2.4.9.3.2) der im linearisierten Vektor enthalten ist. Es können nur die *E. coli* wachsen die das Plasmid mit Insert aufgenommen haben, da das Insert den Lethal-Faktor zerstört.

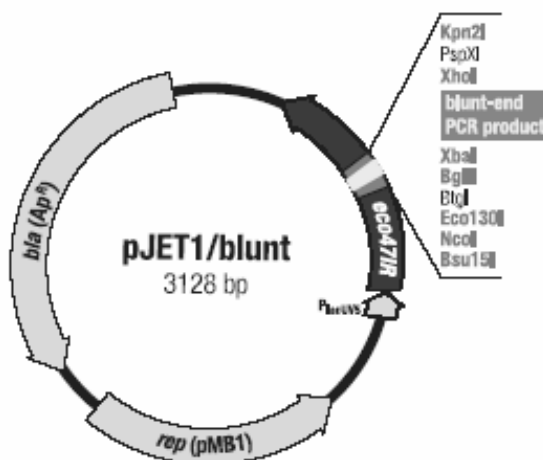


Abb. 2-6: pJET1/blunt Vektor

Im Rahmen der Arbeit wurden nur DNA Polymerasen verwendet die einen Adenin-Überhang erzeugen, daher musste vor der Ligation das PCR-Amplifikat geblunted werden.

Ansatz der Blunting Reaktion:	10µl	2x Reaktionspuffer
	1-2µl	PCR-Produkt
	1µl	DNA Blunting Enzym
	auf 17µl mit sdd H ₂ O auffüllen	

Nach dem Vortexen erfolgt eine Inkubation für 5min bei 70°C bei der die Adenin-Überhänge entfernt wurden. Danach wurde der Ansatz direkt auf Eis gestellt und der Vektor und die T4 DNA-Ligase zugegeben und anschließend für 5min bei 22°C inkubiert.

Ansatz der Ligation:	1µl	pJet1/blunt Vektor
	1µl	T4 DNA Ligase

2.4.8.3 pET-44a(+)-Vektor

Der pET-44a(+)-Vektor der Firma Novagen (Nottingham, UK) ist ausgelegt für Klonierungen und hohe Expression von Peptid-Sequenzen. Der Translationsvektor verfügt über einen starken Bakteriophagen-T7 Promotor. Der Vektor codiert einen zusätzlichen His-Tag, der aufgrund der Schnittstellenwahl (Nde I und Sal I) die eingefügte γ -Tubulin-Sequenz um einen (His)₆-Tag am C-Terminus erweitert. Durch die Anlagerung des His-Tag ergibt sich im Anschluss an die Überexpression die Möglichkeit der Aufreinigung.

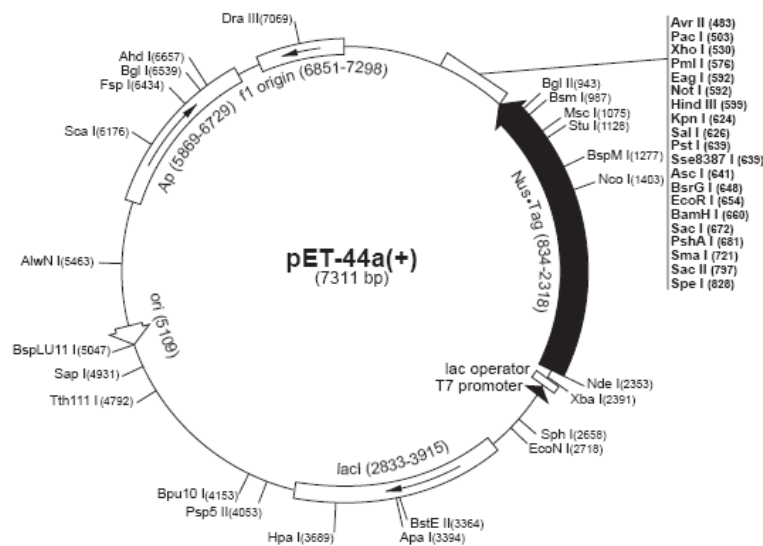


Abb. 2-7: pET-44a(+)-Vektor

2.4.9 Klonierung

Die direkte Aufnahme von DNA-Molekülen in die Zelle und die stabile Weitergabe dieser aufgenommenen Information wird Transformation genannt. Einige Bakterienstämme besitzen eine natürliche Kompetenz. Diese sind in der Lage die im umgebenden Medium freie vorhandene DNA aufzunehmen.

Die *E. coli* Stämme die im Rahmen der Arbeit verwendet wurden besitzen keine natürliche Kompetenz, können aber durch verschiedene Methoden kompetent gemacht werden. Die hier verwendeten Verfahren basieren auf der CaCl_2 -vermittelten Aufnahme von Plasmid-DNA durch Bakterien

2.4.9.1 Herstellung von kompetenten Bakterien

2.4.9.1.1 Kompetente XL 1-Blue MRF'-Zellen

Die XL 1-Blue MRF'-Zellen standen aus Dauerkulturen zur Verfügung. Von einer über Nacht angezogenen Bakterien-Plattenkolonie wurde das Material in 100ml SOB-Medium überimpft, in einem Schüttelwasserbad (GFL 1086, GFLmbh, Burgwedel) bei 37°C und 100rpm herangezogen, bis ein OD_{600} -Wert von 0,5 erreicht wurde. Dann wurden die Bakterien in ein 250ml Zentrifugen-Röhrchen (Beckman-Coulter, Krefeld) überführt und 10min auf Eis inkubiert. Im Anschluß erfolgte eine Zentrifugation bei 7000x g, 4°C für 10min (Beckmann J2-21, Rotor JS 13.1). Das Pellet wurde für eine Minute getrocknet und dann mit 20ml eiskaltem TFB-Medium resuspendiert. Nachdem die Suspension 30min auf Eis inkubiert wurde sie erneut bei 7000x g, 4°C für 10min zentrifugiert. Im Anschluß wurde das Pellet in 2-4ml TFB-Medium gelöst und für 30min auf Eis inkubiert. Danach waren die Bakterien für die Transformation einsetzbar.

2.4.9.1.2 Kompetente DH5 α - und BL21-Zellen

Aus zur Verfügung stehenden Dauerkulturen von DH5 α - und BL-21-Zellen wurde von einer über Nacht angezogenen Bakterien-Plattenkolonie (LB-Medium, 10mM MgCl_2) das Material für 4-5h in 100ml TYM-Broth-Medium in einem Schüttelwasserbad (GFL 1086, GflmbH, Burgwedel) bei 37°C und 100rpm angezogen. Bei Erreichung eines OD_{600} -Werts von 0,8-0,9, wurden die Zellen für 10min bei 3000x g und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde in 40ml eiskaltem Tfb I-Medium vorsichtig resuspendiert und für 20min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte eine

Zentrifugation für 8min bei 3000x g , 4°C und das Pellet wurde in Tfb II-Medium resuspendiert. Hiervon wurden Aliquots von je 50µl auf in flüssigem Stickstoff vorgekühlten 1,5ml Reaktionsgefäßen eingefroren und anschließend bei -80°C gelagert, oder konnten für die Transformation verwendet werden.

2.4.9.2 Transformation

Zu 100µl kompetenten Bakterien wurde 2µl Ligationsansatz hinzugegeben und für 30min auf Eis inkubiert. Danach erfolgte ein Hitzeschock bei 42°C für 60sec, bei dem die Bakterien die Plasmide aufnahmen. Dieser Behandlungszeitraum durfte nicht zu lang gewählt werden, da es sonst zu einem Absterben der Bakterien führen kann. Nach dem Hitzeschock wurden die Bakterien direkt auf Eis abgekühlt. Nach zwei Minuten wurden 900µl SOC-Medium zugegeben und bei 37°C für 90min in einem Schüttelwasserbad (150rpm) inkubiert.

Danach konnten die Bakterien auf Selektivplatten ausgestrichen werden, um die Transformation zu überprüfen. Dort konnten nur Bakterien wachsen die ein Plasmid mit der entsprechenden Antibiotikaresistenz aufgenommen hatten. Bakterien die z.B. den pGEM[®]-T Vektor aufgenommen hatten konnten auf einem Selektivmedium mit Ampicillin-Zugabe wachsen.

2.4.9.3 Selektion der Transformanten

Alle im Rahmen der Arbeit verwendeten Vektoren besitzen ein Gen für die Ampicillinresistenz, wodurch auf LB-Amp-Medien nur diejenigen Bakterien wachsen, welche durch Transformation einen Vektor aufgenommen haben. Allein anhand des Wachstums auf einem ampicillinhaltigen Medium kann keine Aussage getroffen werden, ob das Insert aufgenommen wurde. Um Kolonien mit rekombinanten von nichtrekombinanten Plasmiden zu unterscheiden, konnten weitere Selektionen angewendet werden.

Klone, die aus Transformation mit dem Vektor pET-44a hervorgingen, konnten nicht über zusätzliche Selektion unterschieden werden. Daher wurde über Kolonie-PCR ermittelt ob die Zellen ein Plasmid mit Insert trugen.

2.4.9.3.1 Blau-Weiß-Selektion

Bei dem Vektor pGEM[®]-T handelt es sich um einen zur Blau-Weiß-Selektion fähigen Vektor. Die LB-Amp-Platten wurden hierzu zusätzlich mit 100µl IPTG (Stammlösung 200g/ml; BTS-Biotech Trade& Service GmbH, St. Leon-Rot) und 100µl X-Gal (Stammlösung 20mg/ml; Roth, Karlsruhe) versetzt, um eine Blau-Weiß-Selektion der Transformanten zu ermöglichen. Zur Erkennung, ob der Vektor das Fragment aufgenommen hat, dient das β -Galactosidase-Gen *lacZ*. Der Einbau eines Inserts erfolgt innerhalb dieses *lacZ*-Gens. Dadurch kann keine funktionsfähige β -Galactosidase mehr gebildet werden. Das IPTG dient als Induktor der β -Galactosidase, deren Aktivität auf Platten durch den Indikator X-Gal (5-Bromo-4-chlor-3-indolyl- β -D-Galaktosid) direkt nachweisbar ist. Die funktionsfähige β -Galaktosidase spaltet den farblosen Indikator unter Freisetzung des blauen Farbstoffes 5,5'-Dibromo-4,4'-Dichloro-Indigo. Bakterien, die ein Plasmid ohne Insert aufgenommen haben, bilden daher auf Platten mit X-Gal blaue Kolonien. Bei ungefärbten Zellen ist die β -Galaktosidase nicht funktionsfähig. Dadurch bleiben diejenigen Kolonien, die rekombinante Plasmide tragen, in der Regel auf Platten mit X-Gal weiß.

2.4.9.3.2 Selektion über Lethal-Faktor

Beim pJET1/blunt-Vektor handelt es sich um einen positiven Selektionsvektor. Dadurch wachsen nur Bakterien die das rekombinante Plasmid mit dem Insert aufgenommen haben. Bakterien die den rezirkularisierten pJET1/blunt-Vektor ohne Insert aufgenommen haben exprimieren eine lethale Restriktions-Endonuklease nach der Transformation und können somit nicht wachsen. Durch den Einsatz des Lethalfaktors kann diese Kontrolle auf normalen unbehandelten LB-Amp-Platten erfolgen.

2.4.9.4 DNA-Sequenzierung

Für die Sequenzierung mussten 170-350ng PCR-Produkt in die Sequenzierreaktion eingesetzt werden. Um das dazu notwendige Probenvolumen [μ l] abschätzen zu können, wurde eine Agarose-Gelelektrophorese mit 1, 2 und 3µl PCR-Produkt (amplifiziert mit Vektorprimern) durchgeführt. Die Proben wurden mit ddH₂O auf 10µl aufgefüllt und mit jeweils 2,5µl Auftragspuffer versetzt. Zusätzlich wurde eine Positivkontrolle mit definierten DNA-Gehalt auf das Gel aufgetragen. Durch Vergleich

der Signalstärke der einzelnen DNA-Banden konnte das benötigte Probenvolumen für die Sequenzierreaktion abgeschätzt werden. Dieses wurde in den vorbereiteten Sequenzieransatz pipettiert und über PCR amplifiziert. Das Amplifikat wurde anschließend zur Sequenzierung bei der Firma Genterprise eingereicht.

Sequenzier-Reaktion:	x μ l	Matritzen-DNA
	1 μ l	Primer (10pmol/ μ l)
	2 μ l	Big-Dye-Premix Version 3.1
	2 μ l	5x Sequenzierung Puffer Version 3.1
	auf 10 μ l mit ddH ₂ O	

2.4.10 Proteinexpression von γ -Tubulin in *E. coli* und Induktion der Proteinüberexpression

Im Rahmen der Staatsexamensarbeit von OSTERTAG (2008) wurde eine γ -Tubulin-Volllänge in einem Expressionsvektor überexprimiert, die zuvor in der PCR mit spezifischen Restriktionsschnittstellen amplifiziert wurde. Nach einer Ligation des Amplifikats in den pJET/blunt-Vektor wurde der Vektor in DH5 α Zellen eingebracht. Nach anschließender Plasmidextraktion wurde der Vektor mit den Restriktionsenzymen Nde I und Sal I geschnitten. Der pET-44(+) Vektor wurde nach Transformation in DH5 α Zellen und anschließender Vermehrung extrahiert und mit den Restriktionsenzymen Nde I und Xho I geschnitten.

Anschließend wurden das geschnittene PCR-Amplifikat und der Vektor pET-44(+) ligiert und in DH5 α Zellen zwischentransformiert, bevor nach einer Plasmidextraktion die Transformation in die BL21 (DE3) Zellen erfolgte, welche das endgültige Überexpressionssystem darstellten.

Eine Übersicht zur heterologen Expression des γ -Tubulins in einem Expressionsstamm zeigt das nachfolgende Schema (s.Abb. 2-8).

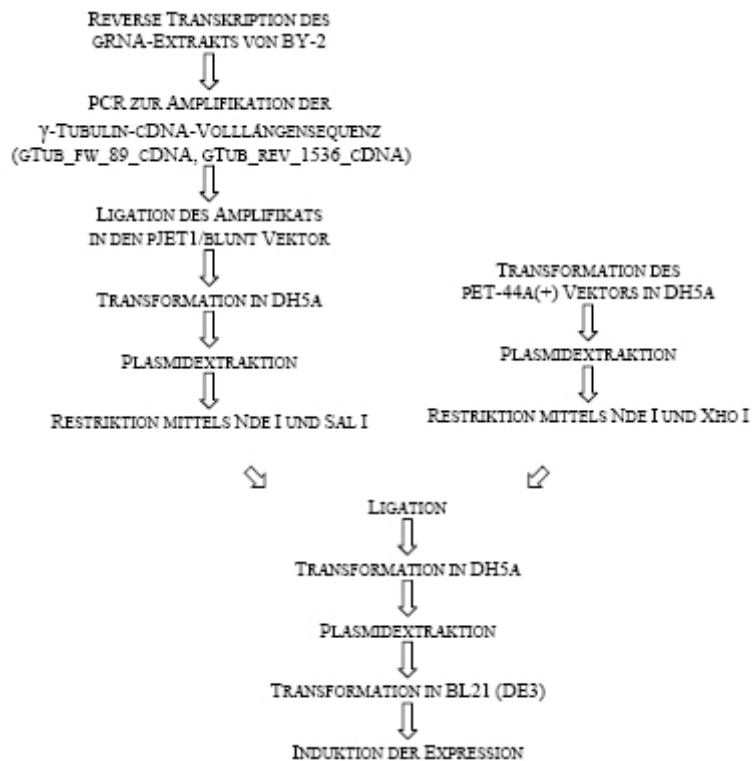


Abb. 2-8: Schema der Klonierung zur Heterologen Genexpression. Auf die zwischendurch notwendigen Nukleinsäure-Aufreinigungsschritte wurde aufgrund der Übersichtlichkeit verzichtet (OSTERTAG, 2008)

Die Induktion erfolgte durch Zugabe von 200µl einer 1 mol/l konzentrierten IPTG-Lösung zu der mit pET-44a(+) transformierten BL21(DE3) *E. coli*-Kultur.

Nach einer Inkubation von 3 Stunden bei 37°C und 150 rpm im Schüttelwasserbad wurden die Bakterien aus der Suspension isoliert und mit der Proteinisolation begonnen.

2.5. Proteinbiochemischer Teil

2.5.1 Herstellung eines polyklonalen Antikörpers gegen γ -Tubulin

Zur Gewinnung eines Antikörpers aus einem Tier, wird ein Antigen, z.B. in Form einer Proteinsequenz, in das Kaninchen gespritzt. Das Antigen löst die Bildung von Antikörpern aus. Zucker und Nukleinsäuren sind dazu nicht geeignet, da deren Antigenität schwach bis mittel ist. Proteine oder Substanzen mit einem MG < 5kd sind selten antigen. Um die Bildung von Antikörpern auszulösen, müssen Peptide oder kleinere Moleküle daher an einen Träger gekoppelt oder zu hochmolekularen Addukten

vernetzt werden. Als Träger dienen BSA oder das Glycoprotein KLH (keyhole limpet hemocyanin) (REHM, 2002)

Polyklonale Antikörper lassen sich durch mehrfache Immunisierung von z.B. Kaninchen erzeugen. Damit steht ein wichtiges Werkzeug für den Nachweis des Antigens mittels immunologischer Methoden, beispielsweise immunochemischer Proteinnachweis im Rahmen des Western-Blots, zur Verfügung.

Im Verlauf der Arbeit sollte ein Antikörper gegen pflanzliches γ -Tubulin entwickelt werden. Aufgrund der Untersuchungen von SCHLAG, 2002 wurde der γ -B-Peptidbereich von γ -Tubulin zur Immunisierung eingesetzt. Ein weiterer eingesetzter Peptidbereich war die von JOSHI definierte pflanzliche Sequenz die auch schon von DIBBAYAWAN (2001) verwendet wurde. Bei beiden Sequenzen handelte es sich um Bereiche die pflanzenspezifisch sind und somit auch nur pflanzliches γ -Tubulin detektieren sollten.

2.5.1.1 Polyklonaler Antikörper gegen pflanzlichen γ -B-Peptid-Bereich aus γ -Tubulin

Zur Immunisierung weiblicher Kaninchen, Rasse weiße Neuseeländer, wurde eine von der Firma Biosynthan, Berlin hergestellte Proteinsequenz (γ -B-Peptid-Bereich; SSYARTKEASQAKY, s. SCHLAG, 2002) als Antigen eingesetzt. Da die Proteinsequenz aus 14 AS bestand, wurde das Peptid an einen Träger FID 33 (Eurogentec, Köln), mit der Sequenz FIDAVWKCVPFIDAVWKT, gekoppelt. Als Kopplungsreagenz diente dabei 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid (EDC) (Sigma, Taufkirchen). Nach Abnahme von Blut zur Herstellung von Präimmenserum, erfolgte die Immunisierung insgesamt dreimal im Abstand von vier Wochen. Die gleichzeitige Verabreichung des Antigens mit Freud'schem Adjuvans (Sigma, Taufkirchen) garantierte dabei einen besonders hohen Antikörpertiter, da es eine verlangsamte Freisetzung des Antigens und eine verstärkte Immunantwort auslöst.

Die Kopplungsreaktion und das Immunisieren des Kaninchens wurden von Frau Dr. Diehl-Seifert aus der Arbeitsgruppe W.E.G. Müller, Physiologische Chemie, Johannes Gutenberg-Universität, Mainz durchgeführt.

Vor der ersten Immunisierung wurden 180 μ l Kopplungsansatz (160 μ g Peptid) mit 250 μ l PBS-Puffer verdünnt und mit 450 μ l Freud'schen Adjuvans (300 μ l complete + 150 μ l incomplete) emulgiert und dann an ca. 10 Stellen subkutan injiziert.

Für die beiden folgenden Immunisierungen wurde der gleiche Ansatz wie beim ersten Immunisieren gespritzt. Jeweils 10-12 Tage nach der zweiten bzw. dritten Immunisierung wurde dem Kaninchen Blut aus der Ohrvene entnommen. Dieses Blut, wie auch das Präimmunserum, wurde zur Serumzubereitung eine Stunde bei 37°C inkubiert. Nach einer weiteren einstündigen Inkubation auf Eis wurde 5min bei 3000rpm (Hettich Universal 14A, Unterschleissheim) zentrifugiert. Anschließend ließ sich das Serum von den geronnenen Blutbestandteilen trennen und wurde bei -20°C gelagert.

Es wurden zwei Durchgänge von Immunisierungen durchgeführt. Die erste Immunisierung erfolgte mit einem Kaninchen (KN 334). Die zweite Immunisierung, mit dem gleichen Peptid, wurde mit zwei weiteren Kaninchen (KN 340, KN 341) durchgeführt.

2.5.1.2 Polyklonaler Antikörper gegen pflanzenspezifische JOSHI-Domäne

Ein weiterer Antikörper gegen pflanzliches γ -Tubulin, mit der Peptidsequenz CEDFATQGGDRKDVFFY, wurde bei der Covalab (Lyon, Frankreich) mit der Referenznummer COR 1099 in Auftrag gegeben. Hierbei wurde ein von JOSHI et al. (1992) definierter Peptidbereich (Joshi-Peptidbereich) ausgewählt, wobei drei, zu den Pflanzen abweichenden, Aminosäuren gegen pflanzenspezifische ausgetauscht wurden. Nach dem Testen von fünf vorab zugesandten Präimmunseren wurden die Kaninchen KN714 und KN746 immunisiert.

2.5.1.3 Antikörperaufreinigung des γ -B-Peptid Antikörpers von Kaninchen KN 340 und KN 341 mittels EAH-Sepharose

Die Antikörperaufreinigung erfolgte über eine Affinitäts-Chromatographie. Dabei wird das Peptid gegen welches der polyklonale Antikörper aufgereinigt werden soll über einen Abstandshalter (Spacer) an eine Matrix gekoppelt. Dabei bleiben die Bindungseigenschaften des Liganden erhalten und die derivatisierte Matrix bindet selektiv den gesuchten Antikörper.

2.5.1.3.1 Kopplung der γ -B-Peptid-Sequenz an EAH Sepharose 4 B

Die Herstellung der γ -B-Peptid-Affinitäts-Säule wurde nach der Carbodiimid-Methode durchgeführt. Dabei wurde die Carboxylgruppe des γ -B-Peptids unter Verwendung des Carbodiimids 1-(3-Dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimidhydrochlorid (EDC) an die Aminogruppe der EAH-Sepharose 4 B (Amersham Biosciences, Freiburg) unter Ausbildung einer Peptidbindung gekoppelt. Die Kopplungsreaktion erfolgte nach dem Protokoll der Firma Amersham Biosciences. Dazu wurde das bereits vorgequollene Säulenmaterial mit Hilfe einer Nutsche über einen Glasfilter (G3) mit 80 ml 0,5 M NaCl pro ml Säulenmaterial gewaschen. Der Ligand (γ -B-Peptid) (10mg/ml) wurde in Coupling Solution (sddH₂O; pH 4,5) gelöst. Danach wurde die Ligandenlösung auf die Matrix in einem Verhältnis Matrix : Ligandenlösung = 1:1 aufgebracht und das Carbodiimid in Pulverform bis zu einer Endkonzentration von 0,1M zugegeben. Zur Kopplungsreaktion wurde das Säulenmaterial in ein Falcon-Röhrchen gegeben und unter leichtem Schwenken für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Dabei wurde der pH-Wert überprüft und bei Bedarf wieder auf pH=4,5 eingestellt. Danach erfolgte die weitere Inkubation über Nacht in einem Kühlraum bei 4°C.

Nach Beendigung der Kopplungsreaktion wurde die Matrix gründlich gewaschen, um alle nichtgebundenen Liganden zu entfernen. Das Waschen erfolgte in drei Zyklen mit jeweiligem Wechsel des pH-Wertes unter Verwendung Na-Acetat-Puffer (0,1M Na-Acetat, 0,5M NaCl, pH 4,0) und Tris/HCl-Puffer (0,1M Tris-HCl, 0,5M NaCl). Bei jedem Waschschrift wurden 40 ml der jeweiligen Lösung verwendet, das Säulenmaterial wurde kurz geschwenkt und zur Sedimentation 3 min bei 30 x g in der Rotofix II Typ 2900 (Hettich, Tuttlingen) zentrifugiert. Zum Schluß wurde das Material 3 x mit H₂O gewaschen und bei 4°C gelagert.

2.5.1.3.2 Durchführung der Antikörperaufreinigung von Kaninchen KN 340 und KN 341

Zur Antikörperaufreinigung der KN 340 und KN 341 wurde das Serum 1:1 mit der Solution 1 gemischt. Das verdünnte Serum wurde zu der EAH Sepharose in einem 5ml Hämolyse Reaktionsgefäß gegeben und für eine Stunde bei 37°C und dann bei 4°C über Nacht unter Schütteln inkubiert. Das Sepharose-Serum-Gemisch wurde in eine leere PolyPrep 50-Säule (Biorad, München) gegeben und der Überstand der Säule verworfen. Danach wurde die Säule mit 15ml Solution 2 und dann mit 30ml Solution 1

gespült. Die optische Kontrolle der durchlaufenden Solution 1 sollte im Anschluß bei 280nm unter 0,002 sein. Wenn der Wert nicht kleiner als 0,002 war, musste noch mal mit 20ml Solution 1 gewaschen werden.

Für die Elution wurden 6-8 Eppendorfreaktionsgefäße mit 200µl Solution 4 vorbereitet. Die Elution erfolgte unter Zugabe von 5ml Solution 3 auf die Säule. Es wurde 1ml des Eluats pro Eppendorfreaktionsgefäßes aufgefangen.

Durch anschließende Photometrie bei 280nm konnten die Fraktionen ermittelt werden, die Antikörper enthielten.

Die Regeneration der Säule erfolgte durch Zugabe von 10ml Solution 5. Dabei sollte der pH-Wert der ablaufenden Säule 7 sein. Die Aufbewahrung der Säule für weitere Versuche erfolgte in 1:10 verdünnter Solution 1 bei 4°C.

Solution 1 (1x PBS):	NaCl	137mM
	KCl	2,7mM
	Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O	8mM
	KH ₂ PO ₄	1,5mM
Solution 2:	1x PBS	
	Tween 20	0,1%
Solution 3:	Glycin	0,1M
	pH 3	
Solution 4:	Tris/HCl	1M
	pH 8	
Solution 5:	1x PBS	
	Na-Azid	0,02%

2.5.1.4 Nachweis von potentiellm γ -Tubulin im Western-Blot

Für den Nachweis von potentiellm γ -Tubulin im Western-Blot wurde ein Proteinextrakt von BY-2 Zellen auf einem Gel aufgetrennt (s. Kap. 2.5.4) und auf Western-Blot Ebene (s. Kap. 2.5.5. ff) mit den entsprechenden Antikörpern versucht das γ -Tubulin zu detektieren. Dafür wurden verschiedene Antikörperkonzentrationen des neu entwickelten polyklonalen Antikörpers (1:250; 1:2500; 1:25000), sowie das Präimmunserum als Negativkontrolle, getestet.

2.5.2 Aufschluss des Pflanzenmaterials

Das tiefgekühlte Pflanzenmaterial bzw. die Bakterien wurden in einem auf Eis und mit flüssigem Stickstoff vorgekühlten Mörser homogenisiert und anschließend in ein 1,5ml Eppendorfreaktionsgefäß überführt und mit 1ml eisgekühltem Aceton dispergiert. Daran schloss sich eine Fällung für 20min auf Eis an. Nach einer Zentrifugation des Homogenisats für 10min bei 4000rpm (Sigma 202 MK, Rotor 12043) und 4°C wurde der Überstand abgenommen, und der Wasch- bzw. Fällungsschritt wiederholt und das Pellet im Anschluß getrocknet. Die nun folgenden Schritte konnten bei RT durchgeführt werden.

Eine Fällung mit Aceton war nötig, da bei einer Extraktion ohne Aceton eine Doppelbande, die als Artefakt angesehen werden kann, auf der Western-Blot Ebene detektiert werden kann (vgl. PIRRUNG, 1999; HELLMAN, 1995 und SIPPEL, 2002).

Normalerweise wird durch die vorangehende Acetonfällung das Chlorophyll von Pflanzen aus dem Extrakt entfernt.

Das getrocknete Pellet wurde dann in Denaturierungspuffer resuspendiert. Dabei wurde bei der BY2-Zellkultur (Erhaltungskultur mit Auxin) ein Verhältnis von 400µl Denaturierungspuffer (380µl+20µl 2-Mercaptoethanol) auf 200mg Frischgewicht gewählt und bei der auxinfreien Kultur ein Verhältnis von 200µl Denaturierungspuffer (190µl+10µl 2-Mercaptoethanol) auf 200mg Frischgewicht (Sippel, 2002), da bei den Proben mit elongierten Zellen mehr Wasser eingelagert ist und der Proteingehalt sehr gering ausfallen würde.

Bei den Stadien der SR1-Pflanze und des 2. Gersteblatts wurden auf 200mg Frischgewicht 200µl Denaturierungspuffer verwendet.

Bei dem Denaturierungspuffer handelte es sich um einen Puffer nach LÄMMLI (1970). Das Homogenisat wurde kurz gevortext (Reax 2000, Heidolph, Kehlheim) und im Wasserbad bei 95°C für 5min aufgeköcht. Danach wurde für 30min bei 13000rpm (Biofuge A, Heraeus, Hanau) zentrifugiert, damit die unlöslichen Zellreste pelletieren. Der Überstand wurde in 1,5ml Eppendorfreaktionsgefäße überführt. Der Proteinextrakt konnte bei 4°C für mehrere Wochen aufbewahrt werden.

Denaturierungspuffer:	Tris	62,5mM
	SDS	2% (w/v)
	2-Mercaptoethanol	10% (v/v) separat zugeben

2.5.3 Proteinbestimmung nach Bradford

Der Proteingehalt einer Probe kann durch die von BRADFORD (1976) beschriebene Methode, unter Verwendung des Bio-Rad Protein Assays (Bio-Rad, München) gemessen werden. Das Bio-Rad Protein Assay basiert auf einer Farbreaktion von Coomassie Brilliant Blue G-250. Der Farbstoff bindet an die Aminosäurereste der Proteinketten an. Im Assay liegt er in kationischer, roter Form vor und zeigt ein Absorptionsmaximum bei 465nm. Durch die Bindung an Proteine wird seine anionische, blaue Form stabilisiert, deren Absorptionsmaximum bei 595nm liegt.

Für eine Proteinbestimmung ist ein geeignetes Puffersystem notwendig, da die Nachweisreaktion mit Coomassie Brilliant Blue G-250, durch z.B. SDS und 2-Mercaptoethanol, stark beeinflusst werden kann. Dabei liegt die kritische Konzentration für SDS bei 0,1% (w/v) und für 2-Mercaptoethanol bei 1M. Deshalb mussten die Proteinextrakte mit ddH₂O Wasser auf eine Verdünnung von 1:1000 (10µl Proteinextrakt auf 10ml ddH₂O) gebracht werden.

Für die eigentliche Messung wurden 200µl Proteinassay in einer Halbmikroküvette (Greiner Labortechnik, Nürtingen) vorgelegt und mit 800µl der verdünnten Lösungen vermischt. Nach fünf Minuten konnte bei einer Wellenlänge von 595nm im Spectrophotometer (Typ U-1100, Hitachi) die Extinktion gemessen werden. Als Nullwertabgleich wurde der Denaturierungspuffer mit einer Verdünnung von 1:1000 verwendet und genau wie die Proteinproben gemessen.

2.5.3.1 Bestimmung des Proteingehalts

Der Proteingehalt in µg/µl wurde anhand einer Eichgerade (s. Abb. 2-9) die im Rahmen der Arbeit aus einer BSA-Verdünnungsreihe erstellt wurde, ermittelt. Aus der Regressionsgeraden wurde eine Geradengleichung erstellt, durch deren Steigung der Proteingehalt berechnet werden kann.

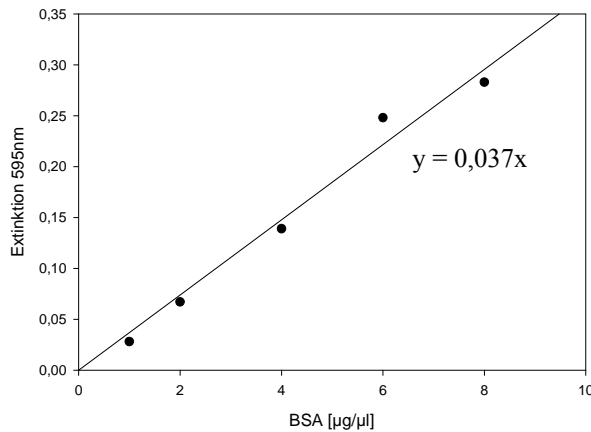


Abb. 2-9: Eichgerade zur Berechnung des Proteingehalts

$$y = mx + b$$

$$y = \text{Extinktion } E_{595}$$

$$m = \text{Steigung} = 0,037$$

$$b = \text{y-Achsenabschnitt} = 0$$

$$x = \text{Proteinkonzentration } [\mu\text{g}/\mu\text{l}]$$

$$\rightarrow x [\mu\text{g}/\mu\text{l}] = (y * 1000)/(m * 800)$$

$$1000 = \text{Verdünnungsfaktor}$$

$$800 = \text{Probeneinsatz}$$

2.5.4 SDS-Gelelektrophorese von Proteinen

Proteine binden die Seife SDS (Sodiumdodecylsulfat) zu negativ geladenen SDS-Proteinkomplexen mit konstantem Ladungs-zu Masse-Verhältnis. SDS denaturiert die Proteine, besonders nach vorheriger Reduktion mit Mercaptoethanol und unterbindet die Protein-Protein-Wechselwirkungen (Quartärstrukturen). Die SDS-Protein-Komplexe von verschiedenen Proteinen unterscheiden sich dadurch nur noch in ihrer Größe.

Zur Auftrennung wurde die diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese verwendet. Dabei handelte es sich um ein diskontinuierliches Tris/HCl-Puffersystem aus Sammel- und Trenngel, welches auf einem nach LÄMMLI (1970) modifizierten System basiert. Der Vernetzungsgrad und die damit verbundene Porenweite wird durch die Konzentration an Acryl-/Bisacrylamid und dem beiden Verhältnis der Vernetzer zueinander bestimmt. Die Polymerisation erfolgt durch die Zugabe des Radikalbildners Ammomiumpersulfat (APS) und des Katalysators N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED).

2.5.4.1 Molekulargewichtsmarker für SDS-Gelelektrophorese

Um eine Aussage über die einzelnen Proteinbanden machen zu können, wurden Markerproteine mit definiertem Molekulargewicht in der SDS-Page eingesetzt.

Bei dem hier verwendeten Marker handelte es sich um Roti-Mark Standard der Firma Carl Roth in Karlsruhe.

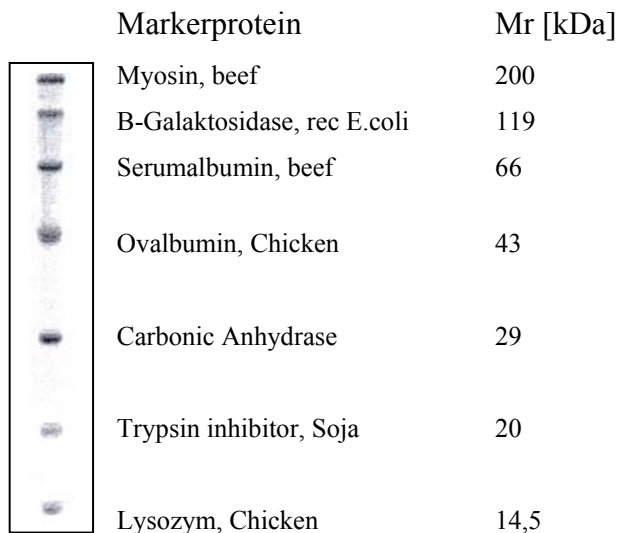


Abb. 2-10: Roti[®]-Mark Standard

2.5.4.2 Herstellung der Gele

Die Gele wurden in einer Gießvorrichtung Mini-Protean II Dual Slab Cell (Bio-Rad, München) angefertigt. Durch die Gießvorrichtung war das Gießen von zwei Gelen mit der Dimension 85mm x 73mm möglich. Entsprechend der Anleitung von Bio-Rad wurden die Kammern zusammengesetzt und in die Gießvorrichtung eingespannt. Bei den in der Arbeit verwendeten Gelen handelte es sich um 4%ige Sammel- und 10%ige Trenngele.

Für das Trenngel (s. Tab. 2-4) wurden 5ml Trenngellösung in die Sandwich-Kammer gegossen und dann mit 20%igem Ethanol überschichtet. Ethanol trennt den die Polymerisation hemmenden Luftsauerstoff vom Reaktionsgemisch. Nach 30 Minuten war das Trenngel polymerisiert und wurde mit Sammelgellösung überschichtet. In die Sammelgellösung wurde vor dem Auspolymerisieren ein Probenkamm eingesetzt.

	Trenngel 10%	Sammelgel 4%
ddH ₂ O	4,0	5,98
1,5M Tris/HCl [ml]	2,5	/
0,5M Tris/HCl [ml]	/	2,5
30% Acryl-/Bisacrylamid [ml]	3,33	1,33
10% SDS [ml]	0,1	0,1
15 Minuten im Vakuum oder 7-10 Minuten im Ultraschallbad entgasen		
10 % APS [μl]	60	80
TEMED [μl]	5	10

Tab. 2-4: Pipettierschema der Gellösungen für 2 Gele.

Stammlösungen:

Tris/HCl-Puffer:	1,5M	pH = 8,8
Tris/HCl-Puffer:	0,5M	pH = 6,8
Acryl-/Bisacrylamidlösung:	30% (w/v) (29,2% Acylamid+0,8% Bisacrylamid)	
SDS-Lösung:	10% (w/v)	
APS-Lösung:	10% (w/v)	
TEMED		

Die APS-Lösung wurde ausschließlich aus der Tiefkühlreserve verwendet, ansonsten musste sie immer frisch angesetzt werden. Um die Lösungen einen längeren Zeitraum verwenden zu können, wurden sie mit Ausnahme der SDS-Stammlösung im Kühlschrank aufbewahrt.

2.5.4.3 Probenvorbereitung und Durchführung der SDS-Gelelektrophorese

Für die SDS-Page wurden in der Regel 15μg Gesamtprotein aufgetragen. Die jeweilige Gesamtproteinmenge wurde in 1,5ml Eppendorfreaktionsgefäße pipettiert und mit Probenpuffer für die Gelelektrophorese (LÄMMLI, 1970) auf 20μl aufgefüllt. Hatte die Gesamtproteinmenge von 15μl ein Volumen von mehr als 20μl, mussten mindestens 5μl Probenpuffer zugegeben werden. Das Gesamtvolumen der Geltaschen betrug 30μl.

Der im Probenpuffer beinhaltenen Farbstoff Bromphenolblau (pH = 4,6 blau) hat in Polyacrylamidgelen eine höhere Mobilität als die Peptide. Daher wird Bromphenolblau

dem Probenpuffer als Kontrolle für den Verlauf der Gelelektrophorese zugesetzt. Bromphenolblau dient hier zur Markierung der Lauffront. Durch die Zugabe von Glycerol wird die Dichte der Proben erhöht und erleichtert den Probenauftrag und das Absinken in die Taschen des Gels.

Nach Zugabe des Probenpuffers für die SDS-PAGE wurden die Proben kurz gevortext und für 5min im Wasserbad aufgeköcht. Vor dem Auftragen auf das Gel wurden die Proben kurz bei 13000rpm (Biofuge A, Heraeus, Hanau) abzentrifugiert.

Die Gelkammern wurden in der Gelelektrophoresekammer (Mini Tube Cell, Bio-Rad, München) zusammengesetzt. Die Probenkämme wurden nach dem Einsetzen in die Kammer entfernt, die Elektrophoresekammer sowie die innere Kammer mit Laufpuffer gefüllt. Der Laufpuffer wurde als 5x konzentrierter Laufpuffer angesetzt und vor Gebrauch zu einem 1x konzentrierten Laufpuffer verdünnt.

Die elektrophoretische Auftrennung der Proteine erfolgte bei 100V (Power Pac 3000, Bio-Rad, München) für ca. 2 Stunden. Sobald die Bromphenolblau-Lauffront begann an der Anodenseite aus dem Gel hinauszulaufen, wurde die Elektrophorese beendet. Nach Abschluss der Elektrophorese wurde das Trenngel vom Sammelgel abgetrennt, vom Gelträger entfernt, und die Gelorientierung markiert.

Das Gel konnte nun entweder in der Färbe- und Fixierlösung für eine Gesamtproteinfärbung verwendet (s. Kap. 2.5.4.4 und Kap. 2.5.4.5) oder in den Transferpuffer für den Western-Blot überführt (s. Kap. 2.5.5 ff) werden.

Verwendete Puffer:

Probenpuffer:	Tris	62,5mM
	SDS	2% (w/v)
	2-Mercaptoethanol	5% (v/v)
	Glycerin	10% (v/v)
	Bromphenolblau	0,012% (w/v)
1x Laufpuffer:	Tris	25mM
	Glycin	192mM
	SDS	0,1% (w/v)
	pH = 8,3 mit HCl einstellen	

2.5.4.4 Gesamtproteinfärbung im Gel

Eine Gesamtproteinfärbung wurde zur Betrachtung des Proteinmusters, zur Beurteilung der Proteintrennung und zur Molekulargewichtsbestimmung durchgeführt. Nach Beendigung der elektrophoretischen Proteinauftrennung wurden die Polyacrylamidgele in eine Färbelösung überführt.

Durch Bestandteile wie Ethanol und Essigsäure in der Färbelösung werden die Hydrathüllen der denaturierten Proteine beeinträchtigt. Dadurch fallen die Proteine im Gel aus und werden immobilisiert. Die Färbung des Gels ist immer mit einer Fixierung verbunden. Die bei dieser Färbung verwendete Coomassiefärbung beruht auf der Bindung des Farbstoffs Coomassie Brilliant Blue G-250 an die Aminosäurereste der Proteinketten. Mit dieser Färbung lassen sich Proteinmengen in der Größenordnung von 50ng/mm^2 nachweisen.

Die Gele wurden für mindestens 1 Stunde bei Raumtemperatur auf einem Schüttler (Reax 3, Heidolph, Kehlheim) oder über Nacht stationär im Kühlschrank in der Färbelösung inkubiert. Entfärbt wurden die Gele in ddH₂O. Durch das Aufkochen in der Mikrowelle (Micro Chef FM 350, Moulinex) wurden die proteinfreien Gelbereiche entfärbt und die Proteinbanden wurden sichtbar.

Fixer/ Stain:	Ethanol (techn.)	30% (v/v)
	Essigsäure	10% (v/v)
	Coomassie Brilliant Blue	0,1% (w/v)
Entfärber:	ddH ₂ O	

2.5.4.5 Dokumentation der Gele

Nachdem die Gele entfärbt waren, wurden die Gele und zwei Cellophanfolien für 20min in einer Vortrocknerlösung inkubiert. Danach wurden die Gele luftblasenfrei zwischen den beiden Cellophanfolien auf einer Glasplatte mit Tesafilm fixiert und bei Raumtemperatur getrocknet. So konnten die Gele haltbar gemacht werden. Sie wurden danach mit dem Scanner (Primax Colorado Direct 9000) gescannt und digitalisiert. Die Bilder konnten so bei Bedarf mit dem Bildbearbeitungsprogramm Adobe Photoshop CS (Adobe Systems Incorporated, 2003) bearbeitet werden.

Vortrocknerlösung:	Methanol	25% (v/v)
	Isopropanol	10% (v/v)
	Glycerol	2% (v/v)

2.5.5 Western-Blot

Mit der Methode des Western-Blotting ist es möglich elektrophoretisch aufgetrennte Proteine aus der Polyacrylamidmatrix auf eine Membran zu übertragen. Dabei werden die Proteine unter dem Einfluss eines elektrischen Feldes transferiert.

Beim Elektroblothing werden die zuvor durch eine Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine, mittels eines senkrecht zum Gel angelegten elektrischen Feldes aus dem Polyacrylamidgel auf eine Membran transferiert. Dabei bleibt die aus der Gelelektrophorese erzielte Auftrennung der Proteine erhalten.

Im Laufe der Arbeit wurde die Methode des Semi-Dry/Elektroblothing angewandt. Die Semi-Dry Apparatur wurde erstmals 1984 von KYSE-ANDERSEN beschrieben. Sie besteht aus zwei Plattenelektroden (Anode/Kathode), zwischen die das Gel, die Filterpapiere und die Membran in bestimmter Reihenfolge platziert werden (s. Abb. 2-11).

Einen Protein-Blot kann man für weitere Untersuchungen verwenden, z.B. einen immunochemischen Nachweis mit Antikörpern.

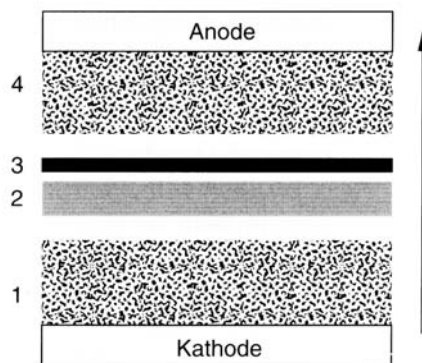


Abb. 2-11: Schematische Darstellung eines Western-Blots. (1) Kathode mit in Transferpuffer getränkten Filterpapieren; (2) Gel mit aufgetrennten Proteinen; (3) Membran (Nitrocellulose, Polyvinylidendifluorid); (4) Anode mit in Transferpuffer getränkten Filterpapieren. (Quelle: Lottspeich und Zorbas, 1998)

2.5.5.1 Proteintransfer auf die Membran

Die während dieser Arbeit verwendete Blot-Methode orientierte sich an dem von H. TOWBIN *et al.* (1979) beschriebenen Verfahren.

Bei der Blotkammer handelte es sich um eine Halbtrockenzelle mit Platin/Edelstahl-Elektroden (Trans-Blot Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell, Bio-Rad, München). Die Membran bestand aus einer Trägermatrix von Polyvinylidendifluorid (PVDF) (Immobilin P, Millipore, Eschborn). Die Proteine werden hier durch hydrophobe Wechselwirkungen gebunden.

Zur Vorbereitung des Transfers wurden 4 Stücke Filterpapier GB003 (Schleicher & Schuell, Dassel) zugeschnitten. Zwei Stücke in der Größe des Trenngels (8,5cm x 4cm) und zwei etwas größer (10cm x 6cm). Die PVDF-Membran wurde auch auf die Größe des Trenngels zugeschnitten und 1min zur Aktivierung in Methanol gelegt, da sich trockene PVDF-Membranen durch wässrige Lösungen nicht benetzen lassen. Beim aus der Gelkammer entnommenen Trenngel wurde das Sammelgel entfernt. Die Filterpapiere, die Membran und das Trenngel wurden für 30min auf einem Rotationsschüttler (Reax 2, Heidolph, Kehlheim) im Transferpuffer equilibriert.

Der Blot wurde in der Transferkammer aufgebaut, indem die zwei großen Stücke Filterpapier (10cm x 6cm), die als Innenreservoir dienten, auf die Platin-Anode der Transfereinheit überführt wurden. Auf diese wurde die Transfermembran luftblasenfrei, mit der unstrukturierten, hydrophoben Seite nach oben gelegt. Die Orientierung der Membran erfolgte gemäß der Gelmarkierung. Das Gel wurde bündig auf die Membran gelegt. Zum Abschluss wurde es mit zwei Stücken Filterpapier bedeckt (8,5cm x 4cm), die bündig mit dem Gel abschließen mussten, damit Konvektionsströme verhindert würden. Bei den einzelnen Aufbauphasen des Blots war immer darauf zu achten, dass sich keine Luftblasen zwischen den Schichten befanden. Gegebenenfalls mussten die Luftblasen mit einer Glaspipette nach außen gerollt werden.

Nach Verschiessen der Blotting-Einheit erfolgte der Proteintransfer auf die Membran bei einer konstanten Spannung von 12V (Power Supply 1000/500, Bio-Rad, München) über einen Zeitraum von 25min.

Zu langes Blotten sollte vermieden werden, da je nach Protein 10-50% die Membran ungebunden passieren können.

Transferpuffer:	Tris	48mM
	Glycin	39mM
	Methanol	20% (v/v)
	SDS	0,0375% (w/v)
	pH = 8,8-9,2 (nicht einstellen)	

TBST-Puffer:	Tris	20mM
	NaCl	137mM
	Tween 20	0,1% (w/v)
	pH = 7,6 mit HCl einstellen	

2.5.5.2 Gesamtproteinfärbung auf dem Blot

Nach einem Proteintransfer konnte man die Transferqualität überprüfen, indem man die Gele, von denen transferiert wurde, mit Coomassie anfärbt (s. Kap. 2.5.4.4). Die Bindungseffizienz der Proteine an die Transfermembran wurde getestet, indem man eine Gesamtproteinfärbung mit Ponceau-Red oder Amidoschwarz (permanent) durchführte.

2.5.5.2.1 Ponceau-Red Färbung der Membran

Nach dem Western-Blotting wurde die Membran direkt für eine Minute in die Ponceau-Red Färbelösung überführt. Anschließend wurde die Membran mehrmals mit TBST-Puffer gewaschen, bis sich der proteinfreie Hintergrund weitestgehend entfärbt hatte und die Proteinbanden klar zu erkennen waren.

Die Ponceau-Red Färbung ist zur Kontrolle des Proteintransfers sehr gut geeignet, da es sich um eine reversible Färbung handelt. Die Proteine können im Anschluss noch mit einem immunologischen Nachweisverfahren detektiert werden.

Ponceau-Red Färbelösung:	Ponceau-S-Red	0,4% (w/v)
	Trichloressigsäure	3% (v/v)

2.5.5.2.1 Amidoschwarz-Färbung der Membran

Die Amidoschwarz-Färbung wurde nach SANCHEZ *et al.* (1992) durchgeführt. Dazu wurde die Membran nach dem immunochemischen Proteinnachweis für eine Minute in

der Amidoschwarz-Färbelösung inkubiert und anschließend mit ddH₂O so oft gewaschen, bis der proteinfreie Membranhintergrund entfärbt und die Proteinbanden sichtbar waren. Die Membran wurde danach bei Raumtemperatur getrocknet, die Färbung war permanent.

Amidoschwarz-Färbelösung:	Amidoschwarz	0,5% (w/v)
	Isopropanol	25% (v/v)
	Essigsäure	10% (v/v)

2.5.6 Immunochemischer Proteinnachweis

Der immunochemische Nachweis wird über die spezifische Bindung der auf der Membran fixierten Proteine mit monoklonalen oder polyklonalen Antikörpern geführt. Die fixierten Proteine fungieren hier als Antigene welche von den Antikörpern erkannt werden. Die Qualität des Nachweises hängt von der Beschaffenheit und der Verdünnung der eingesetzten Antikörper und deren Applikationszeit ab.

Verwendete Antikörper und eingesetzte Verdünnungen:

Anti- α -Tubulin Antikörper:	Klon DM1A (Cedarline Laboratories Limited, Hornby, Canada); monoklonal aus der Maus Verdünnung 1:250
Anti-Actin Antikörper:	Klon 1A, MP Biomedicals (Heidelberg); monoklonal aus der Maus Verdünnung 1:750
Anti-y-B-Peptid (γ -Tubulin):	KN 340, KN 340 und KN341 (physiologische Chemie, Mainz); polyklonal aus dem Kaninchen Verdünnung 1:250
Anti-pfl. JOSHI (γ -Tubulin):	KN714 und KN746 (Covalab, Lyon); polyklonal aus dem Kaninchen Verdünnung 1:250

Die Antikörper bzw. das Antiserum wurden in einer Verdünnung von 1:10 mit 0,1%igem BSA-PBS bei -20°C gelagert.

Unter Berücksichtigung der Vorverdünnung wurden die Antikörper vor dem Gebrauch mit einem TBST-Milchpulver (MP)-Puffer auf die jeweilige Arbeitsverdünnung gebracht. Die Antikörperlösung konnte zum mehrmaligen Verwenden bei 4°C einige Tage aufbewahrt werden.

BSA-PBS:	NaCl	137mM
	KCl	2,7mM
	Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O	8mM
	KH ₂ PO ₄	1,5mM
	BSA	0,1%
TBST-Puffer mit Milchpulver:	Tris	20mM
	NaCl	137mM
	Tween 20	0,1% (w/v)
	Milchpulver	5% (w/v)
	pH = 7,6 mit HCl einstellen	

Bei Trocknung der Membran nach dem Western-Blot, wurde sie zum weiteren Vorgehen eine Minute mit Methanol aktiviert und danach zweimal 5min in TBST-Puffer gewaschen werden.

Nach dem Waschen der PVDF-Membran mit TBST-Puffer wurden die freien Bindungsstellen auf der Membran für die immunochemische Detektion zunächst blockiert, um unspezifische Bindungen des Antikörpers an die Membran zu verhindern. Deshalb erfolgte die Blockierung mit TBST-Milchpulver (MP)-Puffer entweder durch eine einstündige Inkubation bei Raumtemperatur auf einem Rotationsschüttler (Reax 2, Heidolph, Kehlheim) oder im Kühlschrank bei 4°C über Nacht.

Nach dem Blockieren mit TBST-MP-Puffer wurde die Membran zweimal eine Minute, einmal 15min und einmal 5min in TBST-Puffer (ohne Milchpulver) gewaschen. Anschließend wurde mit dem Primärantikörper inkubiert. Bei der Inkubation der Antikörper musste darauf geachtet werden, dass die Membran mit der proteinbindenden unstrukturierten Seite nach oben gelagert wurde. Dadurch wurde eine optimale Zugänglichkeit der Proteine für die Antikörperlösung ermöglicht. Die Inkubation der Antikörper erfolgte bei 37°C in einem Brutschrank (Heraeus, Hanau) auf einem Rotationsschüttler (Reax 2, Heidolph, Kehlheim). Um die Verdunstung der

Antikörperlösung zu vermeiden, wurden die Inkubationsgefäße mit einer Glasplatte abgedeckt.

Nach der einstündigen Inkubation des Primärantikörpers wurde die Antikörperlösung dekantiert und die Membran wie oben beschrieben mit TBST-Puffer ohne Milchpulver erneut gewaschen.

2.5.7 ECL-Detektionssystem

Die von den Primärantikörpern erkannten Proteine (Antigene) werden indirekt über einen Horseradish-Peroxidase (HRP)-gekoppelten Sekundärantikörper nachgewiesen. Bei der verstärkten Chemilumineszenz (ECL) handelt es sich um eine sehr sensitive Methode zum Nachweis geringer Proteinmengen. Das an den Sekundärantikörper gekoppelte Enzym HRP katalysiert im alkalischen Milieu und in Gegenwart von H_2O_2 die Oxidation von Luminol. Bei Luminol handelt es sich um ein zyklisches Diacylhydrazid. Durch die Oxidation wird Luminol in einen angeregten Zustand versetzt und dessen Rückkehr in den Grundzustand erfolgt unter Freisetzung von Lichtemission. Diese Lichtemission bei einer Wellenlänge von 428nm kann mit einem Blaulicht sensitivem Film detektiert werden.

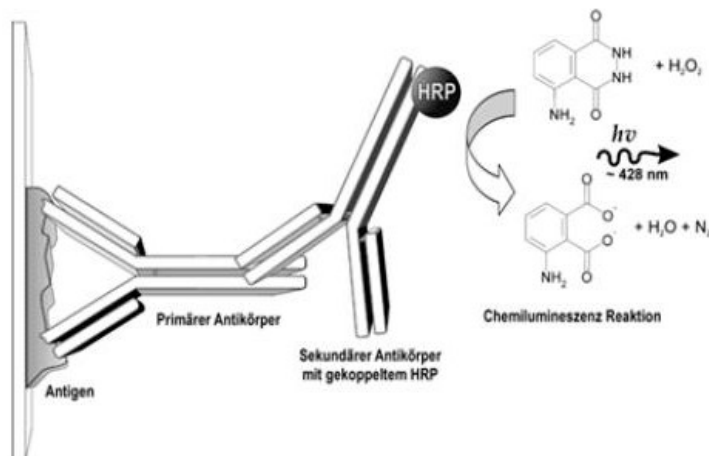


Abb. 2-12: Antikörperbindung und Chemilumineszenz-Reaktion. (in Anlehnung an Amersham Biosciences)

Die Durchführung der ECL erfolgte nach der Vorschrift der Firma Amersham. Der zweite Antikörper wurde, wie in Kap. 2.5.6 für den ersten Antikörper beschrieben, mit einer Verdünnung von 1:2500 in TBST-MP-Puffer für eine Stunde appliziert.

Zur Verwendung kamen folgende Sekundärantikörper:

HRP-sheep anti-Mouse IgG (Amersham Biosciences, Freiburg)

HRP-sheep anti-Rabbit IgG (Amersham Biosciences, Freiburg)

Anschließend wurde die Antikörperlösung dekantiert und erneut die Waschschrirte wie in Kap. 2.5.6 durchgeführt.

Im Anschluss wurden alle weiteren Schritte in der Dunkelkammer durchgeführt. Die beiden Komponenten des ECL-Kits (Amersham Buchler, Braunschweig) wurden zu gleichen Volumenanteilen gemischt. Dabei war darauf zu achten, dass ein Endvolumen von 0,125ml/cm² Membran vorhanden war. Anschließend wurde die Membran in einer aus Klarsichtfolie bestehenden Tasche platziert und die ECL-Lösung zugegeben. Nach einer einminütigen Inkubation wurde die Lösung abgegossen und die Membran luftblasenfrei in die Tasche eingeschweißt. Die eingeschweißte Membran wurde anschließend mit der Proteinseite nach oben in einer Filmkassette (Cronex 18x24cm) platziert.

Die nun folgenden Arbeiten mussten bei Rotlicht durchgeführt werden. Ein Autoradiographiefilm (Cronex 5, Agfa-Geveart AG, Leverkusen) wurde aus der Packung entnommen, zugeschnitten, der Membran entsprechend markiert und auf die trockene, saubere Folientasche gelegt. Die Filmkassette wurde verschlossen. Nach der Belichtung wurde der Film für 5min entwickelt (G150, Agfa-Gevaert AG Leverkusen), kurz im Wasserbad gewaschen und für ca. 1min in einem Fixierbad (G350, Agfa-Gevaert AG Leverkusen) fixiert. Anschließend wurde der Film im Wasserbad gewaschen und mit ddH₂O gespült, um Wasserränder zu vermeiden. Zur Anpassung der Signalintensität wurden Belichtungsreihen, mit ansteigender Belichtungszeit der einzelnen Filme durchgeführt.

2.6 Computergestützte Sequenzanalysen

- Aminosäuresequenzsuche in der Genbank:
SearchGenbank, National Center for Biotechnology Information
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

National Center for Biotechnology Information, USA
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
- Sequenzvergleiche und Ableitung von Aminosäuresequenzen:
GeneDoc Multiple Sequence Alignment Editor & Shading Utility
Version 2.6.002
<http://www.pcs.edu/biomed/genedoc>

ClustalX 1.81
<http://inn-prot.weizmann.ac.il/software/ClustalX.html>
- Globale Sequenzvergleiche:
National Center for Biotechnology Information, USA
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>

3 Ergebnisse

3.1 Auswahl des Pflanzenmaterials

3.1.1 Zellsuspensionskultur (BY-2) aus *Nicotiana tabacum*

3.1.1.1 Wachstumsverhalten der Zellsuspensionskultur (BY-2)

Der Zustand der Zellen vom Zeitraum von der Zellteilung bis zum Absterben der Zellen war für die Untersuchungen des γ -Tubulins und des α -Tubulins im Rahmen dieser Arbeit wesentlich. Es sollten Aussagen darüber getroffen werden, wie sich die Tubuline während der Zellteilung und der Zellstreckung bis zum Absterben der Zellen verhalten. Für die Versuche wurde die BY-2 Zelllinie verwendet, die sich durch eine hohe Vermehrungsrate und Homogenität auszeichnet. Im Rahmen der Staatsexamensarbeit von C. SIPPEL (2002) wurden die einzelnen Stadien dieser Zelllinie charakterisiert. Dafür wurde der mitotische Index über einen Zeitraum von 5 Tagen und die Vitalität über einen Zeitraum von 24 Tagen gemessen (s. Abb. 3-1 und Abb. 3-2). Daher war der Zeitpunkt bekannt, zudem sich die Zellen in der Zellteilung und in der Elongationsphase befinden, und das Absterben der elongierten Zellen einsetzt. Es wurde mit einem biochemischen Vitalitätstest festgestellt, dass bei den Zellen der auxinfreien Kultur mit einem Überimpftiter von 1ml ab dem dritten Tag keine Zellteilung mehr stattfindet und nach dem 10. Tag in einen verstärkten Absterbeprozess übergehen. Daraus resultierte die Wahl der Stadien 0, 3, 6, 9, 12 (s. Kap. 2.2.1.1).

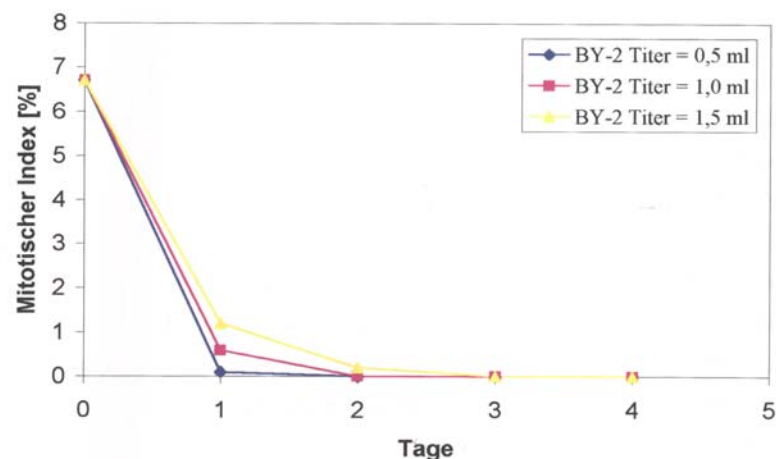


Abb. 3-1: Mitotischer Index der hormonsfreien Kultur mit Überimpftiter von 0,5ml, 1ml und 1,5ml. Es wurden jeweils 1000 Zellen ausgezählt. (Quelle: SIPPEL, 2002)

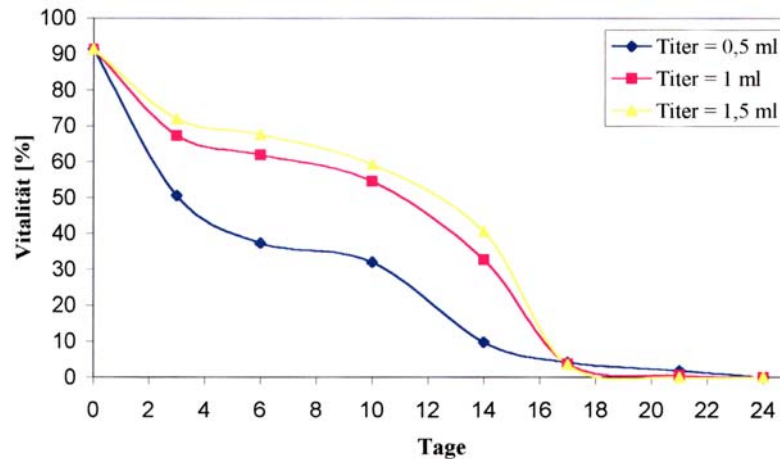


Abb. 3-2: Vitalität der hormongefreien BY-2 Kultur mit Überimpftiter von 0,5ml, 1ml und 1,5ml. Es wurden jeweils 1000 Zellen ausgezählt. (Quelle: SIPPEL, 2002)

Die einzelnen Stadien der Zellsuspensionskultur der BY-2 Zelllinie wurden vor der gRNA- und Proteinextraktion zunächst mikroskopisch untersucht, um den reproduzierenden Zustand der Zellen zu erkennen. Als Orientierung über den Sollzustand der zu untersuchenden Stadien diente die Arbeit von SIPPEL (2002), bei der die einzelnen Stadien der BY-2 Zelllinie charakterisiert wurden (s. Abb. 3-3 und Abb. 3-4).

Die Erhaltungskultur bestand nach 3 Tagen hauptsächlich aus abgerundeten und kleinen Zellen in der Größe von etwa 10-20 μ m (s. Abb. 3-3). In der Zellsuspensionskultur waren die Zellen im Gegensatz zu Bakterienkulturen in Zellaggregaten zusammengelagert. Erklären lässt sich diese Aggregatbildung dadurch, dass sich die Zellen zum einen nach der Zellteilung nicht ablösen. Zum anderen könnte es aber auch zu einer sekundären Anlagerung kommen, wenn die Zellen nach der Zellteilung wieder in Kontakt treten, da die äußere Zellwand klebrige Bestandteile enthält.

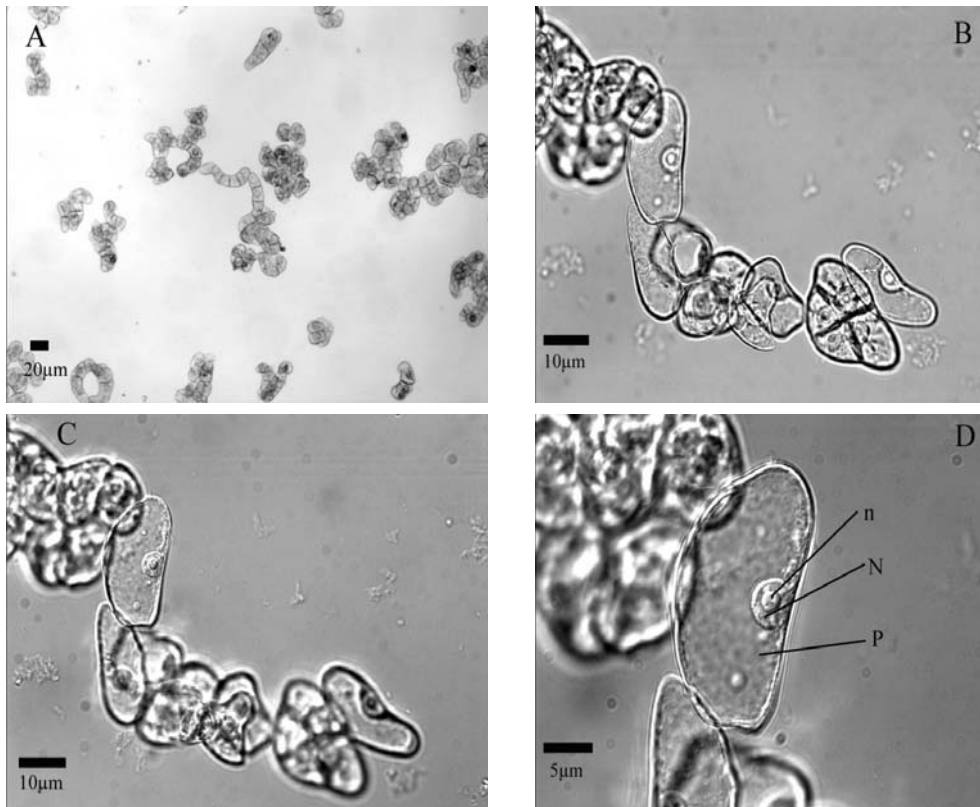


Abb. 3-3: Übersichtsaufnahmen der auxinhaltigen BY-2 Kultur (SCHLAG, 2002). Übersicht der Zellaggregate im Hellfeld-Durchlicht an Tag 3 (A, B); Hellfeld-DIC-Aufnahme (C, D); Detailaufnahme einer Einzelzelle (D) (n = Nucleolus, N = Nucleus, P =

Drei Tage nach Überimpfen der Erhaltungskultur in frisches Kulturmedium, wurden aus diesem Medium jeweils 1ml in auxinfreies Medium überführt. Dadurch wurden die Zellen dazu angeregt, aus dem Teilungswachstum in das Streckungswachstum überzugehen.

Bereits bei drei Tage alten auxinfreien Kulturen trat eine Elongation der Zellen ein (s. Abb. 3-4 A, B, C). Die Zellen lagen alle als deutlich sichtbare Einzelzellen vor. Neben den elongierten Zellen sah man auch abgerundete und kleine Zellen wie in der auxinhaltigen Kultur, sowie auch schon abgestorbene Zellen. Alle weiteren Stadien (6, 9, 12) wiesen weitere Zellstreckung auf. Ab Tag 9 nahm die Zahl der toten Zellen (s. Abb. 3-4 E, F) zu. Man erkennt die abgestorbenen Zellen am Ablösen der Plasmamembran von der Zellwand und am Zusammenziehen des Plasmaschlauchs. Ein weiteres Merkmal sind aufgeplatzte Zellen, die ihren Zellinhalt in das Medium abgeben. Die hier erzielten visuellen Ergebnisse stimmten mit den Ergebnissen aus dem Vitalitätstest, sowie dem mitotischen Index aus der Arbeit von Sippel (2002) überein.

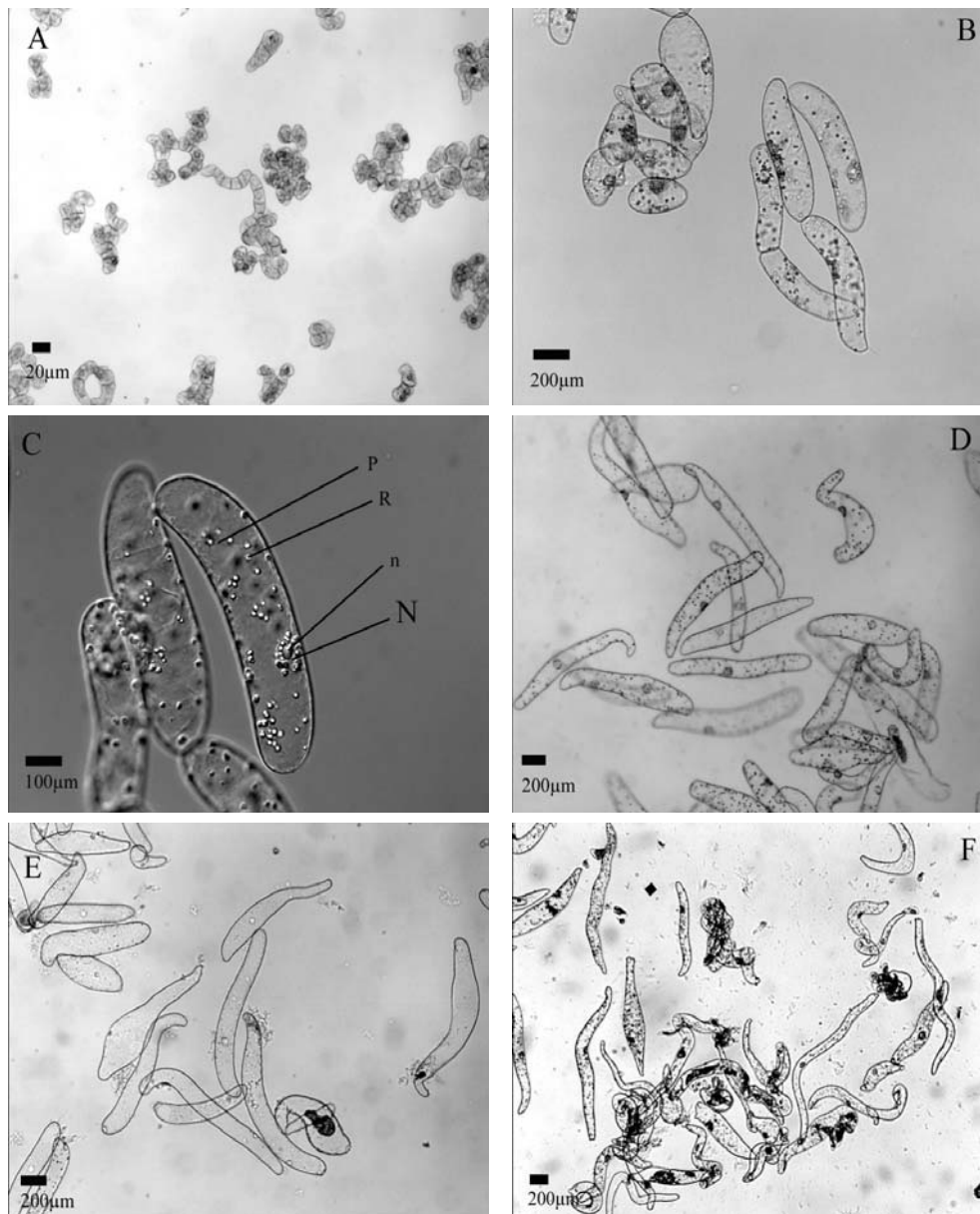


Abb. 3-4: Übersichtsaufnahmen der auxinfreien BY-2 Kultur (SCHLAG, 2002). Zellaggregate und vereinzelte elongierte Zellen am Tag 3 (A, B); elongierte Zellen an Tag 6 (D); elongierte und abgestorbene Zellen an Tag 9 (E) und Tag 12 (F); Detailaufnahme einer Einzelzelle an Tag 3 als DIC-Aufnahme (D) (n = Nucleolus, N = Nucleus, P = Plasmastrang, R = Reservestoff).

3.1.2 *Nicotiana tabacum* (SR1)

3.1.2.1 Wachstumsverhalten der Pflanzen

Beim Einsatz der Zellkultur handelte es sich um ein vereinfachtes System. Daher wurden die Versuche zusätzlich mit einem komplexen Pflanzengewebe durchgeführt, um eine Aussage zu treffen ob das Modellsystem auf komplexe Gewebe zu übertragen ist.

Daher wurden für die Versuche Laubblätter mit unterschiedlichen Alter und Entwicklungszustand von einer *Nicotiana tabacum*-Pflanze (SR1-Pflanze) verwendet. Um die geeigneten Blattstadien herauszudeuten, wurde das Wachstumsverhalten in der Diplomarbeit von HERMES (2007) exemplarisch an vier Pflanzen über einen Zeitraum von 90 Tagen beobachtet. Dabei wurden wichtige Blattalter definiert, die bestimmten Entwicklungsstadien im Pflanzen- und Blattwachstum zuzuordnen waren.

Die Pflanzen wurden 42 Tage nach Aussaat in sterilen Petrischalen und Einmachgläsern in unsteriles Tonsubstrat eingesetzt. Zu diesem Zeitpunkt entsprach der Habitus der Pflanze einem 6-7 Blattstadium, ohne die Berücksichtigung der Kotyledonen. Die Pflanzen wurden dabei in größtmöglichen Abstand zueinander platziert, damit sie sich nicht gegenseitig am Wachstum behindern konnten und zur vollen Entfaltung kamen. Nach etwa 58 Tagen wurde das 11. Blatt erstmals makroskopisch sichtbar. Zu diesem Zeitpunkt waren die Pflanzen ca. 7-8 cm groß und befanden sich im Streckungswachstum. Nach etwa 70-80 Tagen nach Aussaat wurden die Blütenknospen makroskopisch sichtbar. Das 11. Blatt war zu diesem Zeitpunkt 12-22 Tage alt. Die Pflanzen waren jetzt im 20-Blattstadium. Die bis zu diesem Zeitpunkt angelegten Blätter waren von ähnlicher Wuchsform, und wiesen einen rundlich-ovalen Umriss auf, wobei die oberen Blätter etwas schmaler als die unteren Blätter waren. Vom 1. bis zum 9. Blatt nahm die endgültige Blattgröße stetig zu. Die Blätter 10 bis 13 wiesen etwa die gleiche endgültige Größe auf. Ab Blatt 14 nahm die Größe der ausgewachsenen Blätter wieder ab. Mit Sichtbarwerden der Blütenknospen begann die Streckung der Infloreszenzachse. Nach 91-97 Tagen (Blattalter 11. Blatt: 33-39 Tage) begannen die Kelchblätter der Blüten sich zu öffnen. Zu diesem Zeitpunkt wurden auch die Knospen der zukünftigen Seitentriebe sichtbar. Die Pflanzen waren 50-60cm groß und das Streckungswachstum der gesamten Pflanze ließ nach. Die erste Blüte entwickelte sich etwa nach 95-100 Tagen (11. Blatt 37-42 Tage). Zur gleichen Zeit war die Streckung der Seitentriebe zu beobachten. An diesen bildeten sich weitere Blätter, die aber kleiner als die Blätter des Haupttriebes waren und eine schmal-lanzettliche Form hatten. Zehn Tage nach Beginn der Blüte setzte die Fruchtbildung an den Pflanzen ein (105-110 Tage nach Aussaat; 11. Blatt 53-58 Tage). In diesem Zeitraum begannen auch die ersten Blüten der Seitentriebe zu blühen. Die Pflanzen bildeten im weiteren Wachstumsverlauf insgesamt 3-4 Seitentriebe aus, die aber zu sehr unterschiedlichen Zeitpunkten mit dem Wachstum der Blüte begannen.

Nach Beginn des Fruchtens, etwa 112 Tage nach Aussaat der Pflanzen (11. Blatt 60 Tage) zeigten die Pflanzen die ersten Anzeichen einer Seneszenz. Die kräftig grüne Farbe der Blätter verblasste zu einem gelblich grün. Der Turgor der Blätter ließ deutlich nach. Fünf Tage später (117 Tagen nach Aussaat; 11. Blatt 65 Tage) traten vom 1.-8. Blatt, die alle von den darüberliegenden Blättern beschattet wurden, gelbe Flecken auf der gesamten Blattspreite auf. Die jüngeren oberen Blätter verloren ihre Turgeszenz. Die Spannkraft der Blätter ließ deutlich nach, so dass sie flach an der Pflanze herabhingen. Nach 148 Tagen (11. Blatt 90 Tage) nach Aussaat der Pflanzen wurden die Beobachtungen abgebrochen.

3.1.2.2 Wachstumsverhalten 11. Blatt

Im Laufe der Blattfolge variieren die ersten acht bis neun Blätter in ihrer Gestalt und Ausbreitung, wogegen sich die Blätter 10-12 in Morphologie und Wachstumsverhalten entsprechen. Akropetal folgende Blätter bleiben mit ihrer endgültigen Größe wieder hinter den Blättern 10-12 zurück (HOLZHÄUSER, 1992). Daher kamen die Blätter 10-12 grundsätzlich als Blattmaterial für die Versuche in Frage. Ein zuverlässiges Abzählen der Blätter war aufgrund der oft sehr unterschiedlichen Pflanzen aber nicht immer einfach. Daher wurde für die Versuche lediglich das 11. Blatt jeder Pflanze verwendet.

Länge und Breite des elften Blattes wurden bis zur Stagnation des Wachstums 3x wöchentlich gemessen (HERMES, 2007). Danach erfolgte die Messung nur noch 1x wöchentlich bis zu einem Blattalter von 90 Tagen. Die Blattfläche wurde erstmals bei einem Blattalter von 6 Tagen gemessen. Aufgrund der geringen Größe des jungen Blattes war eine Bestimmung zu einem früheren Zeitpunkt nicht möglich. Die Fläche wurde über den gesamten Beobachtungszeitraum 1x wöchentlich bestimmt. Die Blattstiele wurden bei den Messungen nicht berücksichtigt.

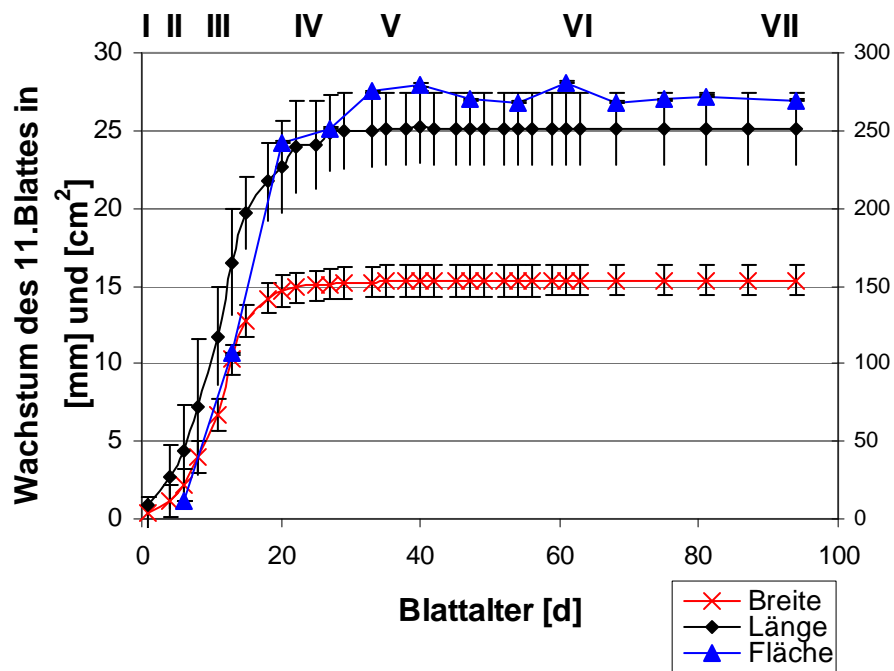


Abb. 3-5: Wachstumskinetik des elften Blattes: Länge [mm], Breite [mm] und Fläche [cm²] in Bezug zu den ausgewählten Erntestadien (I-VII); I und II: meristematisch aktives Gewebe; III: Blatt im Streckungswachstum; IV: Blatt zeigt kaum noch Wachstum, beginnende Streckung der Infloreszenzachse; V: Blatt voll expandiert, Beginn der Blüte; VI: Beginn des Fruchtens und erste Seneszenzanzeichen; VII: Pflanze und 11. Blatt mit starker Seneszenz (verändert nach HERMES, 2007)

Die nachfolgende Skizze (s. Abb. 3-6) und Tabelle zeigt noch einmal die aufgrund des Wachstumsverhaltens untersuchten Blattalter der einzelnen Stadien in Relation zum Habitus und Entwicklungszustand der kompletten Pflanze. Die Angaben zur Teilungs- und meristematischen Aktivität der Blatzellen orientieren sich an der Arbeit von PINERA ALVAREZ (2006).

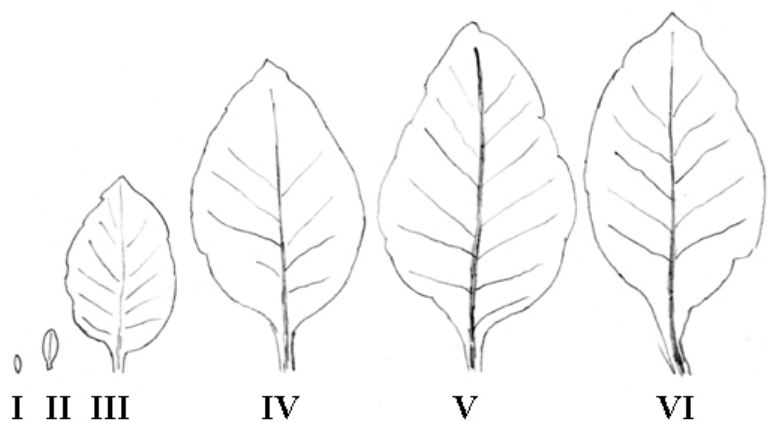


Abb. 3-6: Vergleich der untersuchten Blätter der Entwicklungsstadien I bis VI (nicht dargestellt Stadium VII; senescentes Blatt). Zur näheren Charakterisierung der Stadien siehe Abb. 3-7. Der in Stadium IV eingezeichnete Balken entspricht 1cm.

Stadium und Blattalter	Blattwachstum	Entwicklungsstadium Pflanze	Länge [cm]	Breite [cm]	Pflanzenalter [d]
I: 1 Tag	meristematisches Gewebe, Sprossspitze	hauptsächlich Blattbildung	< 1	< 1	59
II: 4 Tage	meristematisch, aber Übergang zum Streckungswachstum	beginnende Streckung der Sprossachse	~ 6	~ 1	62
III: 10 Tage	Gewebe starkes Streckungswachstum	Anlage der Blütenknospen (noch nicht sichtbar)	~ 10	~7	68
IV: 23 Tage	kaum noch Streckungswachstum, Ende des Blattwachstums	beginnende Streckung der Infloreszenzachse	~ 24	~ 14	81
V: 35 Tage	vollständig expandiertes Blattgewebe	Blühbeginn	~ 25	~ 15	93
VI: 60 Tage		fruchtende Pflanzen, erste Anzeichen der Seneszenz	~ 25	~ 15	118
VII: 90 Tage	seneszenten Blatt	Pflanze stark seneszent	~ 25	~ 15	148

Tabelle 3-1: Entwicklungsstadien in Abhängigkeit der Entwicklung von Pflanze und Blatt

3.1.3 Wintergerste *Hordeum vulgare*

3.1.3.1 Zellulärer Entwicklungsgradient im Gersteblatt

Als ein Testsystem für den neu entwickelten polyklonalen γ -Tubulin-Antikörper diente die Untersuchung am Entwicklungsgradienten im Gersteblatt. Es war davon auszugehen dass γ -Tubulin nur in den Bereichen noch nachzuweisen ist, wo auch noch α -Tubulin aufgrund des Vorhandenseins von Mikrotubuli zu detektieren ist. Sollte γ -Tubulin ohne dem Nachweis von α -Tubulin zu detektieren sein, könnte man die Spezifität des neuen Antikörpers für γ -Tubulin in Frage stellen.

Für die Versuche mit der Wintergerste *Hordeum vulgare* wurde das zweite Blatt präpariert. Dabei wurde das 10-12cm lange Blatt in 2cm lange Blattstücke vom Samenkorn beginnend unterteilt:

- Stadium I: 0-2cm
- Stadium II: 2-4cm
- Stadium III: 4-6cm
- Stadium IV: 6-8cm
- Stadium V: 8-10cm
- Stadium VI: 10-12cm

Im besonders gut standardisierten zweiten Blatt (HELLMANN, 1995) mit einer Länge von 10-12cm sind, in einem Bereich von 5mm von der Blattbasis entfernt, kleine mitotische, nahezu isodiametrische Mesephyllzellen anzutreffen.

Postmitotische und in Streckungswachstum übergehende Zellen mit transversalen kortikalen Mikrotubuli-Strängen sind in fünf bis zehn Millimeter Entfernung von der Blattbasis vorhanden. In diesem Abschnitt findet eine Umorientierung der Mikrotubuli-Bündel zu immer noch transversalen, aber ringförmig konzentrierten MT-Bändern statt. Schon in den Blattabschnitten ab 17mm Entfernung zur Blattbasis sind distinkte MT-Bänder in Auflösung begriffen, und Zellwandverstärkungen sind an den Stellen deutlich nachweisbar. Zellen aus Blattregionen in 30 bis 35mm Entfernung von der Blattbasis haben ein kortikales Mikrotubuli-Netzwerk zerstreuter Mikrotubuli-Anordnung, es erfolgt eine gleichmäßige Deposition von Zellwandmaterial. Zellen aus Abschnitten zur Blattspitze hin, zeigen eine nahezu vollständige Reduktion des kortikalen MT-Netzwerkes.

3.2 Molekularbiologischer Teil

3.2.1 Nukleinsäureextraktionen

Für die vorliegende Arbeit wurden RNA-Extraktionen der jeweiligen Stadien (0, 3, 6, 9, 12) der Zellsuspensionskultur (BY-2) durchgeführt (s. Kap. 3.1.1.1), um den Gehalt an γ -Tubulin-mRNA in den zu untersuchenden Stadien zu bestimmen. Bei den plasmareichen, teilungsaktiven Zellen der auxinhaltigen Kulturen genügten 200mg Frischmasse. Bei den elongierten Zellen der auxinfreien Kulturen wurden 400mg Frischmasse eingesetzt, da hier der Anteil an Vakuolen sehr viel höher ist, als bei sich teilenden Zellen.

Bei der verwendeten Tabakpflanze wurden RNA-Extraktionen von in Kapitel 3.1.2.2 aufgeführten Stadien des 11. Blattes durchgeführt. Die verwendeten Stadien wurden so ausgewählt, dass sie wichtige Entwicklungsstadien des Blattes darstellten. Beim Stadium I handelte es sich um meristematisches Gewebe, während sich in Stadium II die Zellen schon im Übergang zum Streckungswachstum befanden, in dem nur noch wenige Zellteilungen stattfanden. Stadium III wurde aus Gewebe mit starkem Streckungswachstum geerntet. Bei Stadium IV handelte es sich um Blattmaterial, dass

gegen Ende des Streckungswachstums geerntet wurde, während in Stadium V das Blatt schon voll expandiert war. Im späteren Verlauf wurden noch zwei weitere Altersstadien extrahiert. Bei den Stadien handelte es sich um voll expandiertes Blattmaterial VI (60Tage) und VII (90 Tage). Bei Stadium VI setzten die Seneszenzerscheinungen ein, dagegen zeigte Stadium VII starke Seneszenzerscheinungen.

3.2.1.1 Resultate der gRNA-Extraktionen und Ansetzen der RT

Um später einen Vergleich der PCR-Amplifikate von α -Tubulin und γ -Tubulin und Actin in den zu untersuchenden Stadien durchführen zu können, musste gewährleistet sein, dass von allen Stadien die gleiche Menge gRNA eingesetzt wurde. Dafür wurden der Gehalt an gRNA photometrisch bestimmt. Anhand der erhaltenen Werte für die einzelnen Extraktionen von Zellkultur (BY-2) und Tabakpflanze (SR1) (s. Anhang) wurde der gRNA-Wert von 0,68 μ g wurde zum Einsatz in die RT festgelegt.

Von jedem Stadium wurden mehrere RT-Ansätze durchgeführt, da die cDNA weitaus stabiler als die gRNA aufzubewahren war. Die cDNA wurde bei -20°C gelagert.

3.2.1.2 Gelelektrophorese der RNA

Über eine gelelektrophoretische Auftrennung der gRNA-Extraktionen wurde die Integrität der RNA überprüft um eine mögliche Kontamination mit Ribonukleasen auszuschließen. Ein Indiz für die saubere Präparation waren zwei klar erkennbare Banden der ribosomalen RNA (rRNA). Bei einer Kontamination durch Ribonukleasen wären aufgrund des erfolgten Abbaus diese beiden Banden unscharf bis gar nicht auftreten, da die Einwirkung von Ribonukleasen zu einem sehr schnellen Abbau der RNA führt.

Alle extrahierten Ribonukleinsäuren wurden vor weiterführenden Versuchen (z.B. RT-PCR) einer Kontrolle über eine Gelelektrophorese unterzogen.

Bei den gRNA-Extraktionen der Zellkultur (BY-2) und der Tabakpflanze (SR1) waren bei allen Stadien relativ scharfe rRNA-Banden zu erkennen, daher war gewährleistet, dass die RNA intakt war (s. Abb. 3-8).

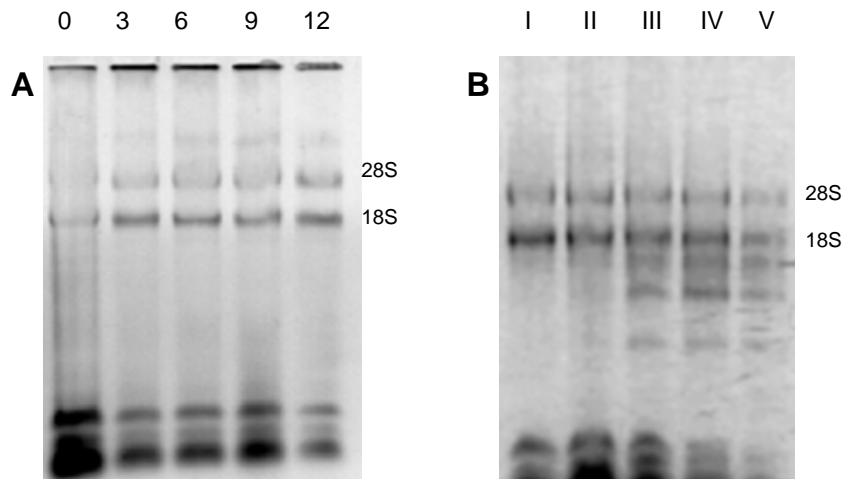


Abb. 3-8: Gelelektrophorese von RNA-Extraktionen; links: Zellkultur (BY-2), Stadien 0, 3, 6, 9, 12; rechts: Tabakpflanze (SR1), Stadien I, II, III, IV, V, VI. Aufgetragen jeweils 16 μ l, aufgetrennt in einem 1,5%igem Agarosegel, angefärbt mit Ethidiumbromid (EthBr)

3.2.2 Aufnahme einer Sättigungskurve für die PCR von Actin, α - und γ -Tubulin

Bei der PCR handelt es sich um ein theoretisch exponentielles Vermehrungssystem. Für eine Quantifizierung der Produkte musste daher gewährleistet sein, dass die PCR im linearen Bereich verläuft. Aus diesem Grund wurden Sättigungskurven mit jeweils den Amplifikaten von Actin, α - und γ -Tubulin mit cDNA der jüngsten und ältesten Stadien (BY-2 Stadium 0 und 12; SR1-Pflanze I und V) durchgeführt, um den linearen Bereich der PCR zu definieren. Bei diesen beiden Stadien war der größte sowie der geringste Anteil von α - und γ -Tubulin zu erwarten. Bei Actin war ein gleichstarkes Signal zu erwarten, da Actin in allen Zellen gleichmäßig vorhanden ist. Aus diesem Grund werden nur die Sättigungskurven der jungen Stadien dargestellt, da sich genau diese Erwartung einstellte.

Für die Zellkultur (BY-2) zeigten alle Sättigungskurven ab einer Anzahl von 26 Zyklen deutliche Signale für α -Tubulin (326bp), Actin (255bp) und γ -Tubulin (129bp). Ab einer Zyklenzahl von 34 (bei γ -Tubulin) bzw. bei einer Zyklenzahl von 38 (Actin und α -Tubulin) war die Sättigung der PCR-Reaktion erreicht (s. Abb. 3-9).

Daher wurde für den späteren Stadienvergleich eine Anzahl von 30 Zyklen festgelegt.

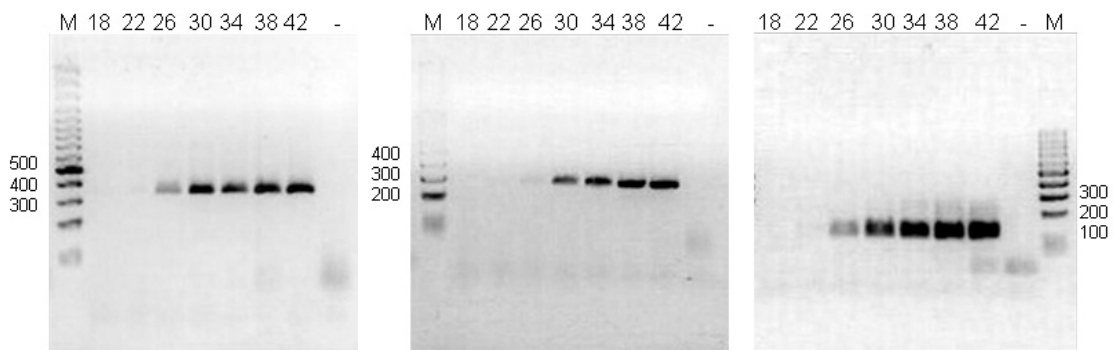


Abb. 3-9: PCR-Sättigungskurven mit der BY-2 Zellkultur Stadium 0 von α -Tubulin, Actin und γ -Tubulin. Links: α -Tubulin; Mitte: Actin; Rechts: γ -Tubulin. Jeweils die Produkte von 18 bis 42 Zyklen, alle 4 Zyklen und Negativkontrolle (-). Marker 100bpLadder (M); jeweils 8 μ l der PCR-Ansätze aufgetragen; aufgetrennt in einem 1,5%igem Agarosegel; angefärbt mit Ethidiumbromid.

Bei den Sättigungskurven mit der mit den Blättern der Tabakpflanze (SR1) war bei den Sättigungskurven für α -Tubulin und γ -Tubulin ein Amplifikat bei 25 Zyklen, hingegen bei Actin das erste Signal bei 30 Zyklen zu erkennen (s. Abb. 3-10 mitte). Bei γ -Tubulin (Abb. 3-10 unten) war ab 45 Zyklen keine Steigerung der Bandenintensität mehr erkennbar. Hier stellte sich die Sättigung ein. α -Tubulin (Abb. 3-10 oben) zeigte ab 40 Zyklen keine Intensitätszunahme mehr, auch hier war mit 40 Zyklen die Sättigung erreicht. Die Sättigungskurve für Actin zeigte in den Zyklen 35, 40 und 45 eine geringe Intensitätszunahme, die Sättigung schien erreicht.

Aufgrund der Ergebnisse der Sättigungskurven wurden die Zyklenzahlen für den Stadienvergleich für γ -Tubulin und Actin auf 30 Zyklen festgesetzt, die Zyklenzahl für α -Tubulin auf 35 Zyklen.

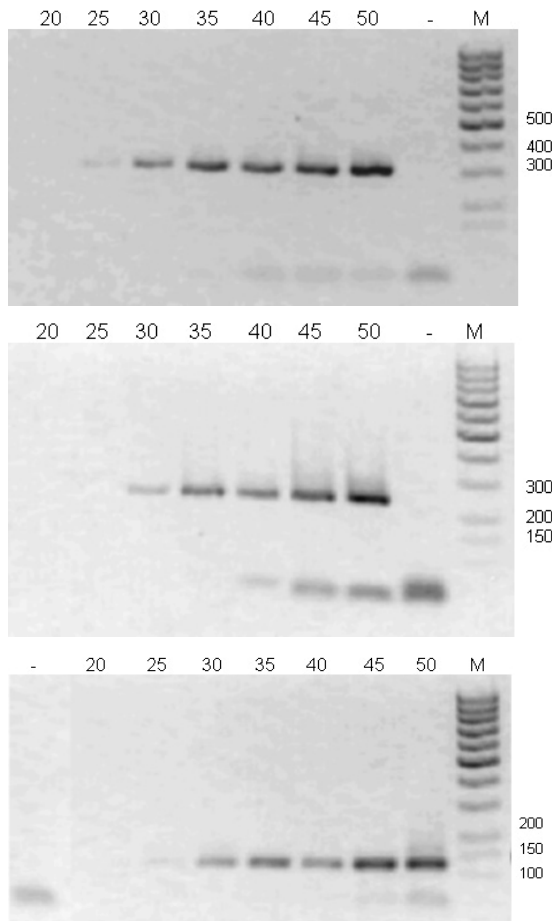


Abb. 3-10: PCR-Sättigungskurven mit SR1-Pflanze Stadium I von α -Tubulin, Actin und γ -Tubulin. Oben: α -Tubulin; Mitte: Actin; Unten: γ -Tubulin. Jeweils die Produkte von 20 bis 50 Zyklen, alle 5 Zyklen und Negativkontrolle (-). Marker 100bp Ladder (M); jeweils 8 μ l der PCR-Ansätze aufgetragen; aufgetrennt in einem 1,5%igem Agarosegel; angefärbt mit Ethidium-bromid.

3.2.3 Nachweis von Actin, α - und γ -Tubulin in verschiedenen Zellstadien

Durch die Sättigungskurven (s. Abb. 3-9 und 3-10) wurde der lineare Bereich der PCR von Actin, α - und γ -Tubulin bestimmt. Aufgrund dieser Erkenntnisse wurde für die PCR die Anzahl der Zyklen festgelegt (s. Kapitel 3.2.2).

3.2.3.1 Nachweis der untersuchten mRNA in der Zellkultur (BY-2)

Beim Stadienvergleich der BY2-Zellkultur sind die Ergebnisse für Actin und α -Tubulin (Abb. 3-11 mitte und unten) sehr ähnlich. Beide weisen vom Stadium 0 (Zellteilungen) bis zum Stadium 9 (Zellstreckung) annähernd gleich starke Signale auf. α -Tubulin zeigt im Stadium 12 eine Intensitätsverringerng, bei Actin ist im Stadium 12 eine leichte Intensitätszunahme zu erkennen.

Die Intensität der Signale von γ -Tubulin (Abb. 3-11 oben) bleibt in den Stadien 0-9 annähernd gleich stark und nimmt dann in Stadium 12 leicht ab, zeigt aber noch ein

deutliches Signal. Das darunterliegende schwache Signal ist den Primerdimeren zuzuordnen.

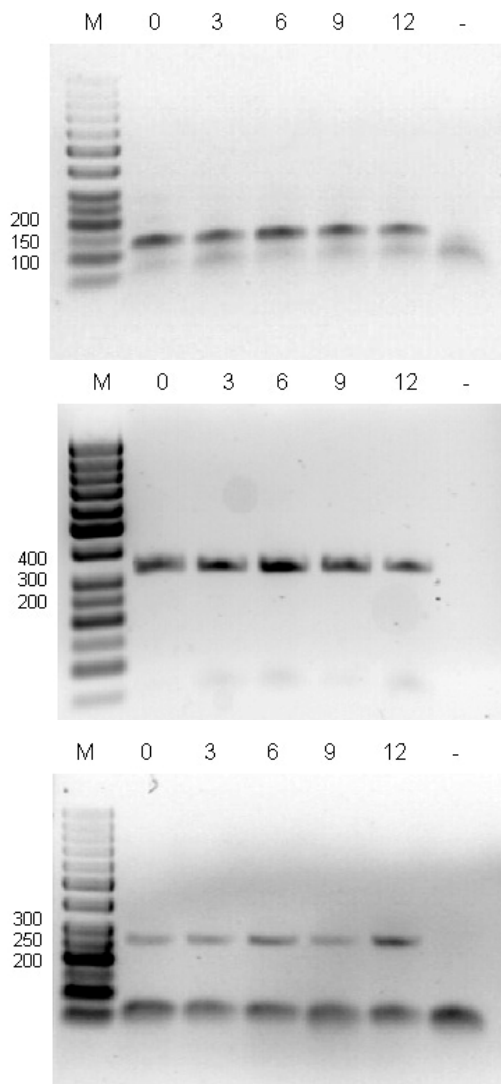


Abb. 3-11: Gelelektrophoretische Auftrennung der Amplifikate des Stadien 0, 3, 6, 9, 12 der BY-2 Zellkultur. γ -Tubulin (oben), α -Tubulin (mitte) und Actin (unten) mit Negativkontrolle (-); jeweils 8 μ l der PCR-Ansätze auf-getragen; aufgetrennt in einem 1,5%igem Agarosegel; angefärbt mit Ethidiumbromid.

3.2.3.2 Nachweis der untersuchten mRNA bei der Tabakpflanze (SR1)

Die Amplifikation mit den Primern für γ -Tubulin (Abb. 3-12 rechts) zeigte in allen Stadien ein deutliches Signal. Die Konzentration nahm im Verlauf der Blattentwicklung ab, wobei es vor allem zwischen den Stadien am Übergang von meristematischem Gewebe hin zum Streckungswachstum (Stadium I und Stadium III) zu einer deutlichen Verringerung der Signalstärke kam. Die Stadien mit expandierendem und expandiertem Blattgewebe (Stadium III, IV und V) zeigten dagegen kaum einen Konzentrationsunterschied, die Konzentration an γ -Tubulin bleibt weitgehend konstant.

Die Konzentration an α -Tubulin (Abb. 3-12 mitte) nahm im Verlauf der Blattentwicklung im Vergleich zu γ -Tubulin gleichmäßiger ab, war aber im Stadium V noch deutlich zu erkennen.

Actin (Abb. 3-12 rechts) blieb im Verlauf der Blattentwicklung konstant. Nur das Signal im meristematischen Gewebe (Stadium I) war etwas schwächer als das Signal des darauffolgenden Stadiums II.



Abb. 3-12: Gelelektrophoretische Auftrennung der Amplifikate des Stadiums I, II, III, IV, V der SR1-Pflanze. γ -Tubulin (links), α -Tubulin (mitte) und Actin (rechts) mit Negativkontrolle (-); jeweils 8 μ l der PCR-Ansätze aufgetragen; aufgetrennt in einem 1,5%igem Agarosegel; angefärbt mit Ethidiumbromid.
I) meristematisches Blattgewebe; II) Übergang zum Streckungswachstum; III) starkes Streckungswachstum; IV) Ende des Blattwachstums; V) voll expandiertes Blatt

Die Amplifikation der 60 und 90 Tage alten Stadien und der Referenzbanden der von Stadium I und III zeigte in meristematischen Geweben (Stadium I) die stärkste Expression (Abb. 3-13). Die Stadien mit intensivem und nachlassendem Streckungswachstum (Stadium III und VI) zeigten eine etwa gleich starke Expression des Proteins, wogegen die Konzentration an γ -Tubulin (Abb. 3-13 links) im stark seneszenten Gewebe (Stadium VII) deutlich geringer war.

Actin zeigte bis zum Blattalter von 60 Tagen (beginnende Seneszenz) eine etwa gleichbleibende Expression. Im 90 Tage alten Blatt (starke Seneszenz) war die Konzentration wesentlich geringer.

α -Tubulin (Abb. 3-13 rechts) nahm im Verlauf der Blattseneszenz weiter ab und war im seneszenten Gewebe (Stadium VII) mit der verwendeten Anzahl an PCR-Zyklen nicht mehr nachweisbar. Daher wurde Stadium VII erneut einer PCR unterzogen. Die Erhöhung auf 50 Amplifikationszyklen sollte zeigen, ob auch im stark seneszenten Blatt

mRNA für α -Tubulin nachzuweisen war. Die Amplifikation von α -Tubulin unter Verwendung von 50 Zyklen (Abb. 3-14) zeigte auch in Stadium VII ein deutliches Signal.

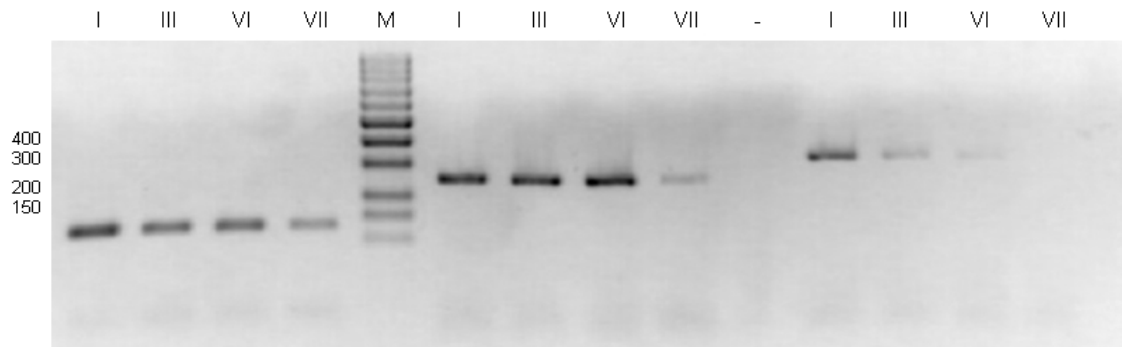


Abb. 3-13: Gelelektrophoretische Auftrennung der Amplifikate der Stadien mit Anzeichen von Seneszenz der Tabakpflanze (SR1). γ -Tubulin (links), Actin (mitte) und α -Tubulin (rechts) mit Negativkontrolle (-); jeweils 8 μ l der PCR-Ansätze aufgetragen; aufgetrennt in einem 1,5%igem Agarosegel; angefärbt mit Ethidiumbromid.

I) meristematisches Gewebe; III) starkes Streckungswachstum; VI) vollständig expandiertes Blattgewebe mit beginnender Seneszenz; VII) seneszenten Blatt

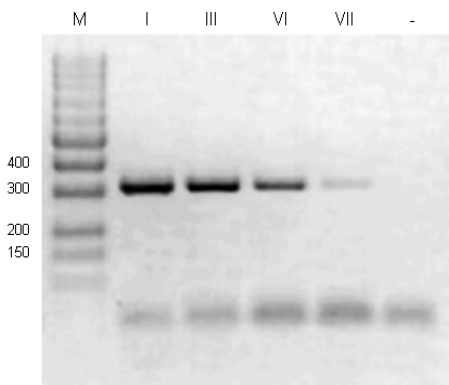


Abb. 3-14: Gelelektrophoretische Auftrennung der Amplifikate von α -Tubulin der Stadien mit Anzeichen von Seneszenz der Tabakpflanze (SR1) (50 Zyklen). Negativkontrolle (-); jeweils 8 μ l der PCR-Ansätze aufgetragen; aufgetrennt in einem 1,5%igem Agarosegel; angefärbt mit Ethidiumbromid.

I) meristematisches Gewebe; III) starkes Streckungswachstum; VI) vollständig expandiertes Blattgewebe mit beginnender Seneszenz; VII) seneszenten Blatt

3.2.5 Sequenzierung der nachgewiesenen spezifischen mRNA in den ältesten Stadien von der Zellkultur (BY-2) und Tabakpflanze (SR1)

Um sicherzugehen, dass es sich bei den Stadienvergleichen von der Zellsuspensionskultur erhaltenen Signale um spezifische Signale für Actin, α -Tubulin und γ -Tubulin handelt, wurden jeweils die Signale der ältesten Stadien (Stadium 12) bei der Firma Genterprise sequenziert. Für die Tabakpflanze wurde das Signal für γ -Tubulin des 60 Tage alten Blattes und das Signal für Actin des 80 Tage alten Blatts eingereicht.

Die erhaltenen Sequenziererergebnisse zeigten bei einer computergestützten Sequenzanalyse, dass es sich eindeutig um die mRNA der untersuchten Proteine handelte (s. Anhang).

3.2.6 Neues Housekeeping-Gen und Zellteilungsmarker in der PCR für die Zellsuspensionskultur (BY-2)

Ursprünglich war zu Beginn der Untersuchungen davon auszugehen, dass sowohl die mRNA von α -Tubulin wie auch von Actin als ständiger Bestandteil der Mikrotubuli (α -Tubulin) bzw. des Cytoplasmas (Actin) Housekeeping-Gene sind, und somit als interne Kontrolle für die PCR eingesetzt werden können.

Da die Funktion der mRNA von α -Tubulin und Actin als Housekeeping-Gene aufgrund der Ergebnisse aber sehr fragwürdig war, wurde nach einem neuen einsetzbaren Housekeeping-Gen gesucht. Deshalb wurde der Elongationsfactor-1 α (NICOT, 2005) auf seine Funktion als neues Housekeeping-Gen getestet, um als interner Standard für die PCR zu dienen. Damit sollte auch eine Aussage über den Erhaltungszustand der Zellen möglich sein.

Weiterhin sollte ein geeigneter Marker auf Ebene der mRNA gefunden werden, der eine Aussage über Teilungszustand der Zellen in der PCR möglich macht. Durch einen Vergleich des Signals von Histon H4, welches als Indikator für die Zellteilung angesehen wird (BRANDSTÄDTER, 1993), sollte eine Aussage auf Ebene der PCR getroffen werden ob die Zellen zellteilungsaktiv sind oder sich in der Elongationsphase befinden.

3.2.6.1 Aufnahme einer Sättigungskurve in der PCR von Histon H4 und Elongationsfaktor-1 α

Damit eine Aussage über den linearen Bereich der PCR von Histon H4 und Elongationsfaktor-1 α getroffen werden konnte, musste mit der Aufnahme einer Sättigungskurve der lineare Bereich der PCR im Stadium 0 bestimmt werden, da hier die stärksten Signale der beiden mRNAs zu erwarten waren.

Für die Sättigungskurve für die mRNA von Histon H4 (205bp) (s. Abb. 3-15 links) trat das erste Signal bei einer Zyklenzahl von 30 Zyklen auf. Die Sättigung war bei 50 Zyklen noch nicht erreicht.

Die Sättigungskurve für den Elongationsfaktor-1 α (186bp) (s. Abb. 3-15 rechts) zeigte das erste Signal gleich bei 20 Zyklen. Die Sättigung trat sehr früh bei 35 Zyklen ein.

Aufgrund der Ergebnisse der Sättigungskurven wurden die Zyklenzahlen für den Stadienvergleich für Histon H4 auf 35 Zyklen und Elongationsfaktor-1 α auf 20 Zyklen festgesetzt.

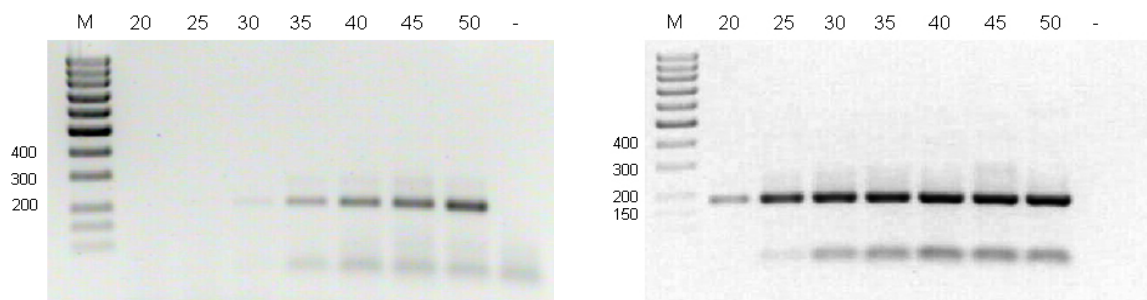


Abb. 3-15: Gelelektrophoretische Auftrennung der Amplifikate für die Sättigungskurve der Zellkultur (BY-2) Stadium 0. Histon H4 (links) und Elongationsfaktor-1 α (rechts) mit Negativkontrolle (-); jeweils 8 μ l der PCR-Ansätze aufgetragen; aufgetrennt in einem 1,5%igem Agarosegel; angefärbt mit Ethidiumbromid.

3.2.6.2 Nachweis von Histon H4 und Elongationsfaktor-1 α in den Stadien der Zellsuspensionskultur (BY-2)

Durch die Sättigungskurven (s. Abb. 3-15) wurde der lineare Bereich der PCR von Histon H4 und Elongationsfaktor-1 α bestimmt. Aufgrund dieser Erkenntnisse wurde für die PCR die Anzahl der Zyklen festgelegt.

Der Stadienvergleich für Histon H4 (s. Abb. 3-16 links) mit der BY-2 Zellkultur zeigte das stärkste Signal im Stadium 0. In den folgenden Stadien nahm das Signal ab, in den

Stadien 3, 6 und 9 war es gleich stark vertreten. Im Stadium 12 nahm das Signal dann wieder leicht zu.

Für den Elongationsfaktor-1 α (s. Abb. 3-16 rechts) ergab der Stadienvergleich in den Stadien 0, 3, 6, 9 und 12 überall ein annähernd gleich starkes Signal.

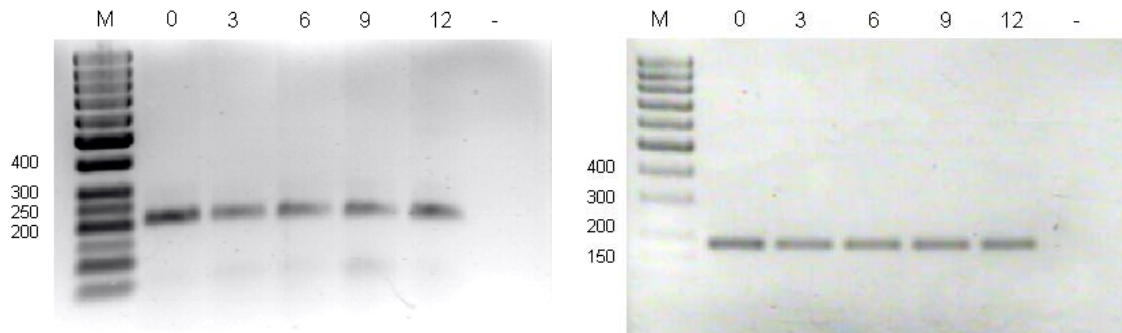


Abb. 3-16: PCR-Sättigungskurven mit der BY-2 Zellkultur Stadium 0 von Histone H4 und Elongationsfaktor-1 α . Links: Histone H4; Rechts: Elongationsfaktor-1 α . Jeweils die Produkte von 20 bis 50 Zyklen, alle 5 Zyklen und Negativkontrolle (-). Marker 100bpLadder (M); jeweils 8 μ l der PCR-Ansätze aufgetragen; aufgetrennt in einem 1,5%igem Agarosegel; angefärbt mit Ethidiumbromid.

3.3 Proteinbiochemischer Teil

3.3.1 Gesamtproteingehalt der Proteinextraktionen von Zellkultur (BY-2), Tabakpflanze (SR1) und Gerste

Der Proteingehalt wurde nach der in Kapitel 2.5.3.1 beschriebenen Methode bestimmt. Die eingesetzte Frischmasse und die einzelnen Messungen der Extinktionswerte von Zellkultur, Tabakpflanze und Gerste, sowie die Ergebnisse der Berechnungen bezogen auf das Frischgewicht werden im Anhang (s. Kap. 7.6.2) dargestellt.

Für die Versuche mit den Proteinextrakten wurden 15 μ g Gesamtprotein eingesetzt, um die Ergebnisse semiquantitativ vergleichen zu können.

3.3.2 Polyklonale Antikörper gegen den γ -B-Peptidbereich von γ -Tubulin

3.3.2.1 Testen von Präimmunserum und Serum von Kaninchen KN334 im Western-Blot

Der polyklonale Antikörper gegen den γ -B-Peptidbereich wurde im Rahmen der Diplomarbeit von SCHLAG, 2002 erstmals verwendet und zeigte verwertbare Signale auf γ -Tubulin. Auf ein Testen des Präimmunserums wurde damals verzichtet. Dieses wurde im Rahmen dieser Arbeit nachgeholt.

Dafür wurde das Stadium 0 der Zellkultur (BY-2) mit dem Präimmunserum von KN334 verwendet.

Das Serum von KN 334 zeigte ein Signal im Bereich zwischen 43 und 66kDa (s. Abb. 3-17 links), das dem Signal für γ -Tubulin zuzuordnen war. Im gleichen Bereich zeigte auch der Test mit dem Präimmunserum s. Abb. 3-17 rechts) von KN 334 ein schwaches Signal.

Daher ist nicht eindeutig nachweisbar, ob es sich beim Serum um eine Reaktion auf γ -Tubulin handelt, da diese schon vor der Immunisierung von KN 334 aufgetreten ist. Darum wurden neue Immunisierungen durchgeführt (s. Kap. 3.3.2.2).

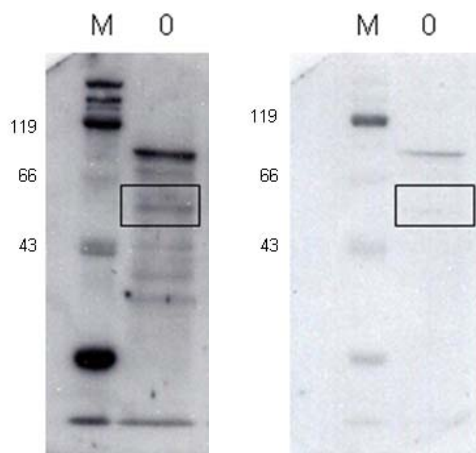


Abb. 3-17: Westernblot mit Test des Serums von KN 334 auf γ -Tubulin mit BY-2 Zellstadium 0. Serum KN334 (links) und Präimmunserum KN 334 (rechts) Verdünnung 1:250 mit BY-2 Zellstadium 0; aufgetragen 15 μ g Gesamtprotein, Belichtung 32min

3.3.2.2 Testen von Präimmunserum und verschiedenen Blutentnahmen von Kaninchen KN 340 und KN 341 im Western-Blot

Da das Präimmunserum von KN 334 deutliche Signale im zu erwartenden Bereich von γ -Tubulin zeigte, wurde der gleiche Versuch der Immunisierung mit dem γ -B-

Peptidbereich an zwei neuen Kaninchen KN340 und KN 341 wiederholt. Diese wurde in Kooperation mit Frau Diehl-Seifert, Physiologische Chemie, Johannes-Gutenberg Universität Mainz durchgeführt. Nach dem Testen der Präimmunsereen, erfolgte die Immunisierung insgesamt dreimal im Abstand von vier Wochen. Jeweils 10-12 Tage nach der zweiten bzw. dritten Immunisierung wurde dem Kaninchen Blut aus der Ohrvene entnommen und das Serum aufgearbeitet.

Beide Kaninchen KN 340 und KN 341 zeigten keine Signale im Bereich von γ -Tubulin (53kDa) (s. Abb. 3-18 Präimmunserum). Daher konnten beide Kaninchen für die Immunisierung eingesetzt werden.

Beim Serum vom 01.09.2003 zeigten beide Kaninchen eine schwache Reaktion im Bereich von 43 kDa bis 66 kDa bei einer Belichtungsdauer von 4min (s. Abb. 3-18). Dieses Signal verstärkte sich bei der nächsten Blutentnahme (Serum 27.09.2003). Beide Kaninchen zeigten im Bereich von 43 kDa bis 66 kDa ein breites Signal. Diese Reaktion trat beim KN 341 stärker als beim KN 340 auf. Es war keine eindeutige Bande dem Bereich von γ -Tubulin zuzuweisen.

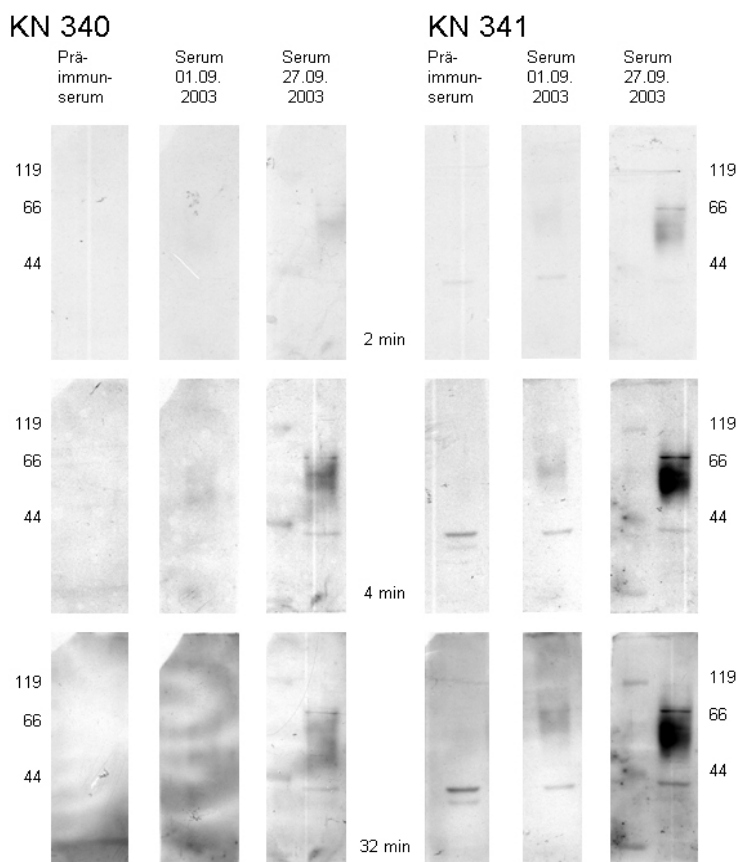


Abb. 3-18: Test der Präimmunsereen und Seren auf γ -Tubulin mit BY-2 Zellstadium 0 im Western-Blot. KN 340 (links) und KN 341 (rechts); Verdünnung 1:250; aufgetragen 15 μ g Gesamtprotein, Belichtungszeit: 2min, 4min und 32min

3.3.2.3 Aufreinigung der Seren von Kaninchen KN 340 und KN 341 mittels EAH-Sepharose

Die Aufreinigung mittels EAH-Sepharose erfolgte wie in Kapitel 2.5.1.3 beschrieben. Dabei wurde jeweils 1ml des Eluats in sechs Eppendorf-Reaktionsgefäßen aufgefangen. Diese wurden im Anschluß bei 280nm photometrisch bestimmt und dann im Westernblot getestet.

3.3.2.3.1 Photometrische Bestimmung der Eluate von Kaninchen KN 340 und KN 341 von der EAH-Säule

Die photometrische Bestimmung der Eluate liefert eine Aussage über den Gehalt des Antikörpers in den Eluaten zu. Aus den Ergebnissen von Tab. 3-7 ist zu ersehen, mit welchen Eluaten Antikörper von der Säule kam, um diese Eluate bei Bedarf zu poolen.

Bei der Elution der Antikörper von KN 340 kommt am Anfang nur eine geringe Menge von Antikörper von der Säule. Der größte Anteil wird mit dem Eluat 2 von der Säule gewaschen. Ab Eluat 3 nimmt die Menge, der von der Säule kommenden Antikörper wieder ab. Im Eluat 6 sind keine Antikörper mehr nachzuweisen.

Ähnliches ist auch beim KN 341 festzustellen. Der größte Anteil kommt mit dem Eluat 2 von der Säule.

Eluat	KN 340	KN 341
E1	0,001	0,040
E2	0,140	0,082
E3	0,018	0,011
E4	0,006	0,003
E5	0,001	0,000
E6	0,000	0,000

Tab. 3-7: Extinktionen der Eluate bei 280nm

3.3.2.3.2 Testen der Eluate von Kaninchen KN 340 und KN 341 im Western-Blot

Unter Berücksichtigung der photometrischen Bestimmung wurden die verschiedenen Eluate, KN 340 Eluat 1 bis 4 und KN 341 Eluat 1 bis 3, auf der Ebene des Western-Blots auf das Stadium 0 der BY-2 Zellkultur getestet, da bei den restlichen Eluaten aufgrund der niedrigen Extinktionen keine Resultate zu erwarten waren.

Das Testen der Eluate (s. Abb. 3-19) spiegelte das Ergebnis der Photometrie wieder. Vergleichbar mit der Photometrie zeigten die Eluate das stärkste Signal in Eluat zwei bei den Kaninchen KN 340 und KN 341. Dargestellt werden nur die Belichtungen von 16min und über Nacht (KN 340) sowie 8min und 64min (KN 341), da man an diesen die Resultate am besten erkennen kann.

Bei den Tests der Eluate war eine deutliche Aufreinigung zu erkennen. Im Vergleich zum Test der Seren (s. Abb. 3-18) nimmt die Anzahl der Signale ab. Im Bereich zwischen 43 kDa und 66 kDa war der breite Schmier nicht mehr zu erkennen. Bei beiden Kaninchen tauchte eine leichte Bande bei 66 kDa auf. In dem Bereich in dem γ -Tubulin zu erwarten war (54 kDa) war keine Bande zu erkennen.

Aus diesem Grund wurde mit den Seren des KN 340 und KN 341 nicht mehr weiter gearbeitet.

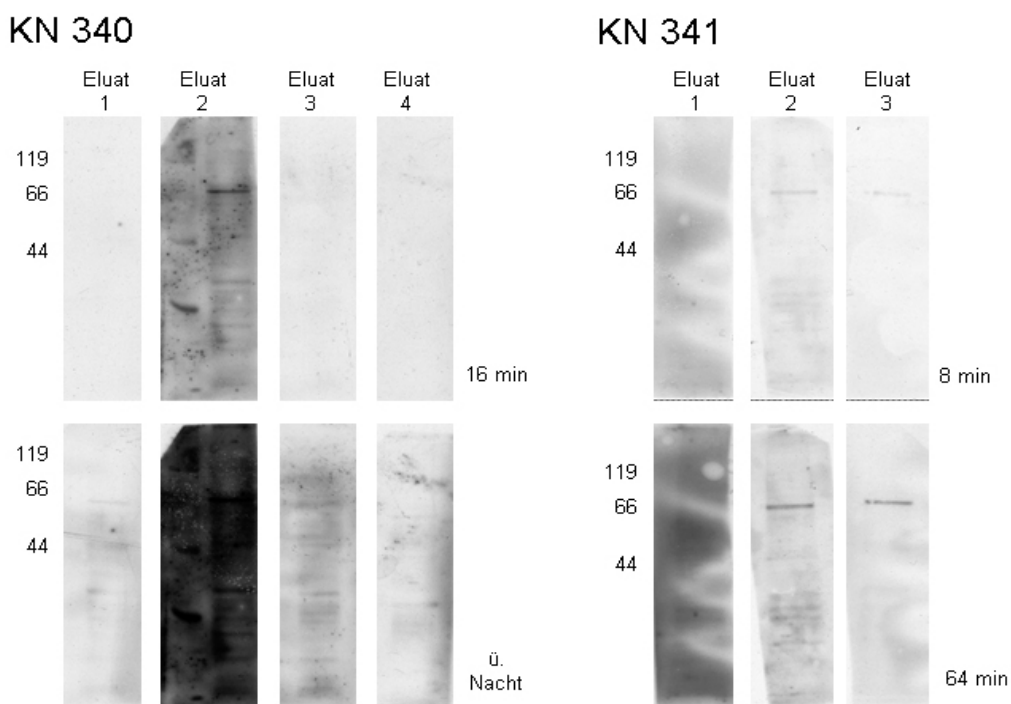


Abb. 3-19: Testen der Eluate der Aufreinigung von KN 340 und KN 341 auf γ -Tubulin mit BY-2 Zellstadium 0 im Western-Blot. KN 340 (links) und KN 341 (rechts); Verdünnung 1:250 ; aufgetragen 15 μ g Gesamtprotein, Belichtung KN 340: 16min und über Nacht; Belichtung KN 341: 8min und 64 min 32min

3.3.3.2 Testen der verschiedenen Blutentnahmen von Kaninchen KN 714 und KN 746

Um die Effektivität der Immunisierungen von KN 714 und KN 746 zu testen, wurden von der Firma Covalab die Blutentnahmen nach der 2. Immunisierung (Tag 53; D53) und der 3. Immunisierung (Tag 74; D74) zugeschickt. Da das Angebot der Firma Covalab auch die Antikörper-Aufreinigung gegen das eingesetzte Peptid enthielt, sollte nach dem Test entschieden werden, welches Kaninchen aufgereinigt werden sollte.

Dazu wurden die Blutungen und noch einmal das Präimmunserum im Western-Blot gegen ein Proteinextrakt von BY-2 Zellkultur Stadium 0 getestet. Da bei einer Belichtung des Röntgenfilms von 4min (s. Abb. 3-21 die Ergebnisse schon aussagekräftig waren, wird auf die Darstellung weiterer Belichtungen verzichtet.

Man konnte erkennen, dass die Immunisierung bei beiden Kaninchen funktioniert hat. Beide Kaninchen zeigten bei der Blutung D53 deutliche Signale die in den Präimmunseren noch nicht auftraten. Beide Kaninchen zeigten neben verschiedenen Kreuzreaktionen im Bereich des zu erwartenden γ -Tubulins bei 54 kDa (s. Pfeil) eine deutliche Bande in den Blutungen D53 und D74. Beim Vergleich der beiden Kaninchen fiel auf, dass die beiden Blutungen bei Kaninchen KN 714 ein unterschiedliches Bandenmuster zeigen. Die beiden Blutungen von Kaninchen KN 746 zeigten ein gleichmäßigeres Bandenmuster, wobei bei der Blutung D74 eine Zunahme der Signale zu erkennen war.

Die Immunisierung von Kaninchen KN 746 verlief in den Signalen gleichmäßiger und die Bande im Bereich des zu erwartenden γ -Tubulin wurde stärker. Daher wurde ein Aliquot des Serums von Kaninchen KN 746 von der Firma Covalab aufgereinigt.

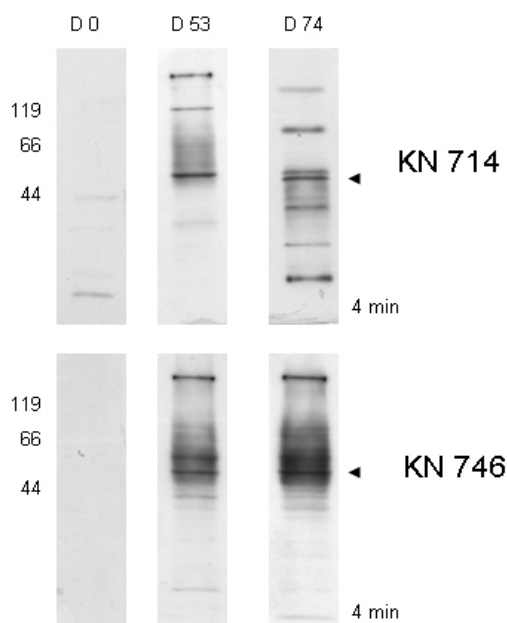


Abb. 3-21: Testen der Blutungen D 0, D53 und D74 von KN 714 (oben) und KN 746 (unten). Belichtungszeit 4 min; jeweils 15 μ g Gesamtprotein aufgetragen; (Pfeil markiert die zu erwartende Größe von γ -Tubulin)

3.3.3.3 Testen des aufgereinigten Antikörpers D81 von Kaninchen KN 746 auf Zellsuspensionskultur (BY-2) und Gerste

Nach Erhalt des aufgereinigten Antikörpers D 81 (Tag 81) von Kaninchen KN 746 wurde dieser im Western-Blot mit dem Proteinextrakt der Zellkultur (BY-2) Stadium 0 und mit Proteinextrakten der Gerste Stadium I und VI (s. Kap. 3.1.3.1) getestet. Es sollte eine Aussage getroffen werden, ob die Aufreinigung zu einer Verbesserung des Signals im zu erwartenden Bereich des γ -Tubulins geführt hat, und ob man sagen kann, dass dieser auch wirklich γ -Tubulin detektieren kann. Dafür wurden die Extrakte der Gerste eingesetzt. In dem Bereich des Meristems der Gerste (Stadium I) war ein hoher Gehalt an γ -Tubulin aufgrund der Zellteilungen zu erwarten, während im Stadium VI mit ausdifferenzierten Zellen ein geringerer Gehalt an γ -Tubulin zu erwarten war.

Dargestellt wird die Coomassie-Färbung (Abb. 3-22 A) des SDS-Gels zur Kontrolle der Auftrennung und die Belichtungsreihen (Abb. 3-22 B) von 2 min, 16 min und die über Nacht-Belichtung, da diese am aussagekräftigsten waren.

Man konnte in den Proteinextrakten von der Zellkultur (BY-2) Stadium 0 einen Aufreinigungseffekt von aufgereinigtem D81 von Kaninchen KN 746 (Abb. 3-22) im Vergleich zur Blutung D74 (s. Abb. 3-21) feststellen. Im Bereich von dem zu erwartenden γ -Tubulin bei 54kDa (s. Pfeil) trat nur noch eine Bande auf, während in diesem Bereich bei der Blutung von D74 ein breiter Schmier an Signalen auftrat. Neben diesem Signal war noch eine Kreuzreaktion zwischen 200 kDa und 119 kDa zu erkennen. In den längeren Belichtungen trat noch eine Bande bei 43 kDa zum Vorschein.

Bei den Extrakten der Gerste wurde auf der gleichen Höhe des zu erwartenden γ -Tubulin (s. Pfeil) ein starkes Signal in Stadium I in allen Belichtungen detektiert. Dieses Signal war in Stadium VI schwächer und trat erst bei der Belichtung von 16 min auf. Neben dem Signal von 54 kDa traten in Stadium I zwei weitere Kreuzreaktionen im Bereich zwischen 119 kDa und 66 kDa. Bei Stadium VI trat im Bereich zwischen 119 kDa und 66 kDa nur eine schwache Kreuzreaktion auf, dafür war aber unterhalb des zu erwartenden γ -Tubulins noch eine weitere Kreuzreaktion zu erkennen.

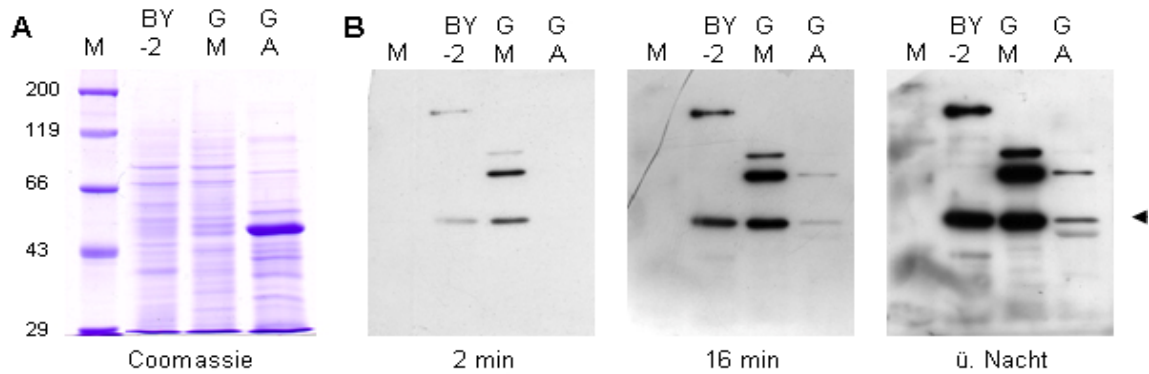


Abb. 3-22: Testen des aufgereinigten Antikörpers D81 von Kaninchen KN 746 auf γ -Tubulin mit BY-2 Stadium 0 und Gerste Stadium I und VI im Western-Blot.
 A) Coomassie-Färbung des SDS-Gels zur Kontrolle der Proteinextrakte, B) Belichtungen 2min, 16min und über Nacht; jeweils 15 μ g Gesamtprotein aufgetragen; primärer Antikörper: Verdünnung 1:250, sekundärer Antikörper Verdünnung 1:2500

3.3.3.4 Proteinnachweis in den Stadien des 2. Blatts der Gerste

Um die Ergebnisse aus Kapitel 3.3.3.3 zu bestätigen, wurde von der Gerste ein kompletter Stadienvergleich mit Actin, α -Tubulin und aufgereinigtem Antikörper D81 aus Kaninchen KN 746 durchgeführt. Man ging davon aus, dass in den alten Stadien der Gerste das γ -Tubulin nur in Verbindung mit α -Tubulin vorkommen kann. Das Vorhandensein von α -Tubulin in den alten Stadien, sollte somit einen Rückschluss auf die Qualität des aufgereinigten Antikörper D81 aus Kaninchen KN 746 geben.

Dargestellt wird die Coomassie-Färbung (Abb. 3-23 A) des SDS-Gels zur Kontrolle der Auftrennung und die Western-Blots mit Actin (Abb 3-23 B), aufgereinigtem Antikörper D81 (Abb. 3-23 C) und α -Tubulin (Abb. 3-23 D) mit der Belichtungszeit von 4min, da diese am aussagekräftigsten waren.

Im Coomassiegel konnte man eine Zunahme der Rubisco-Bande (s. Pfeil Abb. 3-23 A) über die verschiedenen Stadien hinweg erkennen, die mit einer Abnahme des anderen Banden in den älteren Stadien einherging.

Bei den Signalen von Actin (s. Pfeil Abb. 3-23 B), aufgereinigtem Antikörper D81 (s. Pfeil Abb. 3-23 C) und α -Tubulin (s. Pfeil Abb. 3-23 C) war eine gleichmäßige Abnahme über die verschiedenen Stadien bis hin zum Stadium VI zu detektieren. Im Stadium VI war bei allen eingesetzten Antikörpern ein deutliches Signal vorhanden.

Beim Western-Blot mit aufgereinigtem Antikörper D81 trat die gleiche Kreuzreaktion im Bereich zwischen 119 kDa und 66 kDa auf.

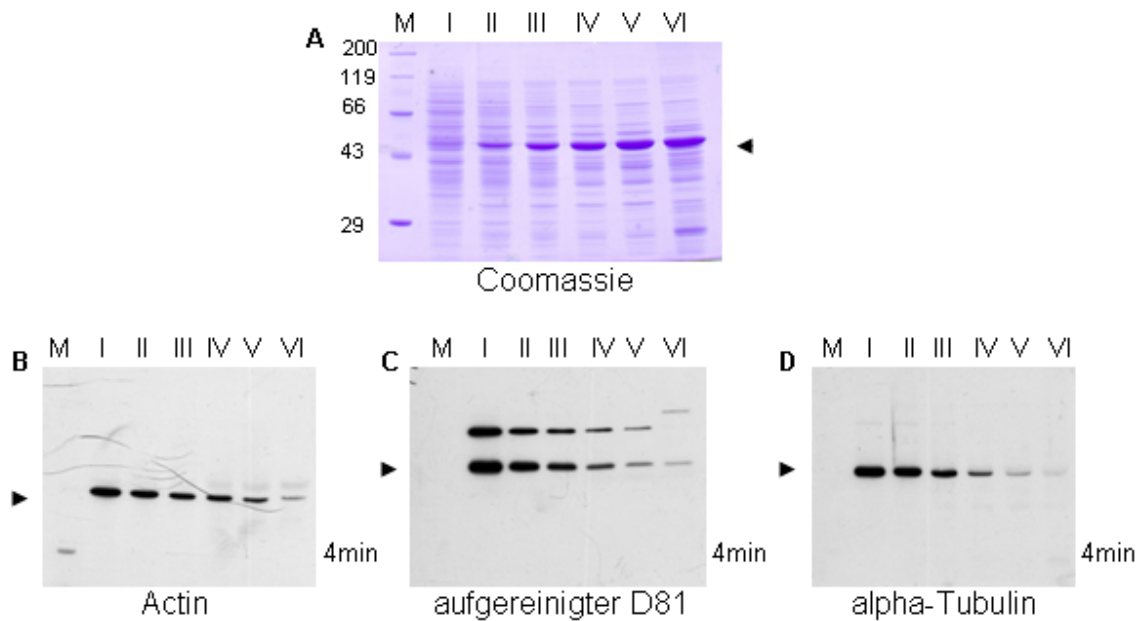


Abb. 3-23: Stadienvergleich der Gerste im 2. Blatt A) Coomassie-Färbung des SDS-Gels zur Kontrolle der Proteinextrakte, B) Actin: Belichtungszeit 4 min, C) aufgereinigter Antikörper D81 aus Kaninchen KN 746 (1:250): Belichtungszeit 4 min, D) α -Tubulin (1:250): Belichtungszeit 4 min; jeweils 15 μ g Gesamtprotein aufgetragen

3.3.3.5 Testen des aufgereinigten polyklonalen Antikörpers D81 von KN 746 auf überexprimiertes γ -Tubulin

Im Rahmen der Staatexamensarbeit von OSTERTAG wurde γ -Tubulin aus *Nicotiana tabacum* in transformierten Bakterien des Stamms BL 21 überexprimiert. Dieser Proteinextrakt wurde mit aufgereinigten Antikörper D81 von Kaninchen KN 746 behandelt, um zu testen ob dieses überexprimierte γ -Tubulin detektiert werden kann. Als Kontrolle wurden Proteinextrakte von der Zellsuspensionskultur (BY-2) Stadium 0 und von untransformiertem BL 21-Stamm getestet.

Dargestellt wird die Coomassie-Färbung (Abb. 3-24 A) des SDS-Gels zur Kontrolle der Auftrennung und der Western-Blot mit aufgereinigtem Antikörper D81 (Abb 3-24 B) mit der Belichtungszeit von 1min und 4min.

Im Coomassiegel war beim Vergleich der Proteinextrakte von untransformiertem BL 21-Stamm (BL 21) und BL 21-Stamm mit überexprimiertem γ -Tubulin (BL 21+) eine zusätzliche deutliche Bande im Bereich von 54 kDa (s. Pfeil Abb. 3-24 A) zu erkennen. Das zeigt, dass es zu einer Überexpression von γ -Tubulin in den transformierten BL 21-Zellen gekommen war.

Bei der Detektion mit dem aufgereinigten Antikörper D81 von Kaninchen KN 746 (s. Abb. 3-24 B) wurde ein Signal im Proteinextrakt von der BY-2 Zellkultur Stadium 0 im Bereich von 54 kDa detektiert. Der Proteinextrakt von untransformiertem BL 21-Stamm zeigte keine Signale. Im Vergleich dazu zeigte das Proteinextrakt des transformierten BL 21-Stamms ein Signal, welches dem Signal im Coomassie-Gel zuzuordnen war. Dieses lag etwas höher als das Signal der BY-2 Zellkultur, da bei der Überexpression an das γ -Tubulin noch ein HisTaq angelagert wurde.

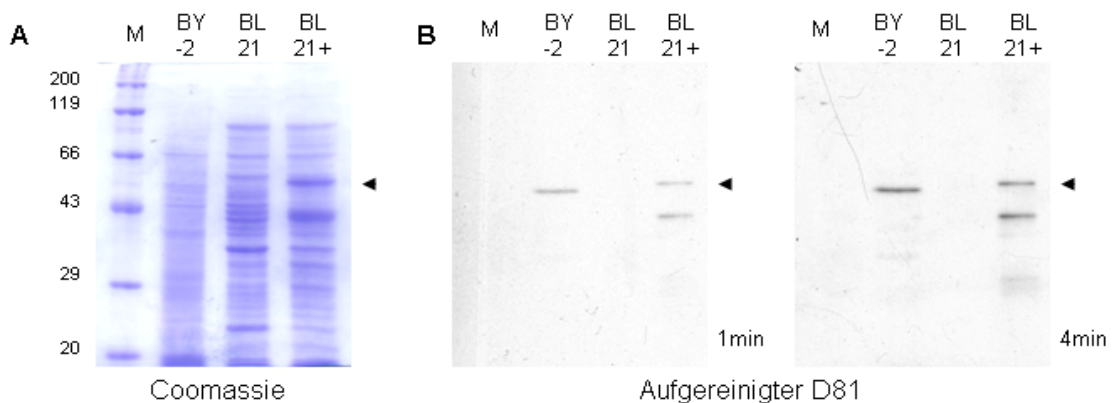


Abb. 3-24: Test von aufgereinigtem Antikörper D81 von Kaninchen KN 746 auf überexprimiertes γ -Tubulin. A) Coomassie-Färbung des SDS-Gels zur Kontrolle der Proteinextrakte, B) aufgereinigter Antikörper D81 Belichtungszeit 1 min und 4 min, Verdünnung 1:250; jeweils 15 μ g Gesamtprotein aufgetragen

3.3.4 Proteinnachweis in verschiedenen Zellentwicklungsstadien

Durch den Versuch mit überexprimierten γ -Tubulin konnte nachgewiesen werden, dass der aufgereinigte Antikörper D81 aus Kaninchen KN 746 für den Nachweis von γ -Tubulin geeignet ist (s. Kap. 3.3.3.5).

Mithilfe des γ -Tubulin Antikörpers sollte nun der Gehalt von γ -Tubulin in verschiedenen Entwicklungsstadien der Zelle nachgewiesen werden.

3.3.4.1 Nachweis in den Stadien der Zellsuspensionskultur (BY-2)

Der Proteinnachweis in den untersuchten Stadien der Zellsuspensionskultur (BY-2) zeigte auf dem Coomassie-Gel in allen Stadien ein deutliches Proteinbandenmuster. Dabei waren im meristematischen Stadium 0 die Signale am stärksten, die Stadien 3-9 waren von gleicher Intensität und das Stadium 12 war schwächer.

Die Konzentration von Actin zeigte im Verlauf der Zellentwicklung ein gleichmäßiges Signal, wobei das meristematische Stadium 0 ein wenig schwächer war als die übrigen Stadien (s. Pfeil Abb. 3-25 B).

Die Signale für γ -Tubulin (s. Pfeil Abb 3-25 C) waren im meristematischen Stadium 0 am stärksten. Bei den Zellen die in die Zellelongation eintraten war das Signal für γ -Tubulin schwächer als in Stadium 0, die Intensität war bei Stadium 3-9 in etwa gleich stark. Bei den Zellen von Stadium 12 nahm die Intensität des Signals noch mal ein wenig ab, war aber noch deutlich nachzuweisen.

Das Signal für α -Tubulin (s. Pfeil Abb. 3-25 D) war mit den Signalen von γ -Tubulin zu vergleichen. Im meristematischen Stadium 0 war das Signal am stärksten. In den Stadien 3, 6 und 9 war der Gehalt an α -Tubulin annähernd gleich, aber schwächer im Vergleich zu Stadium 0. Im Stadium 12 nahm der Gehalt noch mal ein wenig ab, war aber immer noch deutlich zu detektieren, und stärker als das Signal von γ -Tubulin.

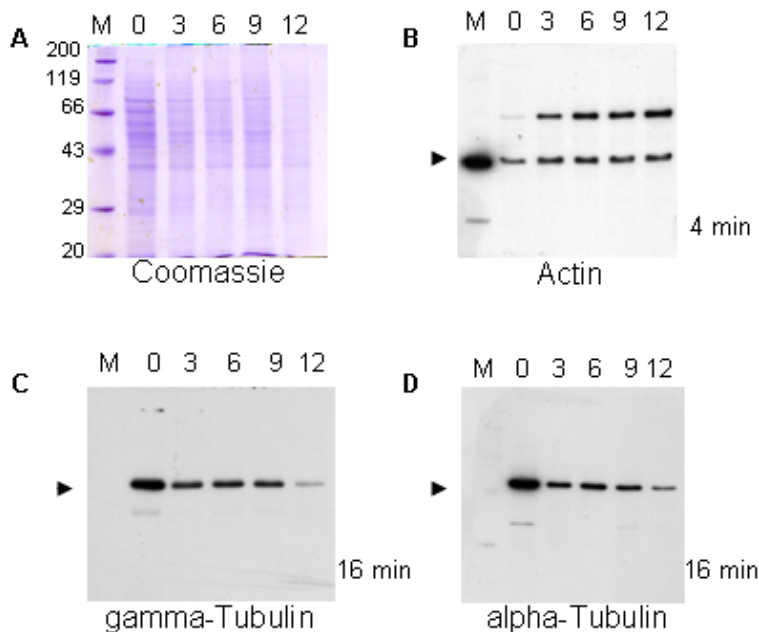


Abb. 3-25: Stadienvergleich der BY-2 Zellkultur. A) Coomassie-Färbung des SDS-Gels zur Kontrolle der Proteinextrakte, B) Actin: Belichtungszeit 4 min, C) γ -Tubulin: Belichtungszeit 16 min, D) α -Tubulin: Belichtungszeit 16min; jeweils 15 μ g Gesamtprotein aufgetragen

3.3.4.2 Nachweis in den Stadien des 11. Blatts der Tabakpflanze (SR1)

Beim Proteinnachweis in den untersuchten Stadien des 11. Blatts konnte man auf dem Coomassie-Gel in den Stadien II bis V deutliche Rubisco-Banden erkennen (s. Pfeil

Abb. 3- 26 A). Im jüngsten Blattstadium mit überwiegend meristematischen Gewebe (Stadium I) war diese Rubisco-Bande nicht zu erkennen.

Die Konzentration an Actin (s. Pfeil Abb. 3-26 B) nahm im Verlauf der Blatentwicklung von Stadium II bis Stadium V kontinuierlich ab. Das meristematische Gewebe von Stadium I zeigte eine etwas geringere Konzentration als das darauffolgende Stadium II.

Die ersten drei Stadien, mit überwiegend meristematischen Gewebe bis hin zur intensiven Zellexpansion, zeigten eine etwa gleich große Konzentration für γ -Tubulin (s. Pfeil Abb. 3-26 C). In noch gering expandierendem Gewebe des Stadium IV war eine deutlich geringere Konzentration an γ -Tubulin nachweisbar. Der Gehalt von γ -Tubulin im voll expandierendem Gewebe aus Stadium V war vergleichbar mit dem Gehalt in Stadium V.

Das Signal für α -Tubulin (s. Pfeil Abb. 3-26 D) war in den meristematischen Geweben (Stadium I und Stadium II) etwa gleich stark und fiel dann in Stadium mit der intensiveren Zellexpansion etwas geringer aus. Mit dem Einstellen der Zellexpansion nahm die Konzentration an α -Tubulin deutlich ab und blieb im weitgehend expandierten Blattgewebe (Stadium IV und Stadium V) auf einem geringen Level relativ konstant.

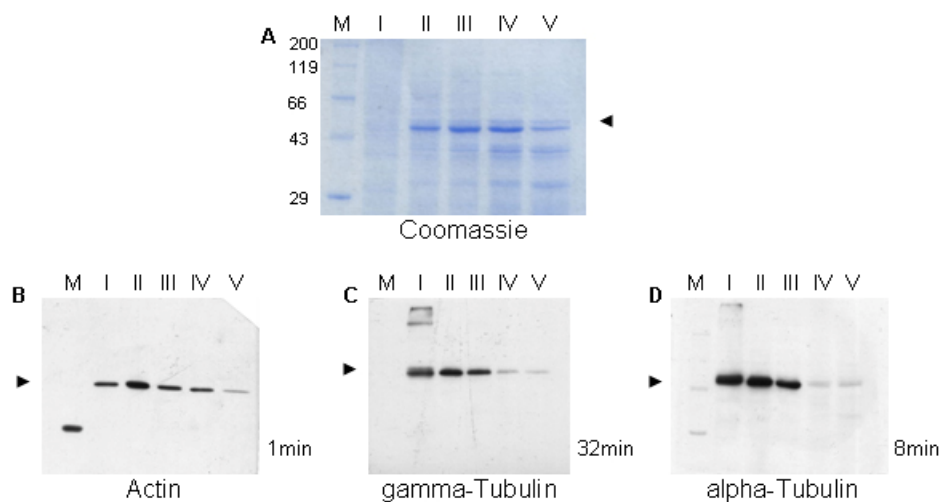


Abb. 3-26: Stadienvergleich des 11. Blatts der Tabakpflanze (SR1). A) Coomassiefärbung des SDS-Gels zur Kontrolle der Proteinextrakte; B) Detektion von γ -Tubulin, Belichtungszeit 32min C) Detektion von α -Tubulin, Belichtungszeit 8min;; D) Detektion von Actin, Belichtungszeit 1min; M) Molekulargewichtsmarker; I) meristematisches Blattgewebe; II) Übergang zum Streckungswachstum; III) starkes Streckungswachstum; IV) Ende des Blattwachstums; V) voll expandiertes Blatt; jeweils 15 μ g Gesamtprotein aufgetragen

Die Versuche mit seneszentem Blattgewebe zeigten auf dem Coomassie-Gel eine deutliche Rubiscobande (s. Pfeil Abb. 3-27, A).

Auf dem Western-Blot zeigte Actin (s. Pfeil Abb. 3-27 B) ein über alle Stadien relativ gleich starkes Signal.

Der Nachweis von γ -Tubulin (s. Pfeil Abb. 3-27 C) zeigte im jungen Stadium I und Stadium III starke Signale. Deutlich geringere, aber noch gut erkennbare Signale waren in den seneszenten Geweben (Stadium VI und Stadium VII) zu erkennen. Neben den Signalen von γ -Tubulin konnte in den Stadien VI und VII mit dem gegen γ -Tubulin gerichteten Antikörper eine zusätzliche Bande von ca. 25kDa detektiert werden.

Die Detektion mit dem Antikörper gegen α -Tubulin (s. Pfeil Abb. 3-27 D) zeigte jeweils starke Signale im meristematischen Gewebe und im Stadium der intensiven Zellexpansion (Stadium I und Stadium III). Bei den Stadien mit beginnender und starker Seneszenz (Stadium VI und Stadium VII) konnten deutlich schwächere Signale detektiert werden, die aber relativ konstant blieben.

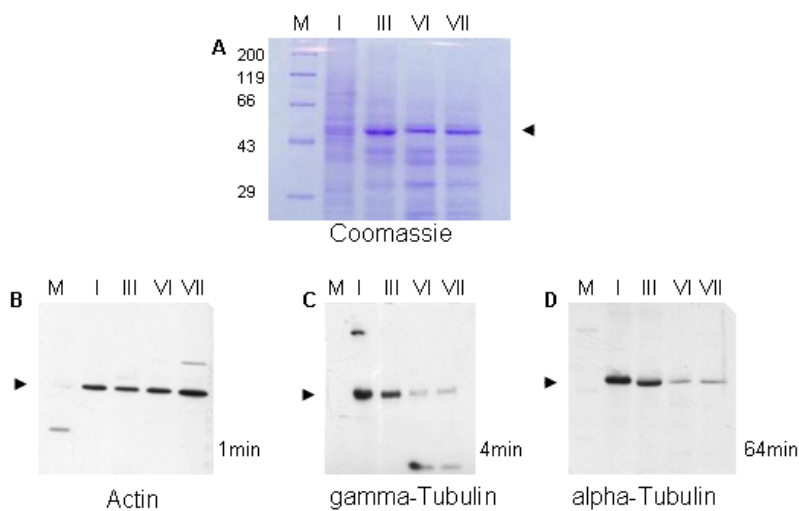


Abb. 3-27: Stadienvergleich I, III, VI, VII des 11. Blatts der Tabakpflanze (SR1). A) Coomassiefärbung des SDS-Gels zur Kontrolle der Proteinextrakte B) Detektion von Actin, Belichtungszeit 1min; C) Detektion von γ -Tubulin, Belichtungszeit 4min; D) Detektion von α -Tubulin, Belichtungszeit: 64min; M) Molekulargewichtsmarker; I) meristematisches Blattgewebe; III) starkes Streckungswachstum; VI) erste Anzeichen von Seneszenz am Blatt; VII) ganze Pflanze seneszent; jeweils 15 μ g Gesamtprotein aufgetragen

3.3.5 Test der Spezifität des Antikörpers auf γ -Tubulin bei anderen Pflanzen

Um eine Aussage der Verwendbarkeit des γ -Tubulin-Antikörpers auf andere Pflanzen zu machen, wurde dieser auf Proteinextrakte von Erbse (*Pisum sativum*), Mais (*Zea mays*) und Bohne (*Vicia faba*) getestet. Als Positivkontrolle diente ein Proteinextrakt der Tabak-Zellsuspensionskultur.

Bei diesem Test zeigten alle drei getesteten Pflanzen ein Signal im Bereich von γ -Tubulin (s. Abb. 3-28).

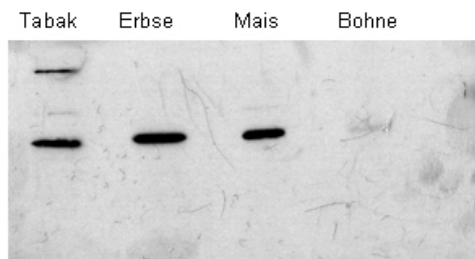


Abb. 3-28: Test der Spezifität des Antikörpers auf γ -Tubulin bei verschiedenen Pflanzen. Tabak-Zellsuspensionskultur (Positivkontrolle), Erbse, Mais und Bohne. Belichtungszeit 32min; jeweils 15 μ g Gesamtprotein aufgetragen

4 Diskussion

γ -Tubulin wurde erstmals in *Aspergillus nidulans* nachgewiesen und in die Tubulin-Superfamilie aufgenommen (OAKLEY, et al. 1989). In den folgenden Jahren konnte es in weiteren untersuchten eukaryotischen Organismen nachgewiesen werden (ZHENG et al. 1991). Daher scheint es voraussichtlich in allen eukaryotischen Organismen aufzutreten. Vergleiche in der Aminosäuresequenz von unterschiedlichen Organismen haben darüber hinaus gezeigt, dass γ -Tubulin in Eukaryoten, einschließlich der Pflanzen, hoch konservativ ist (MARC, 1997).

In tierischen Zellen konnte γ -Tubulin bisher hauptsächlich an den Minus-Enden der Mikrotubuli, in der pericentriolaren Matrix der mikrotubuli-organisierenden Zentren (MTOCs) nachgewiesen werden (z. B. OAKLEY, 2000; STEARNS et al., 1991; ZHENG et al., 1991). Bei Immunfluoreszenzstudien konnte das γ -Tubulin mit Hilfe von γ -Tubulin spezifischen Antikörpern an Centrosomen bei Drosophila, Mensch und Maus detektiert werden (ZHENG et al., 1991). Hier ist es Bestandteil des γ TuRC genannten Protein-Ringkomplexes, dem eine essentielle Rolle bei der Nukleation der Mikrotubuli zugewiesen wird (MURPHY und STEARNS, 1996). Bei tierischen Zellen findet man etwa die Hälfte des vorhandenen γ -Tubulins an die Centrosomen gebunden, die übrigen 50% liegen gelöst im Cytosol vor (STOPPIN-MELLETT et al., 2000). Hierbei wird dem im Cytosol gelösten γ -Tubulin keine nukleierende Funktion zugesprochen; es wird vermutet, dass es sich um eine inaktive Form handelt, die bei Bedarf an das Centrosom gebunden werden kann (OAKLEY, 2000).

Somit gilt zumindest bei den tierischen Zellen als gesichert, dass das Protein γ -Tubulin sowie weitere damit interagierende Proteine einen entscheidenden Einfluss auf die Mikrotubuliassemblierung ausüben (WIESE ET AL., 2000). So zeigten Versuche mit gegen γ -Tubulin gerichteten Antikörpern eine Unterbindung der Mikrotubulineubildung (LODISH et al., 2001). γ -Tubulin spielt bei der Nukleation der Mikrotubuli eine wichtige Rolle, weil es wahrscheinlich die Assemblierung der $\alpha\beta$ -Tubulindimere zu Mikrotubuli einleitet.

Im Vergleich zu pflanzlichen Zellen kann man bei tierischen Zellen eindeutig das Vorhandensein auf den Bereich der Centrosomen beschränken. Bei höheren Pflanzen liegen keine räumlich abgegrenzten MTOCs in Form von Centrosomen vor (VAUGHN

und HARPER 1998). Die Nukleation und Organisation von Mikrotubuli schien dagegen oft an Membransysteme wie die Kernmembran, das Plasmalemma oder das glatte Endoplasmatische Reticulum gekoppelt zu sein (LIU et al., 1993; VAUGHN und HARPER, 1998). Trotzdem wurden in Pflanzen aktive, zu γ -Tubulin homologe Gene gefunden. Darunter bei *Arabidopsis thaliana* (LIU et al., 1994), *Zea mais* (LOPEZ et al., 1995), *Oryza sativa* (KIM et al., 1999) *Nicotiana tabacum* und *Hordeum vulgare* (SCHRÖDER et al., 2002).

Versuche zum Nachweis pflanzlichen γ -Tubulins mittels verschiedener tierischer γ -Tubulin-Antikörper zeigten eine verstreute Anordnung des γ -Tubulins. So wurden punktuelle Vorkommen des Proteins von unterschiedlichen Arbeitsgruppen beschrieben, meist in mehr oder weniger deutlicher Kollokalisierung mit den Mikotubuli. γ -Tubulin wurde im Verlauf der Mitose an typischen Mikrotubuli-Strukturen, sowie entlang kortikaler Mikrotubuli von Interphase-Zellen (LIU et al., 1993; LIU et al., 1994; CANADAY et al., 2000; PANTERIS et al., 2000) detektiert. Eine Kollokalisierung von γ -Tubulin und Mikrotubuli wird daher kontrovers diskutiert wird (z. B. JOSHI und PALEVITZ, 1996; PANTERIS et al., 2000; MURATA et al., 2005). Die Nukleationsstellen für Mikrotubuli scheinen hier diffus in den kortikalen Bereichen des Cytoplasmas oder in den an die Kernhülle grenzenden Cytoplasma in mehr oder weniger punktierter Form vorzuliegen (z.B. CANADAY et al. 2000, PANTERIS et al., 2000).

Zur Klärung der Aufgaben von γ -Tubulin wurden die meisten Versuche mit meristematischem Pflanzengewebe und teilungsaktiven Zellkulturen durchgeführt. γ -Tubulin konnte dort auch in typischen Strukturen der Mitose, sowie in den kortikalen Mikrotubuli von Zellen, die sich in der Interphase befinden, nachgewiesen werden (LAMBERT et al., 1995; CANADAY et al., 2000).

Zusätzlich wurde ein cytosolischer Pool an gelöstem γ -Tubulin sowohl in tierischen als auch in pflanzlichen Zellen nachgewiesen, in dem bis zu 50% des zellulären γ -Tubulins enthalten sein können. Dabei scheint es sich um eine Lager- bzw. Transportform des γ -Tubulins handeln, die keine nukleierende Funktion übernimmt (RAFF, 1996).

Der bisher am besten untersuchte Aufgabenbereich des γ -Tubulis ist die Funktion als Mikrotubuli-Nukleator (OAKLEY, 2000). Diese Funktion lässt die Vermutung zu, dass ein Vorkommen des Proteins vor allem in jungen, meristematischen Geweben notwendig ist, da z.B. beim Aufbau des Spindelapparates Mikrotubuli neu gebildet werden. Dabei wird das γ -Tubulin als Initiationsstelle für die Mikrotubuli benötigt.

Dagegen könnte man daher davon ausgehen, dass γ -Tubulin in älteren Geweben keine Rolle mehr zu spielen scheint. In der eigenen Arbeit (SCHLAG, 2002) deutete sich bei der Untersuchung an Zellstadien der Zellsuspensionskultur aber schon an, dass die mRNA für γ -Tubulin auch außerhalb der Zellteilung in elongierenden und voll elongierten Zellen in detektierbaren Mengen vorhanden ist. Ob diese mRNA aber in dem Protein γ -Tubulin resultiert, konnte noch nicht belegt werden.

Diese Vermutung findet sich auch in der Literatur. So könnte γ -Tubulin über die Zellteilung hinaus zusätzliche Aufgaben übernehmen, wie z. B. die Bildung einer „Kappe“ auf den Minus-Enden der Mikrotubuli, die diese zeitweise vor Depolymerisation schützt (ZHENG et al., 1995; Wiese und ZHENG, 2000). Aber auch eine Mikrotubuli-abhängige Nukleation kortikaler Mikrotubuli, oder γ -Tubulin als organisierender Faktor bei der Umgestaltung oder Stabilisierung des Mikrotubuli-Cytoskeletts in postmitotischen Zellen könnte eine mögliche Aufgabe sein (McDonald et al., 1993; JOSHI, 1996; WASTENEYS, 2002; MURATA, 2005).

4.1 Auswahl des Pflanzenmaterials und Wachstumsverhalten

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde der Gehalt an γ -Tubulin anhand unterschiedlicher Entwicklungsstadien von Pflanzenzellen nachgewiesen. Dabei kamen zwei verschiedene Systeme zum Einsatz. Die Zellsuspensionskultur (BY-2) aus *Nicotiana tabacum* und das Blatt einer *Nicotiana tabacum* Tabakpflanze (SR1).

Die Zellsuspensionskultur (BY-2) wurde als vereinfachtes Modellsystem eingesetzt, welches leicht zu steuern war. Dies gibt aber keine Gewähr, dass die Ergebnisse auf ein komplexes Gewebe zu übertragen sind. Deshalb wurden auch bei einer Tabakpflanze (SR1) verschiedene Blattentwicklungsstadien untersucht.

Während die verschiedenen Entwicklungsstadien der Zellsuspensionskultur bis zum Absterben der Kultur durch Mikroskopie leicht zu verfolgen sind, musste für das Herausdeuten relevanter Blattentwicklungsstadien das Wachstumsverhalten der Pflanze untersucht werden.

Der Ursprung der Blätter bei höheren Pflanzen liegt in der Anlage der Blattprimordien durch das apikale Sproßmeristem. Über Zellteilungen und Zellstreckungsvorgängen im weiteren Wachstumsverlauf der Blattprimordien kommt es zur Ausbildung der Blätter.

Die Blätter junger dikotyler Pflanzen besitzen über die gesamte Blattspreite verteilt meristematische Zonen. Mit zunehmendem Blattalter nimmt die mitotische Aktivität der Zellen von der Blattspitze beginnend zur Basis hin ab. Dabei entsteht ein schwach basipetaler Gradient (STEEVES und SUSSEX, 1989).

Die Charakterisierung des Blattwachstums bei der Tabakpflanze erfolgte über die Messung der Blattlänge und Blattbreite des in der Blattfolge gleichen Blattes unterschiedlich alter Pflanzen. Dabei wurden die Pflanzen mit einem größtmöglichen Abstand zueinander aufgestellt, um eine gegenseitige Beschattung und eine damit einhergehende Verfälschung der Ergebnisse ausschließen zu können.

Nach makroskopischem Auftreten des elften Blattes wurden eine Längenzunahme sowie eine im Vergleich schwächere Breitenzunahme beobachtet. Das Blatt wies nach Beendigung der Wachstumsvorgänge eine lanzettförmige Gestalt auf.

Anhand der Beobachtung des Blattwachstums wurde festgestellt, dass die Blattlänge – bis zur vollen Expansion des Blattes – mit dem Alter korreliert, so dass hier die Blattlänge als Kriterium für den Entwicklungszustand festgesetzt werden konnte. Für ältere Stadien wurden zusätzlich markante Punkte der Pflanzenentwicklung wie die Knospen- oder Fruchtbildung als Kriterien gewählt. Unterschiede in der Größe der Blätter bei ansonsten gleichem physiologischem Zustand waren trotz standardisierter Bedingungen bei der Pflanzenanzucht nicht auszuschließen.

Um Blattgewebe des Tabaks in unterschiedlichen Entwicklungszuständen zu erhalten, wurde das elfte Blatt verschieden alter Pflanzen geerntet. Dafür wurden sieben Differenzierungszustände ausgewählt und als Stadien I bis VII charakterisiert (siehe Tab. 3-1). In den am wenigstens differenzierten Geweben (Stadium I, Blattalter ~1 Tag) waren noch teilungsaktive Zellen enthalten. Aufgrund der starken Flächenzunahme der späteren Entwicklungsstadien war davon auszugehen, dass die meristematische Teilungsphase verlassen wurde (Stadium II-III; 4-10 Tage), und sich mit zunehmendem Blattalter das Streckungswachstum vergrößerte. Da bei Stadium IV (23 Tage) die starke Blattexpansion nachlies, ging man davon aus, dass dieses Stadium nur noch geringes Streckungswachstum aufwies. Ab Stadium V (35 Tage) handelte es sich um voll expandiertes Blattgewebe, das ab dem Stadium VI (60 Tage) deutliche Anzeichen von Seneszenz aufwies.

Diese Verwendung der ausgewählten Stadien in dieser Arbeit ermöglichte einen direkten Vergleich des Gehaltes an γ -Tubulin von meristematischem Gewebe über die Zellexpansion bis hin zu voll expandiertem Gewebe und Seneszenz.

So konnte ein Nachweis von γ -Tubulin angefertigt und die Aussage getroffen werden, ob und in welchem Umfang das γ -Tubulin in Geweben jenseits der Mikrotubuli-Nukleation noch benötigt wird. Mit den Untersuchungen war es erstmals möglich die Zustände der Entwicklungsstadien in der Pflanze, mit denen des Modellsystems Zellsuspensionskultur zu vergleichen und eine Aussage über eventuelle Funktionen des nachgewiesenen γ -Tubulins zu treffen.

4.2 Neues Housekeeping-Gen und Zellteilungsmarker in der PCR

Actin und α -Tubulin wurden als interne Standards verwendet. Diese zeigten bei der Zellsuspensionskultur (BY-2), auf der Ebene der mRNA, gleichmäßige Ergebnisse. Bei den Blattstadien der Tabakpflanze (SR1) nahm der Gehalt in den älteren Stadien ab. Es wurde ein möglichen Housekeeping-Gen und sowie ein Zellteilungsmarker für die PCR gesucht, die an der Zellsuspensionkultur (BY-2) auf ihre Verwendbarkeit getestet wurden.

Als Housekeeping-Gen wurde der Elongationsfaktor-1 α herangezogen (NICOT, 2005). Dieser liefert bei der Zellkultur in allen Stadien ein gleichmäßiges Ergebnis, und könnte somit als Housekeeping-Gen bzw. interner Standard für die PCR verwendet werden. Leider lag zum Testen auf der Proteinebene kein Antikörper vor, daher war der Elongationsfaktor-1 α vorerst nur auf der Ebene der PCR einzusetzen.

Als Marker für zellteilungsaktive Zellen bei der Zellsuspensionskultur (BY-2) sollte die mRNA für Histon H4 eingesetzt werden. Bei dem Histon H4 handelt es sich laut BRANDTSTÄDTER (1993) um einen Marker für Zellteilungen und das Signal verschwindet sobald die Zellen in die Elongation übergehen. Die Signale wurden bei den Stadien der Zellteilung am stärksten detektiert, waren aber in den Stadien der Elongation bis zum Absterben der Zellen zwar schwächer, aber immer noch deutlich nachzuweisen. Daher war der Nachweis der mRNA für Histon H4 nicht als Marker für die Zellteilung bei der Zellsuspensionskultur (BY-2) in der PCR einzusetzen

4.3 Sequenzierung der detektierten mRNA-Signale

Da es sich bei den detektierten Signalen in der PCR in den älteren Zellentwicklungsstadien bei Zellsuspensionskultur (BY-2) und der Tabakpflanze um Amplifikationen von unspezifischen Primerbindungen an die cDNA handeln konnte, wurden die erhaltenen Signale sequenziert. Dadurch war eine Aussage möglich, dass es sich bei den detektierten Signalen wirklich um die gewünschten Nachweise handelte.

Alle zur Sequenzierung eingereichten mRNAs von Zellsuspensionskultur (BY-2) und Tabakpflanze (SR1) zeigten in den Datenbanken die gewünschten Übereinstimmungen. Bei Sequenzvergleichen der erhaltenen Signale von Zellsuspensionskultur (BY-2) für das Stadium 12 konnten die Sequenzen für Actin (U60489), Histon H4 (AB280787), α -Tubulin (AJ421413) und γ -Tubulin (DQ471451), bei Elongationsfactor-1 α Stadium 0 (D63396) und Stadium 6 (D63396) zugeordnet werden. Ebenso war eine Zuordnung bei den Sequenzen der Tabakpflanze (SR1) in den älteren Stadien für Actin (AB158612), α -Tubulin (AJ421413) und γ -Tubulin (AJ278739) möglich.

Aufgrund der erhaltenen Sequenzen und dem Abgleich in den Sequenzdatenbanken konnte betätigt werden, dass es sich bei den untersuchten mRNAs um spezifische Signale in der PCR handelte.

4.4 Entwicklung eines pflanzenspezifischen γ -Tubulin-Antikörpers

In Arbeiten bei denen pflanzliches γ -Tubulin nachgewiesen werden konnte, wurden überwiegend polyklonale Antikörper verwendet. Der von LIU et al. (1993) verwendete polyklonale Antikörper gegen den N-Terminus zum Nachweis von γ -Tubulin (gegen menschliches γ -Tubulin an der Position 38-53 mit der Sequenz EEFATEGTDRKDVFFY [JOSHI et al., 1992]) ließ die Vermutung zu, dass auch mit einem monoklonalen Antikörper Ergebnisse erzielt werden könnten. Der dazugehörige monoklonale Antikörper GTU-88, gegen menschliche γ -Tubulin-Sequenz von Position 38-53, wurde auch in der Arbeit von BINAROVA et al. (2000) eingesetzt, wobei die Ergebnisse als sehr fragwürdig einzustufen sind, da aus der Arbeit nicht eindeutig hervorgeht, welcher Antikörper für welche Versuche verwendet wurde. In der eigenen Arbeitsgruppe wurde versucht, mit dem Antikörper GTU-88, pflanzliches γ -Tubulin auf der Ebene des Western-Blots zu detektieren. Es konnte aber ein dem γ -Tubulin

zuzuordnendes Signal nicht nachgewiesen werden (SIPPEL, 2002). OVECHKINA und OAKLEY (2002) bestätigten diese Ergebnisse in ihrer Veröffentlichung, woraus hervorgeht, dass mit dem monoklonalen Antikörper GTU-88 kein pflanzliches γ -Tubulin nachzuweisen ist.

Mit einem pflanzenspezifischen polyklonalen Antikörper gegen Position 38-53, bei dem die drei zu den Pflanzen verschiedenen Aminosäuren gegen pflanzenspezifische Aminosäuren ausgetauscht wurden, konnten zumindest auf der Ebene des Western-Blots Nachweise erzielt werden (DIBBAYAWAN et al., 2001)

Für die Entwicklung eines Antikörpers spezifisch gegen pflanzliches γ -Tubulin kamen daher die unten aufgeführten Bereiche in Betracht.

Favorisiert wurde ein Bereich der eine große Divergenz zu den tierischen Sequenzen aufweist und eine Antigen-Reaktion auslöst (SCHLAG, 2002). Diese Kriterien erfüllte der Sequenzbereich des γ -B-Peptids (BURNS, 1995) mit seinen peripheren Bereichen (s. Abb. 4-1 blau dargestellt). Es wurde der γ -B-Peptid-Bereich aus *Nicotiana tabacum* (Sequenz: SSYARTKEASQAKY) gewählt, der die oben genannten Kriterien erfüllt. Dieser Bereich besitzt eine große Divergenz zu den tierischen Organismen. Bei dem γ -B-Peptid handelt es sich um einen Bereich, der wie das γ -A-Peptid im C-terminalen Bereich des γ -Tubulins lokalisiert ist. Beim γ -B-Peptid ist bei den höheren Pflanzen eine starke Konservierung festzustellen, nur die Sequenz von *Arabidopsis thaliana* und *Zea mays* besitzen an einer Stelle einen Aminosäureaustausch von Threonin nach Asparagin, welcher die hydrophoben Eigenschaften ein wenig verändert (s. Abb. 4-1). Die flankierenden Bereiche des γ -A-Peptid und γ -B-Peptid weisen sehr starke Homologien innerhalb den Organismen auf. Es wird vermutet, dass die beiden Peptidbereiche im gefalteten Protein an der Außenseite exponiert liegen und so mit den assoziierenden Proteinen interagieren könnten (BURNS, 1995; INCLAN und NOGALES, 2001).

	320	γ-B-Peptid	*	340
Nicotiana_tab	:	KNIMV	SYARTKEASQAKY	ISILNII
Arabid_thalia	:	N.....
Hordeum_vulg	:
Oryza_sativa	:
Zea_mays	:	N.....
Physcom_pat	:
Anemia_phyll	:
Chlamydo_reinh	:	HT...DIAN
Homo_sap1	:	GRDRQ--.NHC..A.....
Homo_sap2	:	GRDRQ--.NHC..A.....
Canis_famil	:	GRDRQ--.NHC..A.....
Dros_melano1	:	GPKS--NHC.....
Dros_melano2	:	ALTDKQ--.RQC.....
Sacch_cerev	:	S.S....	AMN-----NPT.FN.Y.T.
Caeno_eleg	:	TS....	AS.V.--PND..AYMF.
Eugl_gracilis	:	AST.-----RGC.....
Asperg_nidul	:	..R....	INP----SKSSC.....
Ustilago_violac	:	..R....	MPTTP--SRH.C.....
Schizosacch_jap	:	..R....	VNP----GK.SC.....
Schizosacch_pom	:	..Q....	VNP----SKSSC.....
Cochlio_hetero	:	..R....	NPT---SHKSC.....
Physarum_polyc	:	Q.....	SM.-----NG.....
Guillardia_thet	:	IS.N.DL	KSG-----N...S.E.S

Abb. 4-1: Übersicht über das γ -B-Peptid von bekannten γ -Tubulinsequenzen (rot) und die Sequenz gegen die der γ -B-Peptid-Antikörper unter anderem gerichtet ist (blau).

Die Sequenz des γ -B-Peptids wurde an ein künstlich hergestelltes Trägerpeptid (FID33) gekoppelt, wodurch eine verbesserte Antikörperreaktion eingeleitet wurde. Dadurch wurde ein polyklonaler Antikörper erhalten, der aus Mischungen von verschiedenen Antikörpern, gegen das γ -B-Peptid und gegen das FID 33, bestand.

Der Vorteil des polyklonalen Antikörpers war, dass der komplette Peptidbereich des γ -B-Peptids erkannt werden konnte. Ein Nachteil konnte dadurch entstehen, dass auch Antikörper gegen das FID 33 vorliegen konnten. Dies hätte zur Folge haben können, dass der Antikörper nicht nur mit γ -Tubulin reagiert, sondern auch mit anderen Strukturen kreuzreagiert, die der Sequenz des FID 33 entsprechen.

Dies könnte aber bei Bedarf mit einer anschließenden Aufreinigung gegen die γ -B-Peptidsequenz korrigiert werden.

Die zweite zur Immunisierung eingesetzte Sequenz war die pflanzenspezifische JOSHI-Domäne mit dem pflanzenspezifischen Austausch der drei Aminosäuren. Mit dem Austausch der Aminosäuren resultierte die Sequenz CEDFATQGGDRKDVFFY (s. Abb. 4-2), die für die Immunisierung eingesetzt wurde. Diese brachte schon bei DIBBAYAWAN et al. (2001) auswertbare Ergebnisse auf der Western-Blot Ebene.

Joshi

	40	*	60
Nicotiana_tab	: KEGI---	L EDFATQGGDRKDVFFY	QADDQHYIPRAL
Arabid_thalia	: .D.---
Hordeum_vulg	: .D.---
Oryza_sativa	: .D.---
Zea_mays	: .D.---S.
Physcom_pat	: .D.---
Anemia_phyll	:---
Chlamydo_reinh	: .D.R---L.....Q.....
Homo_sap1	: P.A.---	.E...E.T.....
Homo_sap2	: P....---	.E...T.....
Canis_famil	: P....---	.E...T.....
Dros_melano1	: PS....---ND.L.....D.....
Dros_melano2	: PD....---D.Q.....N.....
Sacch_cerev	: TD.-LSQ.	P.SS..RD.DTKP..R.	NSRKNK.T....
Caeno_eleg	: ER.----	QTTHEDDMN.....L.....D.....
Eugl_gracilis	: PD....---L.....
Asperg_nidul	: QD.N---	.E.....	S..TR.....
Ustilago_violac	:---DMT.....
Schizosacch_jap	: PD.T---L.....	S..TR.....
Schizosacch_pom	: PD.T---	.S...V.....	S..TR.....
Cochlio_hetero	: -----	-----	-----
Physarum_polyc	: ...F---	.E.....
Guillardia_thet	: SDFS---	GKNSPT---ND....E	S..ESF....T.

Abb. 4-2: Übersicht über den JOSHI-Bereich von bekannten γ -Tubulinsequenzen (gelb) und die zur Sequenz gegen die der Joshi-Antikörper unter anderem gerichtet ist (blau).

4.4.1 Polyklonaler Antikörper gegen die pflanzliche γ -B-Peptid Sequenz

Der polyklonale Antikörper gegen die pflanzenspezifische γ -B-Peptidsequenz des γ -Tubulin wurde schon im Rahmen der Diplomarbeit von SCHLAG (2002) verwendet. Der Antikörper stammte aus dem Kaninchen 334 (KN 334), das in Kooperation mit der Physiologischen Chemie, Universität Mainz immunisiert wurde.

Dieser Antikörper stand erst gegen Ende der eigenen Diplomarbeit (2002) zur Verfügung. Beim Testen des Antikörpers gegen pflanzliche und tierische Proteinextrakte konnte mit dem γ -B-Peptid Antikörper bei allen eingesetzten Verdünnungen im pflanzlichen Proteinextrakt eine Bande bei über 50kDa detektiert werden, die der Größe des γ -Tubulins entsprach. Eine weitere Bande wurde im Bereich von 20kDa detektiert, die aber durch Antikörper gegen das Trägerpeptid FID 33 innerhalb des polyklonalen Antikörpergemischs erklärt werden konnte. Eine Kreuzreaktion mit dem Sekundär-Antikörper war auszuschließen, da dieser bei allen Untersuchungen in der gleichen Verdünnung eingesetzt wurde. So hätte es bei einer Kreuzreaktion des Sekundär-Antikörpers zu gleich starken Banden bei allen eingesetzten γ -B-Peptid-Antikörper Verdünnungen kommen müssen (SCHLAG, 2002).

Der eigentlich notwendige Test des Präimmunserums von Kaninchen KN 334 wurde im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt. Der polyklonale γ -B-Peptid-Antikörper zeigte im Proteinextrakt der Zellsuspensionkultur (BY-2) eine deutliche Bande bei über 50kda im Bereich des zu erwartenden γ -Tubulins. Der Test des Präimmunserums auf das gleiche Proteinextrakt zeigte genau in diesem Bereich ebenfalls eine schwache Bande (s. Abb. 3-17 rechts Kasten). Aufgrund des Signals mit dem Präimmunserum kann man nicht mit Sicherheit sagen, ob das Kaninchen KN 334 spezifisch auf die Immunisierung reagiert hat, oder ob nicht schon vor dem Immunisieren ein Antikörper im Kaninchen vorhanden war, der im gleichen Bereich auf dem Western-Blot wie γ -Tubulin reagiert, und sich dieses im Laufe des Älterwerdens des Kaninchens verstärkt hat.

Der Nachweis des γ -Tubulins mithilfe des Antikörpers von Kaninchen KN 334 brachte aufgrund des Signals im Präimmunserum keine aussagekräftigen Ergebnisse. Daher wurde ein erneuter Versuch mit zwei Kaninchen in Kooperation mit der Physiologischen Chemie, Universität Mainz gestartet. Nachdem die Kaninchen KN 340 und 341 keine Signale im Präimmunserum zeigten (s. Abb. 3-18 Präimmunserum), wurden beide mit der γ -B-Peptid-Sequenz immunisiert.

Beide Kaninchen KN 340 und KN 341 zeigten im Bereich des zu erwartenden γ -Tubulins ein breites Signal (s. Abb. 3-18; Serum 01. und 27.09.2003), welches eine Aufreinigung der Seren gegen die γ -B-Peptidsequenz notwendig machte. Mit einer Aufreinigung der Seren sollte der Hintergrund des Signals entfernt werden, damit eine deutliche Bande im Bereich des γ -Tubulins zu erkennen war. Nach dem Testen der Eluate auf das Proteinextrakt der Zellsuspensionskultur (BY-2) war eine Reduktion des Signals festzustellen und bei beiden Kaninchen KN 340 und KN 341 trat eine vereinzelte Bande im Bereich von 66 kDa auf (s. Abb. 3-19).

Aufgrund der detektierten Bande von 66 kDa mit den Seren der Kaninchen KN 340 und KN 341 ist zu schließen, dass mit diesen beiden Seren eine Detektion von pflanzlichen γ -Tubulin nicht möglich ist, da das Molekulargewicht von γ -Tubulin bei einer Größe von ca. 52-54 kDa liegt.

4.4.2 Polyklonaler Antikörper gegen die pflanzenspezifische JOSHI-Domäne

Da mit den entwickelten γ -B-Peptid-Antikörpern kein pflanzliches γ -Tubulin nachzuweisen war, blieb nur die Möglichkeit mit einer neuen Sequenz zu immunisieren. Dafür kam die pflanzenspezifische JOSHI-Domäne in Betracht. Damit konnten schon auf der Western-Blot Ebene bei zellteilungsaktiven Stadien Ergebnisse erzielt (DIBBAYAWAN, 2001) werden. Deshalb war mit dieser Sequenz die Wahrscheinlichkeit gegeben, den Verlauf von γ -Tubulin in den Entwicklungsstadien nach der Zellteilung zu verfolgen.

Nach dem Test der Präimmunseren wurden die Kaninchen KN 714 und KN 746 selektiert (s. Abb. 3-20), die zur Immunisierung eingesetzt werden sollten. Diese beiden Präimmunseren zeigten keine nennenswerten Signale. Nach dem Testen der Blutentnahmen wurde das Serum des Kaninchen KN 746 aufgereinigt, da dieses einen gleichmäßigeren Immunisierungsverlauf zeigte (s. Abb. 3-21).

Das erhaltene aufgereinigte Serum von KN 746 wurde auf die Detektion von pflanzlichem γ -Tubulin getestet. Mit dem Test auf das Proteinextrakt der Zellsuspensionskultur (BY-2) zeigte der Antikörper ein Signal im Bereich 54 kDa, der dem γ -Tubulin zuzuordnen ist (s. Abb. 3-22).

Da bei der Gerste der Bereich der Blattentwicklung in dem keine Mikrotubuli vorhanden sind bekannt ist (SCHRÖDER, 2002), wurde dieses System als Testsystem verwendet. Sollte der Antikörper Signale im Bereich von γ -Tubulin bei Zellstadien zeigen, bei denen kein α -Tubulin, als ständiger Bestandteil der Mikrotubuli, mehr nachzuweisen war, konnte man eigentlich davon ausgehen, dass der Antikörper nicht für γ -Tubulin spezifisch ist. Ohne das Vorhandensein von α -Tubulin als ständiger Bestandteil der Mikrotubuli sollte nämlich auch kein γ -Tubulin mehr notwendig sein.

Die Ergebnisse mit der Gerste zeigten schon beim Test auf Extrakte von Meristem und Blattspitze Signale im Bereich von γ -Tubulin. Das Signal im Extrakt der Blattspitze war deutlich schwächer als das Signal im Meristem (s. Abb. 3-22). Beim Test über den Gradienten des Gersteblasses war in den Extrakten der Blattspitze ein Signal für γ -Tubulin und α -Tubulin zu erkennen (s. Abb. 3-23). Somit war ein erstes Indiz dafür vorhanden, dass der Antikörper pflanzliches γ -Tubulin spezifisch erkennt.

Endgültige Klarheit konnte der Test auf überexprimiertes γ -Tubulin bringen. Eine cDNA-Sequenz von γ -Tubulin wurde in einen Expressionsvektor eingeschleust. Es kam zu einer Überexpression von γ -Tubulin in den *E. coli*-Zellen. Auf das Proteinextrakt der *E. coli*-Zellen und das der Zellsuspensionskultur wurde der Antikörper erneut getestet.

Im Proteinextrakt der transformierten *E. coli*-Zellen zeigte der Antikörper ein Signal von über 54kDa im Vergleich zum Signal des Proteinextrakts der Zellsuspensionskultur (BY-2). Dieses war aber mit der Anlagerung eines HisTag an das überexprimierte γ -Tubulin, für eine eventuelle spätere Aufreinigung, zu erklären.

Somit zeigten die Ergebnisse vom Test auf Gerste-Proteinextrakte, Zellsuspensionskultur-Proteinextrakte und auf Proteinextrakte mit überexprimiertes γ -Tubulin, dass der aufgereinigte Antikörper aus Kaninchen KN 746 gegen die pflanzenspezifische JOSHI-Domäne wirklich γ -Tubulin erkennen kann. Damit konnten auch die Ergebnisse in der Arbeit von DIBBAYAWAN et al. (2001) bestätigt werden.

Dieser erhaltene Antikörper aus Kaninchen KN 746 konnte dann für den Nachweis von γ -Tubulin in den Stadien der Zellsuspensionskultur (BY-2) und den unterschiedlichen Blattstadien der Tabakpflanze (SR1) eingesetzt werden.

4.5 Vergleich der Expression von cytoskelett-relevanten Proteinen

Mikrotubuli spielen eine essentielle Rolle in frühen Entwicklungsstadien von Pflanzenzellen, wie bei der Mitose, der Cytokinese und der Zellxpansion. γ -Tubulin konnte bisher vor allem im Zusammenhang mit der Nukleation neuer Mikrotubuli nachgewiesen werden. Die Untersuchungen an unterschiedlichen Entwicklungsstadien von Zellen der Zellsuspensionskultur (BY-2) und Blättern der Tabakpflanze (SR1) sollten Aufschluß geben, ob γ -Tubulin in expandierenden und voll expandierten Zellen über die Zellteilung hinaus auftritt und in welchem Umfang.

Der angestrebte Vergleich von Actin, α - und γ -Tubulin fand auf der Ebene der mRNA, mittels einer RNA-Extraktion aus verschiedenen Entwicklungsstadien der Zellen der Spezies *Nicotiana tabacum* statt. Die mRNA der einzelnen Proteine wurde hierfür mittels reverser Transkription in cDNA umgeschrieben und anschließend mittels PCR amplifiziert. Von γ -Tubulin wird vermutet, dass es unter anderem am Nukleationsprozeß der Mikrotubuli beteiligt ist. Als innere Standards für die PCR wurden Actin und α -Tubulin ausgewählt. Actin ist in den meisten Prozessen, für die das Cytoskelett verantwortlich ist, vor allem Transportvorgänge innerhalb der Zelle, welche auch und gerade in elongierten Zellen stattfinden, beteiligt. Daher wurde davon

ausgegangen, dass es über alle untersuchten Zellstadien annähernd gleich stark exprimiert wird. α -Tubulin, als Bestandteil der Mikrotubuli diene als zweiter Bezugspunkt.

4.5.1 Zellsuspensionskultur (BY-2)

Bei den Stadien der BY-2 Zellkultur (s. Abb. 4-3) hat sich die Erwartung einer annähernd gleichstarken Expression der mRNA für Actin über die fünf Zellstadien hinweg weitgehend bestätigt. Bei den Stadien 0 bis 9 war eine gleichmäßige Expression von Actin festzustellen, die bei Stadium 12 leicht zunimmt. Messungenauigkeiten bei der Photometrie und beim anschließenden Pipettieren der gRNA-Menge für die RT könnten die Erklärung für das Ansteigen des Actin-Signals sein. Im Rahmen des Absterbens der Zelle könnte aber auch ein verstärkter Transportprozess einsetzen, der eine Ansteigerung des Actins bewirkt.

Dieses Ergebnis spiegelt sich auf der Proteinebene wieder. Das Signal für Actin ist in allen Stadien gleichmäßig stark vorhanden, wobei ein Anstieg beim Übergang vom meristematischen Gewebe zur Elongation festzustellen ist. Die veränderten Anordnungen an das Cytoskelett bei der postmitotische Zelle könnten zum Ansteigen des Actingehalts führen. Obwohl die Actin-mRNA im ältesten Stadium zunimmt, bleibt der Gehalt an Actin-Protein im ältesten Stadium gleich. Dies spricht für eine posttranskriptionelle Regulation des Actins.

Die Signale von α -Tubulin ähneln stark den Signalen des Actins auf der mRNA-Ebene. Die Intensität für das α -Tubulin bleibt über die Entwicklungsstadien hinweg gleich stark, lediglich die Signale im Stadium 9 sind etwas stärker ausgeprägt. Aufgrund der Eigenschaften von α -Tubulin als Grundbaustein der Mikrotubuli, war dieses Ergebnis zu erwarten. Auch hier ist die Erklärung für die zwischenzeitliche Zunahme des Signals in Messfehlern in der Photometrie oder des Pipettieren zu suchen, da die restlichen Signale den Erwartungen entsprachen.

Auf der Ebene des Proteins zeigt das α -Tubulin als ständiger Bestandteil der Mikrotubuli im Stadium der Zellteilung das stärkste Signal, dieses nimmt beim Übergang zur Elongation der Zellen ein wenig ab, um dann bei Stadium 12 nochmals weiter abzunehmen.

Dies lässt sich durch eine Umorganisation der Mikrotubuli erklären. Die Zellen gehen aus der Zellteilung heraus und es kommt zu einer Umlagerung der Mikrotubuli zu kortikalen Mikrotubuli. Dabei wird eventuell die Anzahl der Mikrotubuli ein wenig reduziert und α -Tubulin wird abgebaut.

Dieses Ergebnis macht die Verwendung des α -Tubulins als Standard etwas fragwürdig, geht man doch davon aus, dass ein ständiger Bestandteil der Mikrotubuli immer gleichmäßig vorhanden sein sollte. Scheinbar wird das α -Tubulin in den alten Stadien posttranskriptionell reguliert, da das Signal im Vergleich zur mRNA für α -Tubulin abnimmt.

Vergangene Untersuchungen zeigten, dass γ -Tubulin parallel zu mitotischen Vorgängen in der Zelle auftritt. Beim Nachweis von γ -Tubulin in verschiedenen Entwicklungsstadien der Zellsuspensionskultur (BY-2) war auf Ebene der mRNA aber festzustellen, dass das Signal in allen Zellstadien einigermaßen gleichmäßig auftrat. Nur in Stadium 12 nahm das Signal es etwas ab, war aber immer noch ein deutliches nachzuweisen. Eine Erklärung für die Diskrepanz zwischen mitotischem Index und der Genexpression von γ -Tubulin könnte sich durch die biologische Halbwertszeit vom mRNA-Transkript erklären. Die Halbwertszeiten für pflanzliche mRNA werden meist im Stundenbereich angegeben (z. B. JOHNSON et al., 1998), für Tubulin-mRNA aber meist im Minutenbereich (BYRNE et al., 1993). Somit wäre noch der Gehalt von γ -Tubulin-mRNA in den 3 Tage alten auxinfreien Kulturen, nicht aber in den 6-12 Tage alten Kulturen zu erklären. Dieses Ergebnis lässt erst einmal die Vermutung zu, dass γ -Tubulin in den Stadien der Zellteilung benötigt wird. Über die Zellteilung hinaus wird es weiter exprimiert, wobei es aber dann posttranskriptionell reguliert wird.

Aus diesem Grund war es entscheidend neben der mRNA von γ -Tubulin, auch das umgeschriebene Protein γ -Tubulin nachzuweisen. Dies gelang mit dem selbst entwickelten Antikörper (KN 746). Beim Nachweis des γ -Tubulin-Proteins trat das stärkste Signal im Bereich der zellteilungsaktiven Zellen auf. Beim Übergang zur Elongation der Zellen nahm das Signal ein wenig ab, und erst bei den 12 Tage alten Zellen wurde es wieder ein wenig schwächer, war aber auch hier noch deutlich nachzuweisen.

Diese Ergebnisse schließen eine posttranskriptionelle „Down“-Regulation weitestgehend aus. Es wird vielmehr gezeigt, dass das γ -Tubulin nicht nur zellteilungsspezifische Aufgaben erfüllt, wie z.B. die Initiierung der Spindelfasern,

sondern auch weitere Funktionen, die im Zusammenhang mit der Reorganisation des mikrotubulären kortikalen Cytoskeletts stehen (z. B. WASTENEYS 2000; MURATA, 2005), ausfüllt.

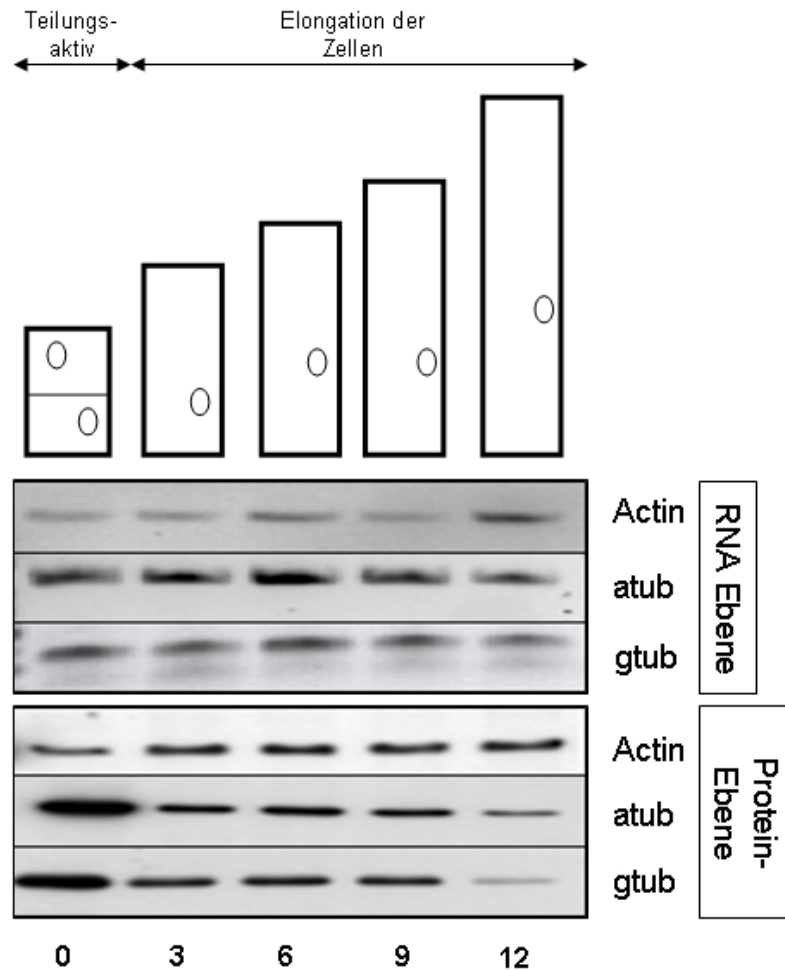


Abb. 4-3: Übersicht über die Stadien der Zellsuspensionskultur (BY-2) und der untersuchten cytoskelett-relevanten Proteine. Dargestellt sind die Signale auf Ebene der mRNA und des Proteins von Actin, α -Tubulin und γ -Tubulin; zusammengestellt aus den Abbildungen des Ergebnisteils

4.5.2 Tabakpflanze (SR1)

Bei der Tabakpflanze (SR1) ergab die Untersuchung von Actin spezifischer mRNA über den gesamten Entwicklungszyklus der Pflanze hinweg eine etwa gleich starke Expression (s. Abb. 4-4 A). Erst nach dem Einsetzen der Blattseneszenz (Stadium VII) nahm die Konzentration an Actin spezifischer mRNA deutlich ab (s. Abb. 4-4 B).

Dieses Ergebnis unterstützt die Vorstellung von Actin als konstitutiv exprimierter Komponente des Cytoskeletts.

Auf der Proteinebene zeigte sich ein dazu abweichendes Bild. Beim Vergleich der Proteinextrakte nahm die Konzentration an Actin von Beginn des Streckungswachstum (Stadium II) bis hin zum voll expandierten Gewebe (Stadium V) kontinuierlich ab (Abb. 4-4 A). Mit einsetzender Seneszenz stieg der Gehalt an Actin wieder an (s. Abb. 4-4 B). In den Stadien VI und VII war der Gehalt an Actin sogar etwas höher als in dem Gewebe, das zur stärksten Zellexpansion (Stadium III) geerntet wurde (vgl. Abb. 4-4 B). Der kontinuierliche Abfall der Proteinkonzentration im Verlauf der Blattentwicklung, und im Gegensatz dazu die eher konstitutive Expression des zugehörigen Gens bis hin zum voll expandierten Gewebe lässt auf eine mögliche posttranslationale Modifikation mit zunehmendem Alter des Gewebes schließen. Bei dem in den Stadien VI und VII in ansteigender Konzentration detektierten Actin könnte es sich um Actinmonomere handeln, die durch den Abbau der Actinfilamente vorübergehend freigesetzt und somit für den Antikörper leichter zugänglich wurden.

Die Beteiligung von γ -Tubulin an der Nukleation der Mikrotubuli legte die Vermutung nahe, dass vor allem im meristematischen Gewebe eine hohe Konzentration an γ -Tubulin nachweisbar ist. Die Ergebnisse der durchgeführten Untersuchungen bestätigen diese Annahme sowohl auf molekularbiologischer als auch proteinbiochemischer Ebene. Die Expression an α -Tubulin war ebenfalls im meristematischen Gewebe am stärksten und nahm mit Nachlassen der mitotischen Aktivität der Zellen ab (s. Abb. 4-4 A und B).

Vom Zeitpunkt der stärksten Zellexpansion über das voll expandierte Gewebe bis hin zur deutlichen Seneszenz blieb die Expression von γ -Tubulin spezifischer mRNA relativ konstant (Stadium III bis VII; Abb. 4-4 a und B). Auf proteinbiochemischer Ebene nahm der Gehalt an γ -Tubulin erst zum Ende der Zellexpansion ab, um dann ebenfalls relativ konstant zu bleiben (Stadium IV und VII; Abb. 4-4 A und B). Die zeitliche Verzögerung von der Expressionsreduktion bis hin zur Abnahme des Proteingehaltes könnte auf eine relativ lange Halbwertszeit des Proteins zurückzuführen sein.

Die Expression von für α -Tubulin spezifischer mRNA nahm dagegen nach Einstellen der mitotischen Aktivität weiterhin kontinuierlich ab, bis sie im ältesten Stadium VII

auf einem kaum detektierbaren Level abgesunken war (s. Abb. 4-4 A und B). Eine Korrelation der Expression von α - und γ -Tubulin spezifischer mRNA konnte daher nicht bestätigt werden. Auf Proteinebene zeigte sich, dass der Gehalt an α -Tubulin vom mitotischen Material über die Zellexpansion bis hin zum voll expandierten Gewebe relativ kontinuierlich abnahm (Stadium II bis V; s. Abb. 4-4 A), um mit einsetzender Seneszenz (Stadium VI und VII; s. Abb. 4-4 B) auf einem sehr geringen Level zu bleiben. Bei diesen geringen Konzentrationen auch im alten Blattmaterial von vorhandenem Protein, könnte es sich um in Mikrotubuli assembliertes α -Tubulin handeln. Dieses weist eine größere Stabilität auf als Tubulinmonomere und könnte daher auch nach Einstellen der Expression des zugehörigen Gens noch in geringer Menge nachweisbar sein. Die Vermutung, dass die nach der Reduktion der Mikrotubuli freigesetzten Tubulinmonomere einer schnellen Derakation unterzogen werden, und dass aus diesem Grund der Abbau der Mikrotubuli mit einer Abnahme des Tubulingehalts einhergeht, konnte durch die erhaltenen Ergebnisse bestätigt werden (HELLMANN, 1995).

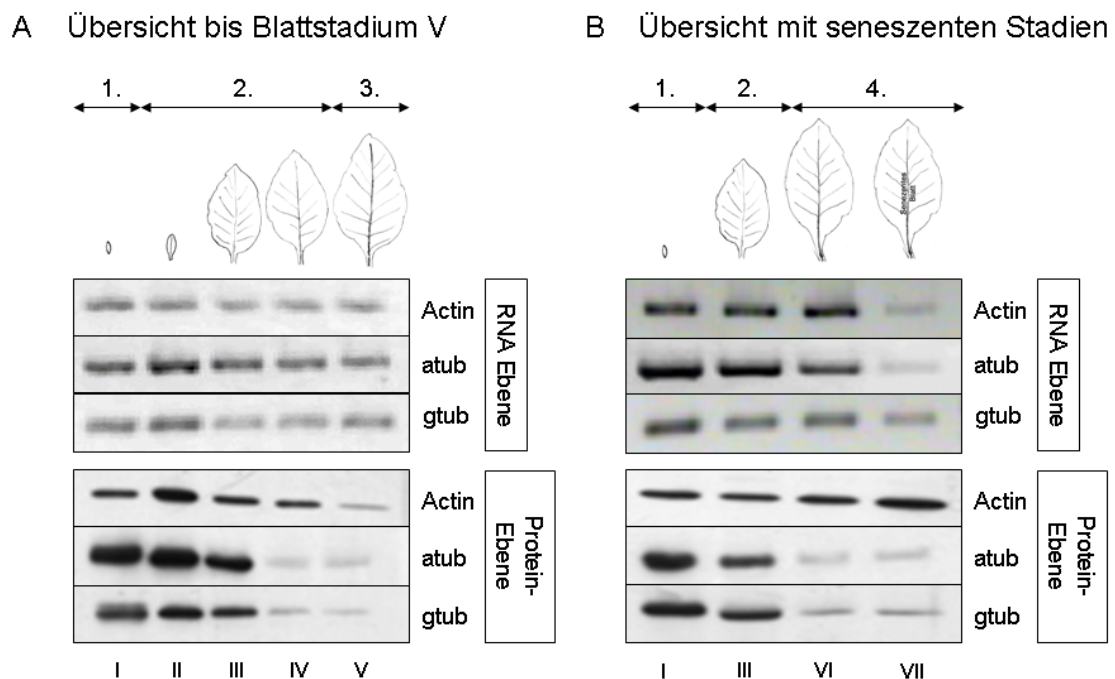


Abb. 4-4: Übersicht von den Blatt-Stadien der Tabakpflanze und der untersuchten cytoskelett-relevanten Proteine. A) Übersicht bis Blattstadium V; B) Übersicht mit seneszenten Stadien. 1. teilunsaktive Zellen; 2. Zunahme Streckungswachstum; 3. Abnahme des Streckungswachstum; 4. Zunahme der Seneszenz.

Dargestellt sind die Signale auf Ebene der mRNA und des Proteins von Actin, α -Tubulin und γ -Tubulin; zusammengestellt aus den Abbildungen des Ergebnisteils.

4.6 Funktion von γ -Tubulin in verschiedenen Zellentwicklungsstadien

Der höchste Gehalt an γ -Tubulin konnte in jungen, mitotischen Zellstadien der Zellkultur und des Blattes nachgewiesen werden, in denen auch die Instabilität der Mikrotubuli ihren Höhepunkt erreicht (LODISH, 2001). In diesen Stadien herrscht aufgrund der starken Nukleationsaktivität für den Auf- und Umbau der Mikrotubuli ein großer Bedarf an γ -Tubulin.

In expandierenden Geweben wird eine Beteiligung des γ -Tubulins an der Nukleation und Umorganisation neuer kortikaler Mikrotubuli beschrieben. Dabei ist bisher aber noch nicht eindeutig geklärt, auf welche Weise das γ -Tubulin an diesem Prozess beteiligt ist (WASTENEYS, 2002; VAN BRUAENE et al., 2004; MURATA, 2005). Die beobachtete Abnahme des γ -Tubulins in beiden untersuchten Systemen vom mitotisch aktiven Gewebe bis hin zur Zellexpansion und die relativ konstante Expression auf diesem Level bestätigt diese Thesen. Aufgaben des Proteins während der Zellexpansion könnten in einer Beteiligung an der Stabilisierung vorhandener Mikrotubuli liegen (PANTERIS, 2000). Der umfangreiche Pool an cytosolischem γ -Tubulin (RAFF, 1996) hat möglicherweise eine ständige Auffüllung durch neu synthetisiertes Protein zur Folge. Dies scheint auch der Nachweis von γ -Tubulin-mRNA in den alten Stadien zu belegen. Während aber im Modell von WASTENEYS, 2002 davon ausgegangen wird, dass nur vorhandenes Protein γ -Tubulin für die Umorganisation der Mikrotubuli verwendet wird, kann man anhand der hier erhaltenen Ergebnisse schließen, dass nicht nur vorhandenes γ -Tubulin verwendet wird. Anscheinend wird für diesen Zweck auch γ -Tubulin neu translatiert.

In Stadien des Absterbens der Zellsuspensionskultur und beim Beginn der Seneszenz der Tabakpflanze konnte immer noch ein konstanter γ -Tubulin-Gehalt nachgewiesen werden. Die Frage, welche Funktionen das in diesem seneszenten Gewebe noch exprimierte γ -Tubulin übernehmen könnte, kann derzeit nicht beantwortet werden. Hier könnte das γ -Tubulin beim Abbau der Mikrotubuli eine aufgabe regulierende Aufgabe übernehmen.

Eine Kreuzreaktion des γ -Tubulin-Antikörpers mit einem anderen Protein vergleichbaren Molekulargewichts kann nicht ausgeschlossen werden. Durch den Test des Antikörpers auf überexprimiertes γ -Tubulin und das positive Signal kann eine unspezifische Reaktion nahezu ausgeschlossen werden.

Auffällig ist in den seneszenten Blattstadien eine weitere Bande mit einem Molekulargewicht von 25 kDa. Eine mögliche Erklärung für dieses Signal ist eine

Kreuzreaktion des polyklonalen Antikörpers mit einem unbekanntem Protein oder Abbauprodukt, das erst in altem Blattgewebe in detektierbarer Menge auftritt. Auffällig ist die Korrelation zwischen der Abnahme der γ -Tubulin-spezifischen Proteinbande mit dem Auftreten der 25 kDa-Bande. Eine genauere Charakterisierung des Proteins könnte möglicherweise Aufschluss über eine Korrelation der beiden Signale geben.

4.7 Test der Spezifität des Antikörpers auf γ -Tubulin bei anderen Pflanzen

Der Test des Antikörpers auf andere Pflanzen (*Vicia faba*, *Zea mays* und *Pisum sativum*) zeigte (s. Abb. 3-28), dass Untersuchungen mit diesem Antikörper auch bei den getesteten Pflanzen durchgeführt werden können. Dieses Ergebnis war bei *Zea mays* zu erwarten, da der Bereich der JOSHI-Domäne zur Tabaksequenz vollständig identisch ist. Bei den anderen war im Voraus keine Aussage zu treffen, da für diese keine Sequenz zur Verfügung stand.

4.8 Ausblick

Bei Nachweisen von pflanzlichen γ -Tubulinen wurden bisher meist nur Antikörper gegen tierisches γ -Tubulin eingesetzt. In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass mit einem pflanzenspezifischen Antikörper das γ -Tubulin im Proteinextrakt von der Gerste, der BY-2 Zellkultur und der SR1-Pflanze von *Nicotiana tabacum* auf der Ebene des Western-Blots reproduzierbar nachzuweisen ist.

Mit dem in der Arbeit verwendeten polyklonalen Antikörper kann in Zukunft in der Immunfluoreszenzmikroskopie getestet werden, um die Bereiche des γ -Tubulins zu detektieren. Auch kann dieser Antikörper auf die Detektierbarkeit von γ -Tubulin bei weiteren Pflanzenspezies getestet werden.

Der zweite Ansatz für die Aufklärung der Aufgaben des γ -Tubulin ist das Einbringen eines GFP- γ -Tubulins in die BY-2 Zellkultur, um auf diese Weise das Vorkommen und die Bereiche des γ -Tubulins in den Entwicklungsstadien der Zelle nachzuweisen.

Eine mögliche Korrelation der Bande bei einem apparenten Molekulargewichts von 25 kDa mit dem Nachlassen der Signalstärke der γ -Tubulin spezifischen Bande, kann durch weitere Charakterisierung dieses Signals untersucht werden.

5 Zusammenfassung

Die wichtigsten Bestandteile des Cytoskeletts in pflanzlichen Zellen sind die Actinfilamente und die Mikrotubuli. Die Mikrotubuli spielen in der Organisation und der Morphogenese von pflanzlichen Zellen eine wichtige Rolle. Sie sind zusammen mit den Cellulosefibrillen an der Formgebung der Pflanzenzelle beteiligt. Sie bilden das Präprophaseband, das die Zellteilungsebene bestimmt und die Mitosespindel, die für die Trennung der Chromosomen sorgt, sowie den Phragmoplasten, der die Zellwand zwischen den Tochterzellen bildet. Weiterhin geben die Mikrotubuli durch Interaktion mit den Cellulose-Synthase-Komplexen die Richtung der Zellexpansion vor (GRANGER und CYR, 2001; LLOYD und CHAN, 2002; BASKIN, 2002). Die Mikrotubuli sind auch an der Stabilisierung der Zellform und an Transportprozessen beteiligt. Als Bestandteil der Mikrotubuli-organisierenden Zentren (MTOCs) wurde das γ -Tubulin identifiziert, das sehr wahrscheinlich an der Nukleation der Mikrotubuli beteiligt ist, indem es die Assemblierung der $\alpha\beta$ -Tubulindimere zu Mikrotubuli einleitet. In tierischen Zellen ist durch intensive Forschung inzwischen relativ viel über die Funktion von γ -Tubulin, vor allem im Verlauf der Zellteilung bekannt, wie z. B. die Lokalisation in Centrosomen mit ihren paarweise angeordneten Centriolen, die die MTOCs darstellen. In pflanzlichen Zellen sind bisher nur wenige Funktionen des Proteins hinreichend geklärt. Die höheren Pflanzen besitzen keine Centriolen und keine Centrosomen. Über die Zellteilung hinaus gibt es kaum Anhaltspunkte über das Vorhandensein oder eventuelle Aufgaben von γ -Tubulin in expandierenden und voll expandierten Zellkulturen und Pflanzengeweben.

In dieser Arbeit wurde die Expression über PCR und die Messung des Proteingehalts von cytoskelett-relevanten Proteinen in den Entwicklungsstadien der Zellsuspensionskultur (BY-2) und von Blattstadien der Tabakpflanze (SR1) von *Nicotiana tabacum* gemessen. Primäres Ziel war es eine Aussage zu erhalten, in welchem Ausmaß γ -Tubulin in expandierenden und voll expandierten Zellen noch exprimiert wird und ob bzw. wie eine Regulation (transkriptionell oder posttranskriptionell) des γ -Tubulins in der Pflanze stattfindet. Für den Nachweis des γ -Tubulins auf der Proteinebene wurde ein pflanzenspezifischer γ -Tubulin Antikörper zu entwickelt.

Bei diesem Antikörper handelte es sich um einen polyklonalen Antikörper, der spezifisch gegen eine Sequenz in pflanzlichem γ -Tubulin gerichtet ist. Dabei zeigte der in der Arbeit entwickelte Antikörper gegen die pflanzliche JOSHI-Domäne spezifische Signale.

Der erfolgte Nachweis von γ -Tubulin auf der Proteinebene und der Transkripte zeigte bis in die ältesten untersuchten Stadien der Zellsuspensionskultur (BY-2) und in Geweben der Blattstadien der Tabakpflanze (SR1) deutliche Signale für γ -Tubulin. Es war somit nicht nur in meristematisch aktiven Zellen und Geweben von *Nicotiana tabacum*, sondern auch in nichtmitotischen Zellen und Geweben vorhanden. Hierbei war über die Phasen der Zellteilung und der Zellformgebung hinweg auf beiden Ebenen eine parallele Entwicklung mit relativ konstanten starken Signalen zu beobachten. Nach dem Einstellen der Teilungsaktivität fiel der Gehalt an mRNA deutlich ab. Dabei nahm die Konzentration des Proteins im Vergleich zur mRNA zeitlich verzögert ab. Diese Ergebnisse bei der Zellsuspensionskultur (BY-2) und Tabakpflanze (SR1) gehen mit der möglichen Nukleationstätigkeit des Proteins konform. Es waren geringere aber doch deutlichen Signale bei Absterbenden Zellen der Zellkultur, bzw. bei expandierenden und voll expandierten und seneszenten Blättern der Tabakpflanze (SR1) nachzuweisen. Dies lässt die Folgerung zu, dass die nachgewiesene mRNA von γ -Tubulin nicht posttranskriptionell reguliert wird, sondern dass das γ -Tubulin auch eine wichtige Rolle außerhalb der Zellteilung in den postmitotischen Stadien, z. B. als organisierender Faktor bei der Umgestaltung oder Stabilisierung des Mikrotubuli-Cytoskeletts, spielt.

Der γ -Tubulin-Gehalt in den Geweben der SR1-Pflanze zeigte über die Zellkultur hinaus, dass die Expression von α -Tubulin nach Einstellen der Teilungsaktivität kontinuierlich abnimmt. Dieses Ergebnis legt die Vermutung nahe, dass γ -Tubulin in älteren Blattgeweben zusätzliche Aufgaben übernehmen könnte, die nicht auf eine gleichzeitige Expression von α -Tubulin angewiesen sind. So kann beispielsweise eine Beteiligung von γ -Tubulin an der Stabilisierung der Mikrotubuli, und damit einhergehend eine Abnahme der dynamischen Instabilität dieser Filamente, eine denkbare Funktion des Proteins in expandierendem und voll expandiertem Gewebe sein. Die Aufgaben von γ -Tubulin in sehr altem Gewebe mit deutlichen Anzeichen der Seneszenz können allerdings nach dem derzeitigen Stand der Forschung nicht eindeutig beantwortet werden und bedürfen weitergehenden Untersuchungen, da dadurch ein die Komplexität und die Dynamik des pflanzlichen Cytoskeletts geklärt werden kann.

6 Literaturverzeichnis

Alberts, B.; Bray, D.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Watson, J. D. (2004)

Molecular Biology of the Cell

VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim; New York; Basel; Cambridge; Tokio

Alvarez, R. C.; Nissen, S. J.; Ernst, S. G. (1994)

Selection, enrichment and initial characterization of an elongated cell culture of tobacco

Plant Science **103**, 73-79

Amos, L.A. (2004)

Microtubule structure and its stabilisation

Org. Biomol. Chem. **2**: 2153-2160

Baskin, T. I. (2002)

The Cytoskeleton (Chapter 5)

In: Biochemistry & Molecular-Biology of Plants

Buchanan, P. B.; Gruessen, W.; Jones, R.L.

American Society of Plant Physiologists

Rockville, Maryland

Binarová, P.; Hause, B.; Dolezel, J.; Dráber, P. (1998)

Association of γ -tubulin with kinetochore/centromeric region of plant chromosomes

The Plant Journal **14**, 751-757

Binarová, P.; Cenkľova, V.; Hause, B.; Kubatova, E.; Lysak, M.; Dolezel, J.;

Bögre, L.; Draber, P. (2000)

Nuclear γ -Tubulin during acentriolar plant mitosis

The Plant Cell **12**, 433-442

Bradford, M. M. (1976)

A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding

Anal. Biochem. **72**, 248-254

Brandstädter, J.; Rossbach, C.; Theres K (1993)

The pattern of histone H4 expression in the tomato shoot apex changes during development

Planta **192**: (1), 69-74

Burns, R. G. (1991)

α -, β -, and γ -Tubulins: Sequence Comparisons and Structural Constraints
Cell Motility and the Cytoskeleton **20**, 181-189

Burns, R. G. (1995)

Analysis of the γ -tubulin sequences: implications for the functional properties of γ -tubulin

Journal of Cell Science **108**, 2123-2130

Bustin S. A. (2000)

Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays

Journal of Molecular Endocrinology **25**, 169-193

Byrne, D. H.; Seeley, K. A.; Colbert, J. T. (1993)

Half-lives of oat mRNAs in vivo and in a polysome-based in-vitro- System

Planta **189**, 249-256

Canaday, J.; Stoppin-Mellet, V.; Mutterer, J.; Lambert, A.-M.; Schmit, A.-C. (2000)

Higher Plant Cells: Gamma-Tubulin and Microtubule Nucleation in the Absence of Centrosomes

Microscopy Research and Technique **49**, 487-495

Chapman, M. J.; Dolan, M. F.; Margulis, L. (2000)

Centrioles and Kinetosomes: Form, Function, and Evolution
The Quarterly Review of Biology **75**, No. 4: 409-429

Cyr, R. J. (1994)

Microtubules in Plant Morphogenesis: Role of the Cortical Array
Annu. Rev. Cell Biol. **10**: 153-180

Cyr, R. J.; Palevitz, B. A. (1995)

Organization of cortical microtubules in plant cells
Current Opinion in Cell Biology **7**: 65-71

Dibbayawan, T. P.; Harper, John D. I.; Marc, J. (2001)

A γ -Tubulin antibody against a plant peptide sequence localises to cell division-specific microtubule arrays and organelles in plants
Micron **32**, 671-678

Durrant, I. (1990)

Light-based detection of biomolecules
Nature **346**, 144-153

Erhardt, M.; Stoppin-Mellet, V.; Campagne, S.; Canaday, J.; Mutterer, J.; Fabian, T.; Sauter, M.; Muller, T.; Peter, C.; Lambert, A.M.; Schmit, A.C. (2002)

The plant Spc98p homologue colocalizes with γ -tubulin at microtubule nucleation sites and is required for microtubule nucleation
Journal of Cell Science **115**, 2423-2431

Erickson, H.P. (2000)

γ -Tubulin nucleation: Template or protofilament?
Nature Cell Biology **2**: E93-E96

Erickson, H. P.; Stoffler, D. (1996)

Tubulin rings are universal polymers of the tubulin family-alpha/beta,
gamma and FtsZ
Journal Of Cell Biology **135**: 5-8

Fuchs, U.; Moepps, B.; Maucher, H. P.; Schraudolf, H. (1993)

Isolation, characterization and sequence of a cDNA encoding γ -tubulin protein
From the fern *Anemia phyllitides* L. Sw.
Plant Molecular Biology **23**: 595-603

Geelen, Danny N.V. and Inzé, Dirk G. (2001)

A Bright Future for the Bright Yellow-2 Cell Culture
Plant Physiology, **127**, 1375-1379

Gerber, M. (1997)

Untersuchungen zur Charakterisierung Mikrotubuli-assoziiierter Proteine im
Blattgradienten der Gerste *Hordeum vulgare*
Dissertation, Institut für Allgemeine Botanik, Johannes Gutenberg-Universität,
Mainz

Goddard, R. H.; Wick, S. M.; Silflow, C. D.; Snustad, D. P. (1994)

Microtubule Components of the Plant Cell Cytoskeleton
Plant Physiology **104**: 1-6

Granger, C.L.; Cyr, R.J. (2001)

Spatiotemporal relationships between growth and microtubule orientation as
revealed in living root cells of *Arabidopsis thaliana* transformed with green-
fluorescent-protein gene construct GFP-MBD
Protoplasma **216**, 201-214

Gunawardane, R. N.; Lizarraga, S. B.; Wiese, C.; Wilde, A.; Zheng, Y. (2000)

γ -Tubulin Complexes and Their Role in Microtubule Nucleation
Current Topics in Developmental Biology **49**: 55-73

Harlow, E.; Lane, D. (1988)

Antibodies – A Laboratory Manual
Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York

Hasezawa, S.; Marc, J; Palevitz, B. A. (1991)

Microtubule reorganization during the cell cycle in synchronized BY-2 tobacco suspensions
Cell Motility and Cytoskeleton **18**, 94-106

Hellman, A. (1995)

Differentielle Expression der Tubulinisotypen im Verlauf der Zellentwicklung bei *Hordium vulgare* L.
Dissertation, Institut für Allgemeine Botanik, Johannes Gutenberg-Universität, Mainz

Hellmann, A.; Meyer, C.U.; Wernicke, W. (1995)

Tubulin Gene Expression During Growth and Maturation of Leaves With Different Developmental Patterns
Cell Motility and the Cytoskeleton **30**, 67-72

Hermes, H. (2007)

Expression von γ -Tubulin in juvenilen, adulten und seneszenten Blättern von *Nicotiana tabacum* L.
Diplomarbeit, Institut für Allgemeine Botanik, Johannes Gutenberg-Universität, Mainz.

Holzhäuer, B. (1992)

Verhalten von Mesophyllprotoplasten isoliert aus unterschiedlich weit differenzierten Blättern von *Nicotiana tabacum*
Diplomarbeit, Institut für Allgemeine Botanik, Universität Mainz

- Horio, T.; Uzawa, S.; Jung, M. K.; Oakley, B. R.; Tanaka, K; Yanagida, M. (1991)**
The fission yeast γ -tubulin is essential for mitosis and is localized at microtubule
Organizing centres
Journal of Cell Science **99**: 693-700
- Hyman, A.; Karsenti, E. (1998)**
The role of nucleation in patterning microtubule networks
Journal of Cell Science **111**, 2077-2083
- Inclán, Y. F.; Nogales, E. (2000)**
Structural models for the self-assembly and microtubule interactions of γ -, δ -
and ϵ -tubulin
Journal of Cell Science **114**: 413-422
- Johnson, M. A; Baker, E. J. Colbert, J.T.; Green, P.J (1998)**
Determinants of mRNA stability in plants. In J.Bailey-Serres an D. R. Gallie
(Eds). A look beyond transcription: Mechanism determining mRNA stability
and translation in plants
American Society of Plant Physiologists 40-53
- Joshi, H. C. (1993)**
 γ -Tubulin: The Hub of Cellular Microtubule Assemblies
Bio Essays **15**: 637-643
- Joshi, H. C.; Palacios, M. J.; McNamara, L.; Cleveland, D. W. (1992)**
 γ -Tubulin is a centrosomal protein required for cell cycle-dependent microtubule
nucleation
Nature **356**: 80-83
- Joshi, H. C.; Palevitz, B. A. (1996)**
 γ -Tubulin and microtubule organization in plants
trends in Cell Biology **6**: 41-44

Kato, K; Matsumoto, T.; Kiowa, A.; Misusage, S.; Nishida, K.; Noguchi, M.; Tami, E. (1972)

Liquids suspension culture of tobacco cells. In G. Terui, ed., Fermentation Technology Today

Society of Fermentation Technology of Japan, Osaka, 689-995

Kellog, D. R., Moritz, M., Alberts, B. M. (1994)

The centrosome and cellular organization

Annu. Rev. Biochem. **63**, 639-674

Khodjakov, A.; Rieder, C. L. (1999)

The Sudden Recruitment of γ -Tubulin to the Centrosome at the Onset of Mitosis and its Dynamic Exchange Throughout the Cell Cycle, Do Not Require Microtubules

The Journal of Cell Biology **146**: 585-596

Khyse-Andersen, J. (1984)

Electroblotting of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose

Biochem. Biophys. Meth. **10**, 203-209

Kinoshita, T; Imamura, J; Nagai, H.; Shimotohno, K. (1992)

Quantification of Gene Expression over a Wide Range by Polymerase Chain Reaction

Anal. Biochem. **206**, 231-235

Kost, B.; Chua, N.-H. (2002)

The Plant Cytoskeleton: Vacuoles and Cell Walls Make the Difference

Cell **108**: 9-12

Kumagai, F., Hasezawa, S. (2000)

Dynamic organization of microtubules and microfilaments during cell cycle progression in higher plant cells

Plant Biol. **3**, 4-16

Lämmli, U. K. (1970)

Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4
Nature **227**, 680-685

Lambert, A.-M. (1995)

Microtubule-organizing centers in higher plants: Envolving concepts
Botanica Acuta **108**, 535-537

Lange, B. M. H. (2002)

Integration of the centrosome in cell cycle control, stress response and signal transduction pathways
Current Opinion in Cell Biology **14**: 35-43

Linsmaier, E. M.; Skoog, F. (1965)

Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures
Physiologia Plantarum **18**, 100-127

Liu, B.; Joshi, H. C.; Wilson, T. J. Silflow, C. D.; Palevitz, B. A.; Snustad, D. P. (1994)

γ -Tubulin in Arabidopsis: Gene Sequence, Immunoblot, and Immunofluorescence Studies
The Plant Cell **6**, 303-314

Liu, B.; Marc, J.; Joshi, H. C.; Palevitz, B. A. (1993)

A γ -tubulin-related protein associated with the microtubule arrays of higher plants in a cell cycle-dependent manner
Journal of Cell Science **104**: 1217-1228

Liu, B.; Marc, J.; Joshi, H. C.; Palevitz, B. A. (1995)

Experimental Manipulation of γ -Tubulin Distribution in Arabidopsis Using Anti-Microtubule Drugs
Cell Motility and the Cytoskeleton **31**: 113-129

Lloyd, C.; Chan, J. (2002)

Helical Microtubule Arrays and Spiral Growth

The Plant Cell **14**, 2319-2324

Lottspeich, F.; Zorbas, H. (1998)

Bioanalytik

Spektrum Akademischer Verlag

Lodish, H.; Berk, A.; Zpusky, S. L.; Matsudaira, P.; Baltimore, D.; Darnell, J. E. (2001)

Molekulare Zellbiologie

Spektrum Akademischer Verlag

Luduena, R. F. (1998)

Multiple Forms of Tubulin: Different Gene Products and Covalent Modifications

International Review of Cytology **178**: 207-275

Machesky, L.M.; Gould, K.L. (1999)

The Arp 2/3 complex: a multifunctional actin organizer

Current opinion in Cell biology **11**, 117-121

Mandelkow, E.; Mandelkow, E. M. (1994)

Microtubule structure

Current Opinion in Structural Biology **4** (2): 171-179

Marc, J. (1997)

Microtubule-organizing centres in plants

trends in plant science **2**: 223-230

Mathur, J.; Mathur, N.; Kernebeck, B.; Hulskamp, M. (2003)

Mutation in actin-related proteins 2 and 3 affect cell shape development in Arabidopsis

Plant Cell **15**, 1632-1645

McDonald, A. R.; Liu, B.; Joshi, H. C.; Palevitz, B. A. (1993)

γ -Tubulin is associated with a cortical-microtubule-organizing zone in the developing guard cells of *Allium cepa* L.

Planta **191**: 357-361

McKean, P. G.; Vaughn, S.; Gull, K. (2001)

The extended tubulin superfamily

Journal of cell science **114**, 2723-2733

Menzel, D. (1993)

Chasing coiled coils: Intermediate filaments in plants

Bot. Acta **106**: 294-300

Moore, R.C.; Zhang, M.; Cassimeris, L.; Cyr, R.J. (1997)

In Vitro Assembled Plant Microtubules Exhibit a High State of Dynamic Instability

Cell Motility and the Cytoskeleton **38**, 278-286

Moritz, M.; Agard, D.A. (2001)

γ -Tubulin complexes and microtubule nucleation

Current Opinion in Structural Biology **11**, 174–181

Moritz, M.; Braunfeld, M. B.; Sedat, J. W.; Alberts, B.; Agard, D. A. (1995)

Microtubule nucleation by γ -tubulin-containing rings in the centrosome

Nature **378**: 638-640

Moritz, M.; Braunfeld, M.B.; Guénebaut, V.; Heuser, J.; Agard, D.A. (2000)

Structure of the γ -tubulin ring complex: A template for microtubule nucleation

Nature Cell Biology **2**: 365-370

Mühlhardt, C. (2002)

Molekularbiologie/ Genomics (3.Auflage)

Spektrum Akademischer Verlag

Murashige, T.; Skoog, F. (1962)

A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures
Physiologia Plantarum **15**: 473-497

Murata, T.; Sonobe, S.; Baskin, T.I.; Hyodo, S.; Hasezawa, S.; Nagata, T.; Horio, T.; Hasebe, M. (2005)

Microtubule-dependent microtubule nucleation based on recruitment of γ -tubulin in higher plants
Nature Cell Biology **7**, 961-968

Murphy, S.M.; Stearns, T. (1996)

Cytoskeleton: Microtubule nucleation takes shape
Current Biology **6**, 642–644

Nagata, T.; Nemoto, Y; Hasezawa, S. (1992)

Tobacco BY-2 cell line as the “HeLa” cell in the biology of higher plants
Int. Rev. Cyt. **132**, 1-30

Nicot, N; Hausman, J.-F.; Hoffmann L.; Evers, D. (2005)

Housekeeping gene selection for real-time RT-PCR normalization in potato during biotic and abiotic stress
Journal of Exp. Botany **56**: (421), 2907-2914

Nohýnková, E.; Dráber, P.; Reischig, J.; Kulda, J. (2000)

Localisation of gamma-tubulin in interphase and mitotic cells of a unicellular eukaryote, *Giardia intestinalis*
European Journal of Cell Biology **79**: 438-445

Nultsch, W. (2001)

Allgemeine Botanik (11. Auflage)
Georg Thieme Verlag (Stuttgart - New York)

Oakley, E. C.; Oakley, B. R. (1989)

Identification of gamma-tubulin, a new member of the tubulin superfamily encoded by mipA gene of *Aspergillus nidulans*
Nature **338**: 662-664

Oakley, B. R. (2000)

γ -Tubulin
Current Topics in Developmental Biology **49**: 27-54

Ovechkina, Y.; Oakley, B. R. (2002)

Gamma Tubulin in Plant Cells
Methods in Cell Biology **67**: 195-211

Paluh, J. L.; Nogales, E.; Oakley, B. R.; McDonald, K.; Pidoux, A. L.; Cande, W. Z. (2000)

A Mutation in γ -Tubulin Alters Microtubule Dynamics an Organization and Is Synthetically Lethal with the Kinesin-like Protein Pkl1p
Molecular Biology of the Cell **11**: 1225-1239

Panda, D.; Miller, H.P.; Banerjee, A.; Luduena, R.F.; Wilson, L. 1994)

Microtubule dynamics in vitro are regulated by the tubulin isotype composition
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **91**, 11358-11362

Panteris, E.; Apostolakos, P.; Gräf, R.; Galatis, B. (2000)

Gamma-tubulin colocalizes with microtubule arrays and tubulin paracrystals in dividing vegetativ cells of higher plants
Protoplasma **210**: 179-187

Picket-Heaps, J. D. (1969)

The evolution of the mitotic apparatus: an attempt ar comparative ultrastructural cytology in dividing plant cells
Cytobios **3**, 257-280

Pinera Alvarez, P. (2006)

Expression von γ -Tubulin im Verlauf der Blattentwicklung des Tabaks
(*Nicotiana tabacum* L.)

Diplomarbeit, Institut für allgemeine Botanik, Universität Mainz

Pirrung, K. (1999)

Untersuchungen zum Vorkommen von posttranslationalen Modifikationen des
Tubulins bei Pflanzen

Diplomarbeit, Institut für Allgemeine Botanik, Johannes Gutenberg-Universität,
Mainz.

**Pokorna, J.; Schwarzerova, K.; Zelenkova, S.; Petrasek, J.; Janotova, I.; Capkova,
V.; Opatrny, Z. (2004)**

Sites of actin filament initiation and reorganization in cold-treated tobacco cells
Plant, Cell and Environment **27**, 641-653

Preble, A. M.; Giddings Jr., T. M.; Dutcher, S. K. (2000)

Basal Bodies and Centrioles: Their Function and Structure
Current Topics in Developmental Biology **49**: 207-233

Raff, J. W. (1996)

Centrosomes and microtubules: wedded with a ring
trends in Cell Biology **6**: 248-251

Rehm, H. (2002)

Proteinbiochemie/ Proteomics (4.Auflage)
Spektrum Akademischer Verlag

Rodrigues-Pousada, C. (2004)

Lupinus albus γ -tubulin: mRNA and protein accumulation during the
development and in response to darkness

Planta **219**: 201-211

Sambrook, J.; Fritsch, E. F.; Maniatis, T. (1989)

Molecular cloning – A laboratory manual

Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York

Sanchez, J.-C. ; Ravier, F.; Pasquali, C. ; Frutiger, S.; Paquet, N; Bjellqvist, B. ; Hochstrasser, D ; Hughes, G. J. (1992)

Improving the detection of protein after transfer to polyvinylidene difluoride membranes

Electrophoresis **13**, 715-717

Schiebel, E. (2000)

γ -tubulin complexes: binding to the centrosome, regulation and microtubule nucleation

Current Opinion in Cell Biology **12**, 113–118

Schlag, S. (2002)

Pflanzliches γ -Tubulin: Versuche zur Quantifizierung der mRNA über PCR und Entwicklung eines polyklonalen Antikörpers gegen eine spezifische Domäne
Diplomarbeit, Institut für allgemeine Botanik, Universität Mainz

Schmit, A.C. (2002)

Acentrosomal microtubule nucleation in higher plants

International Review of Cytology **220**: 257-289

Schröder, J.; Kautz, K.; Wernicke, W. (2002)

γ -Tubulin in Barley and Tobacco: Sequence Relationship and RNA Expression Patterns in Developing Leaves during Mitosis and Post-Mitotic Growth

Plant Cell Physiology **43**: 224-229

Schröder, J.; Stenger, H., Wernicke, W. (2001)

α -Tubulin genes are differentially expressed during leaf development in barley (*Hordeum vulgare* L.)

Plant Molecular Biology **45**: 723-730

Shibaoka, H. (1993)

The use of tobacco BY-2 cells studies of plant cytoskeleton

J. Plant Res. Spezial Issue **3**, 3-15

Shu, H.B.; Joshi, H.C. (1995)

γ -Tubulin Can Both Nucleate Microtubule Assembly and Self-assemble into Novel Tubular Structures in Mammalian Cells

Journal of Cell Biology **130**, 1137-1147

Sippel, C. (2002)

Entwicklung eines Zellkultursystems zur Analyse der Funktion pflanzlicher Mikrotubuli während der Zellteilung und Zelldifferenzierung

Staatsexamensarbeit, Institut für Allgemeine Botanik, Johannes Gutenberg-Universität, Mainz

Sitte, P; Ziegler, H.; Ehrendorfer, F.; Bresinsky, A. (1998)

Lehrbuch der Botanik (Strasburger)

34. Auflage

Gustav Fischer Verlag – Stuttgart

Steeves, T.A.; Sussex, I.M. (1989)

Patterns in plant development

Cambridge University Press, Cambridge

Stearns, T.; Evans, L.; Kirschner, M. (1991)

γ -Tubulin Is a Highly Conserved Component of the Centrosom

Cell **65**: 825-836

Stoppin-Mellet, V.; Peter, C.; Lambert, A.M. (2000)

Distribution of γ -Tubulin in higher plant cells: Cytosolic γ -tubulin is part of high molecular weight complexes

Plant Biology **2**: 290 – 296

Takeoka, A.; Shimizu, M.; Horio, T. (2000)

Identification of an α -Tubulin mutant of fission yeast from γ -Tubulin-interacting protein screening: genetic evidence for α -/ γ -Tubulin interaction
Journal of Cell Science **113**: 4557-4562

Towbin, H.; Stehlein, T.; Gordon, J. (1979)

Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications
Proc. Nat. Acad. Sci. USA **76**, 43550-43554

Van Bruaene, N.; Joss, G.; Van Oostveldt, P. (2004)

Reorganization and *in vivo* dynamics of microtubules during *Arabidopsis* root hair development
Plant Physiol. **136**, 3905-3919

Vaughn, K. C.; Harper, J. D. I. (1998)

Microtubule organizing centers and nucleating sites in land plants
Int. Rev. Cytol. **181**: 75-149

Wasteneys, G.O. (2002)

Microtubule organization in the green kingdom: chaos or self-order?
Journal of Cell Science **115**, 1345-1354

Wiese, C.; Zheng, Y. (2000)

A new function for the γ -tubulin ring complex as a microtubule minus-end cap
Nature Cell Biology **2**, 358-364

Zheng, Y.; Jung, M. K.; Oakley, B. R. (1991)

γ -Tubulin is present in *Drosophila melanogaster* and *Homo sapiens* and is associated with the centrosome
Cell **65**: 817-823

Zheng, Y.; Wong, M. L.; Alberts, B.; Mitchison, T. (1995)

Nucleation of microtubule assembly by a γ -tubulin-containing ring complex

Nature **378**: 578-583

7 Anhang

7.1 Verwendete Chemikalien

Alle Chemikalien, die hier nicht aufgeführt sind oder im Text extra benannt werden, wurden von der Firma Merck bezogen.

Acrylamid	Serva, Heidelberg
Agarose QualexGold.....	Hybaid, Heidelberg
APS	Bio-Rad, München
Bisacrylamid	Serva, Heidelberg
Bromphenolblau.....	Serva, Heidelberg
BSA.....	Boehringer, Mannheim
Coomassie brilliant blue R-250	Serva, Heidelberg
dNTPs	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Fluka, Buchs, Schweiz
Glucose	Serva, Heidelberg
Glycerol	Serva, Heidelberg
Glycin.....	Roth, Karlsruhe
Kaliumhydrogenphosphat.....	Fluka, Buchs, Schweiz
Kaliumjodid	Fluka, Buchs, Schweiz
Magermilchpulver.....	Ferma Reform, DeVauGe
.....	Gesundkostwerd, Lüneburg
MES	Serva, Heidelberg
2-Mercaptoethanol	Serva, Heidelberg
myo-Inosit.....	Serva, Heidelberg
Na ₂ -EDTA	Serva, Heidelberg
Ponceau-S-Red.....	Sigma, Deißenhofen
Saccharose	Fluka, Buchs, Schweiz
SDS Ultrapur.....	Roth, Karlsruhe
TEMED.....	Serva, Heidelberg
Tris	Roth, Karlsruhe
Triton-X-100.....	Serva, Heidelberg

Thiamin.....	Serva, Heidelberg
Tween 20.....	Roth, Karlsruhe

7.2 Abkürzungen

A.....	Absorption
abs.....	absolut
Acryl/Bisacryl.....	Acrylamid-N-N-Methylenbisacrylamid
APS.....	Ammoniumpersulfat
AS.....	Aminosäure
ATP.....	Adenosintriphosphat
bp.....	Basenpaare
BSA.....	Bovine Serum Albumin
Bsp.....	Beispiel
°C.....	Grad Celsius
cDNA.....	complementary DNA (komplementäre DNA)
Chl.....	Chloroform
2,4-D.....	2,4-Dichlorphenoxyessigsäure
dATP.....	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP.....	Desoxycytosintriphosphat
ddH ₂ O.....	deionisiertes zweifach destilliertes Wasser
dGTP.....	Desoxyguanosintriphosphat
DIC.....	Differential Interference Contrast
DNA.....	Desoxyribonuclein Acid
dNTP.....	Desoxynukleosidtriphosphat
DTT.....	1,4-Dithiotreitol
dTTP.....	Desoxythymidintriphosphat
ECL.....	Enhanced chemiluminescence
EDTA.....	Ethylendiamintetraacetic acid
EthBr.....	Ethidiumbromid
EtOH.....	Ethanol
FG.....	Frischgewicht
gRNA.....	gesamt-RNA

kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
MES	Morpholinoethansulfonsäure
MP	Milchpulver
mRNA	messenger Ribonucleic acid (Boten-RNA)
MT	Mikrotubuli
MTOC	Microtubule organizing center
OD	optische Dichte
p.A.	pro Analysis
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	polymerase chain reaction (Polymerasekettenreaktion)
pDNA	Plasmid-DNA
PPB	Präprophaseband
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RNA	Ribonucleic acid
RNase	Ribonuklease
rpm	rotations per minute (Umdrehungszahl)
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkription mit folgender PCR
SDS	Sodium Dodecyl Sulfat
sddH ₂ O	steriles (→ ddH ₂ O)
<i>Taq</i>	<i>Thermophilus aquaticus</i>
TBE	Tris Borat EDTA
TBS	Tris Buffered Saline
TBST	TBS-Tween 20-Puffer
TE	Tris EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit (Enzymeinheit)
ü.N.	über Nacht
UV	Ultraviolett
Vol.	Volumen
v/v	Volumen pro Volumen

w/v Gewicht pro Volumen
 z.B. zum Beispiel

7.3 Symbole für die Darstellung der Aminosäuren

Alanin.....	A	Leucin.....	L
Arginin.....	R	Lysin.....	K
Asparagin.....	N	Methionin	M
Asparaginsäure.....	D	Phenylalanin	F
Cystein.....	C	Prolin.....	P
Glutamin	Q	Serin	S
Glutaminsäure.....	E	Threonin	T
Glycin.....	G	Tryptophan	W
Histidin.....	H	Tyrosin	Y
Isoleucin.....	I	Valin.....	V

7.4 Alignment von γ -Tubulin-Sequenzen

Joshi-Antikörper

	*	20	*	40	*	
Nicotiana_tab	:	MP--REIITLQVGQCGNQIGMEFWKRLCLEHGISKEGI	---	LED	FATQGG	: 45
Arabid_thalia	:	Q.....	D.---	: 45
Hordeum_vulg	:	Q.....	G.D.---	: 45
Oryza_sativa	:	Q.....	G.D.---	: 45
Zea_mays	:	Q.....	G.D.---	: 45
Physcom_pat	:	Q.....	D.---	: 45
Anemia_phyll	:	Q.....	---	: 45
Chlamydo_reinh	:N.....	S.....	Q.....	A.D.R---L.. : 45
Homo_sap1	:	F...Q..	A...P.A---	E.....	T : 45
Homo_sap2	:	F...Q..	A...P.---	E.....	T : 45
Canis_famil	:	F...Q..	A...P.---	E.....	T : 45
Dros_melano1	:	---S.....	F.....	PS.---ND.L	: 45
Dros_melano2	:	---S.....	F.....	PD.---D.Q	: 45
Sacch_cerev	:	.G--G.....	A.....	H..KFL.SQ.AK..	A.GTD.-LSQ.P.SS..	RD : 47
Caeno_eleg	:	.SGTGA....	H.....	AQA...S.VD...	NER.---	QTTHEDDMN : 46
Eugl_gracilis	:	C.....	T...Q..	A...NPD.---L.. : 45
Asperg_nidul	:	A...N..	S...QQ.....	QD.N---	E..... : 45
Ustilago_violac	:	SA..A...	S...SQ..	A.....	---DMT : 45
Schizosacch_jap	:	.G--.....	A.....	S...QQ.....	CPD.T---L : 45
Schizosacch_pom	:	.G--.....	A.....	S...QQ.....	GPD.T---	S.....V : 45
Cochlio_hetero	:	-----	-----	-----	-----	----- : -
Physarum_polyc	:	Q..A...N...F---	E.....	: 45
Guillardia_thet	:	.N--N.....	KT.ILT.N...	S.VR.KN.LSDFS---	GKNSPT--	: 43

	60	*	80	*	100	
Nicotiana_tab	: DRKDVFFY	QADDQHYIPRALLMDLEPRVINGIQNGE	-YRNLYNHENVFIA	:	94	
Arabid_thalia	:	D-	94	
Hordeum_vulg	:	S.-	94	
Oryza_sativa	:	S.-	94	
Zea_mays	:	S.....	S.-	94	
Physcom_pat	:	S...S.-	94	
Anemia_phyll	:	S.-	94	
Chlamydo_reinh	:	Q.....	TSD-L.....	P.....	S : 94	
Homo_sap1	:	HS.L.SP-	AK...P.....	S : 94	
Homo_sap2	:	HS.L.SP-	AK...P.....	S : 94	
Canis_famil	:	HS.L.SP-	AK...P.....	S : 94	
Dros_melano1	:	D.....	T.MGSV-	SK...P.....	S : 94	
Dros_melano2	:	N.....	N.MTSP-	SK...Q.....	S : 94	
Sacch_cerev	: .DTKP..R.NSRNK.T.....	S..S..AD.--ENT..GF..PR.T...	:	95		
Caeno_eleg	:	L.....D.....	MQSPN.S....	TD.....	S : 96	
Eugl_gracilis	:	T.RT.-	P.....	S : 94
Asperg_nidul	:	S..TR.....	S.P-	P..F..G : 94	
Ustilago_violac	:	S.KS.P-	P..F.YD : 94	
Schizosacch_jap	:	S..TR.....	N.LSDT-	GS...P.....	: 94	
Schizosacch_pom	:	S..TR.....	N.LSDT-	GS...P...L.T	: 94	
Cochlio_hetero	:	-----	A.....	HS..ASP-	P..F..H : 29
Physarum_polyc	:	S.T.SD-	AK...S.....	S : 94	
Guillardia_thet	: -ND....E.S.ESF....	T..F..SE.DF.Y.MKSN-	SK...KNRH..L	:	91	

	*	120	*	140	*	
Nicotiana_tab	: DHGGGAGNNWASGYHQGKQYEEEDLMDMIDREADGSDSLEGFVLCHSIAGG	:	144			
Arabid_thalia	:	GV..E.....	:	144		
Hordeum_vulg	: E.....	E.VVD.....	:	144		
Oryza_sativa	: E.....	E.VVD.....	:	144		
Zea_mays	: E.....	E.VD.....	:	144		
Physcom_pat	:	E.V.....	:	144		
Anemia_phyll	:	E.V.....	:	144		
Chlamydo_reinh	: KE.....	T..EAV..T.....	EYC.....	N.....	: 144	
Homo_sap1	: E.....	S..EKIH...F.....	:	144		
Homo_sap2	: E.....	S..EKIH...F.....	:	144		
Canis_famil	: E.....	S..EKIH...F.....	:	144		
Dros_melano1	: K.....	S..EKL..E.F.....	:	144		
Dros_melano2	: K.....	S..EKV..E.F.....	:	144		
Sacch_cerev	: SD.AS...S..N..DI..TRN.D....	K...I.S..NF...Q.L.....	:	145		
Caeno_eleg	:	C..Q.V..K.....	I...EN..N.D.I.FT...S..	:	146	
Eugl_gracilis	: ED.....	V..EKADKVS.....	E.....	V.....	: 144	
Asperg_nidul	: QQ.I.....	GA..AA.EVV..E.F.....	FL.....	:	144	
Ustilago_violac	: PQ.....	K..AA.ERVY.E..E.....	E.....	L.....	: 144	
Schizosacch_jap	: TD.....	H..AHAEKIF.....	E.....	S.L.....	: 144	
Schizosacch_pom	: KN.....	N..SHAERIF.....	S.L.....	:	144	
Cochlio_hetero	: KD.T.....	GM..SM.E.VH...W.....	L.....	:	79	
Physarum_polyc	: PE.....	S.AEKVN.AT.E.....	:	144		
Guillardia_thet	: .KN--T..S.LK..Y..ISNCNL.D...R.RIEKM...KY.N.FN..N..	:	139			

	160	*	180	*	200			
Nicotiana_tab	: TGSGMGSYILETLNDRYSKKLVTYSVFPNQ		QN	--ETSDVVVQPYNSLLTL		: 192		
Arabid_thalia	:		M--		: 192		
Hordeum_vulg	:		M--		: 192		
Oryza_sativa	:		M--		: 192		
Zea_mays	:		V--		: 192		
Physcom_pat	:	A		M--		: 192		
Anemia_phyll	:	A		M--		: 192		
Chlamydo_reinh	:	L.S		S--		: 192		
Homo_sap1	:	R	P	--M		: 192		
Homo_sap2	:	R	P	Y--M		: 192		
Canis_famil	:	R	P	--M		: 192		
Dros_melano1	:	R.A	P	--I		: 192		
Dros_melano2	:	R.SE	P	--I		: 192		
Sacch_cerev	:	N	A.C	P	T	AR---E...S...A	: 191	
Caeno_eleg	:	T	L	R	REA	P	A.S--T...H...W	: 194
Eugl_gracilis	:	K	P		SDK	G		: 194
Asperg_nidul	:	R	P		TQ--AA-	N...A	: 191	
Ustilago_violac	:	R	P		A--SG-		: 191	
Schizosacch_jap	:	R	P		NR--SV		: 192	
Schizosacch_pom	:	R	P		SQ--SV	A	: 192	
Cochlio_hetero	:	R	P		TQ--DG-		: 126	
Physarum_polyc	:	Q	H	P	----		: 189	
Guillardia_thet	: ..A..S		Y.R.N.P	SF.NCC		LYG--N.Q.TF	: 187	

	*	220	*	240	*		
Nicotiana_tab	: -KRLTLNADCVVVLDNTALNRI		AVERLHITTP	TF	QAQTNSLVSTVMSASTT	: 241	
Arabid_thalia	: -.....		G	N	: 241	
Hordeum_vulg	: -.....		AN		: 241	
Oryza_sativa	: -.....		AN		: 241	
Zea_mays	: -.....		N		: 241	
Physcom_pat	: -.....		D	PN	: 241	
Anemia_phyll	: N.....		D	PN	: 242	
Chlamydo_reinh	: -.....	H.A		HK.DVQ	I...A...A	: 241	
Homo_sap1	: -.....	Q		TD	QN...S.I.Q	: 241	
Homo_sap2	: -.....	Q		TD	QN...S.I.Q	: 241	
Canis_famil	: -.....	Q		T	TN...QN...F.I.Q	: 241	
Dros_melano1	: -.....	TA..S		CD	QN...S.I.N...V	: 241	
Dros_melano2	: -.....	KC..S		T	Q...T.I.N...L	: 241	
Sacch_cerev	: -.....	IE.S.AT..F	AS.LN	SGKVFRNP	NIDLQH..QSV.N	: 240
Caeno_eleg	: -Q..	IE.P.H		A..H..AG	FKTD...DHI...AR...T..A	: 243	
Eugl_gracilis	: -.....			V	P...S..A...A	: 243	
Asperg_nidul	: -.....	Q..S		A..S	VAD...QE...Q..R	: 240	
Ustilago_violac	: -.....	NH..S		A..S	CQD...QVA...QQ	: 240
Schizosacch_jap	: -.....	A		A..AH	AD...QN...H.Q.Q	: 241	
Schizosacch_pom	: -.....	S		A..AH	AD...TQN...H.Q.Q	: 241	
Cochlio_hetero	: -.....	Q		S	G..T..AD...M...E...Q	: 175	
Physarum_polyc	: -.....	A		H..F	SA...AQ..V	: 238	
Guillardia_thet	: -AWQG	YC.SN	FFQ.H	EN	LTKNQINNEL..RKV.Y..GKT..IIMN	: 236	

γ -A-Peptid

	260	*	280	*	300	
Nicotiana_tab	:	TLRYPGYMNDLVGLLASLIPTPRCHFLMTGYTPLT		VERQA	-----	NVIR : 286
Arabid_thalia	:		: 286
Hordeum_vulg	:A.....		V-----		: 286
Oryza_sativa	:		V-----		: 286
Zea_mays	:		V-----		: 286
Physcom_pat	:		-----	A..	: 286
Anemia_phyll	:		-----	A..	: 287
Chlamydo_reinh	:		A.NA.G-QVTSN..		: 290
Homo_sap1	:L.....		TD-----	QSVAS..	: 286
Homo_sap2	:L.....		TD-----	QSVAS..	: 286
Canis_famil	:L.....		TD-----	QSVAS..	: 286
Dros_melano1	:S.....T.P.....QL.....		SDSDIHTQQLVN..		: 291
Dros_melano2	:S.....T.....QL.....		MSDC..KTS----		: 287
Sacch_cerev	:S..YSS.SS.YS.....EL...SPS...F.SDYIHD---		DIAH..		: 287
Caeno_eleg	:	PY..NSA.CPS.R--YLD.A.F.PM...Q.AI...VDPN.N-----		FT..		: 285
Eugl_gracilis	:		T.....	DPNIQ----	MT.. : 289
Asperg_nidul	:H.....S.....S...F.GDNIDQ---		AKT..		: 287
Ustilago_violac	:		T.S...F.SD.IEQ---	AKA..	: 287
Schizosacch_jap	:S.....S...F.S.QVED---		ART..		: 288
Schizosacch_pom	:S.....S...F.N.QVEE---		AKA..		: 288
Cochlio_hetero	:A.SH.....S...-F.G.NVEQ---		AKT..		: 221
Physarum_polyc	:		D..R-----	QN.H	: 283
Guillardia_thet	:	..NHN----FT.ET..SP..VN.YLNLFF.TINIDI..LSKLR-----		K..		: 276

 γ -B-Peptid

	*	320	*	340	*	
Nicotiana_tab	:	KTTVLDMRRLQLQTKNIMVSSYARTKEASQAKYISILNIIQGEVDPTQVH				: 336
Arabid_thalia	:N.....				: 336
Hordeum_vulg	:				: 336
Oryza_sativa	:N.....				: 336
Zea_mays	:				: 336
Physcom_pat	:A.....				: 336
Anemia_phyll	:A.....				: 337
Chlamydo_reinh	:P.....HT...DIAN..				: 340
Homo_sap1	:P.....GRDRQ--.NHC..A.....				: 334
Homo_sap2	:P.....GRDRQ--.NHC..A.....				: 334
Canis_famil	:P.....GRDRQ--.NHC..A.....				: 334
Dros_melano1	:P.....GPDKS--NHHC.....				: 339
Dros_melano2	:P.....ALTDKQ--.RQC.....				: 335
Sacch_cerev	:	GH.SY...LD..DPS.S...AMN-----NPT.FN.Y.T.I.N.E.R..S				: 332
Caeno_eleg	:A..T.F..KPTS...AS.V.--PNDCM..AYMF...EAHT.M				: 333
Eugl_gracilis	:SP.....AST.-----RGC.....D..G...				: 334
Asperg_nidul	:P..R...INP----SKSSC.....A..D..				: 333
Ustilago_violac	:P..R...MPTTP--SRH.C.....D..				: 335
Schizosacch_jap	:P..R...VNP----GK.SC.....A..ND..				: 334
Schizosacch_pom	:LP..Q...VNP----SKKSC.....A..AD..				: 334
Cochlio_hetero	:P..R...NPT---SHKSC.....AKPT.Q---				: 265
Physarum_polyc	:PQ.....SM.-----NG.....				: 328
Guillardia_thet	:	.P...ENKTNQ.NEIS.N.DLKSG-----N...S.E.SNR--.FYK.F				: 317

	360	*	380	*	400	
Nicotiana_tab	: ESLQRIR-ERKLVNFIDWGPASIQVALSRKSPYVQT---				AHRVSGMLMLAS	: 382
Arabid_thalia	:	E		---		: 382
Hordeum_vulg	:	E		---	T.....N	: 382
Oryza_sativa	:	E		---	T.....N	: 382
Zea_mays	:	Y.A		---	T.....N	: 382
Physcom_pat	: K.....	A..E		---		: 382
Anemia_phyll	: K.....	A..E		---		: 383
Chlamydo_reinh	: K.....	QA..E		---		: 386
Homo_sap1	: K.....	A..P		---	P.....N	: 380
Homo_sap2	: K.....	A..P		---	P.....N	: 380
Canis_famil	: K.....	A..P		---	P.....N	: 380
Dros_melano1	: K.....	D..AQ..P..T		---	S.....N	: 385
Dros_melano2	: K.....	A..P		---	P.S.....N	: 381
Sacch_cerev	: RA.T..Q---	QR.K.PS.SSSA.H.N.G			PLQPNENE.....SN	: 379
Caeno_eleg	: TAE.N.DFAI.RPP.YMLK.LR.MH.P--L....			RP---	QY.....NN	: 378
Eugl_gracilis	: K.....	AT..P		---		: 380
Asperg_nidul	: K..L...	AS..P		N---	T.....N	: 379
Ustilago_violac	: K..L...	NSAT..P		---	Q.....T.....N	: 381
Schizosacch_jap	: K..L...	AT..P		K---	N.....N	: 380
Schizosacch_pom	: K..L...	YAS..P		K---	N.....N	: 380
Cochlio_hetero	: -----					: -
Physarum_polyc	: N...G..	AS		K---		: 374
Guillardia_thet	: ANSIYD.IFYDQTR.YSQLLNQYDSV.INNNVKK.N-----				YS.LTY.LN	: 362

	*	420	*	440	*	
Nicotiana_tab	: HTGIRHLFSKCLSQYDKLR----		KRQAF	LDNYRNHPTFADND-----	LS	: 422
Arabid_thalia	: ..S.....			KF.M.....	-----	: 422
Hordeum_vulg	: ..S.....	G..E		KF.M.....	-----	: 422
Oryza_sativa	: ..S.....	G..E		KF.M.E.....	-----	: 422
Zea_mays	: ..S.....	G..E		KF.M.....	-----	: 422
Physcom_pat	: ..S.....	E		KF.M.....	-----	: 422
Anemia_phyll	: ..S.....	N..E		KF.M.....	-----	: 423
Chlamydo_reinh	: ..S.....	N.V.RD.E		MGPKQE....QA...V.R...	AAGGGTAL.E	: 436
Homo_sap1	: ..S.SS..E.TCR.....		EQ..	KEDM.K..F-----	D	: 419
Homo_sap2	: ..S.SS..E.SSCQ.....		D..EQ..	KEDM.K..F-----	D	: 419
Canis_famil	: ..S.SS..E.TCR.....		EQ..	KEDI.KE.F-----	D	: 419
Dros_melano1	: ..S.CS..E.A.N..N.....		G...Q..	REDI.K..L-----	N	: 424
Dros_melano2	: ...SS..K.A.A.....		N.....	RESM.Q..L-----		: 420
Sacch_cerev	: M.T.VN..ENACNT....	F----	A.G.....	NVGD.L.QSMQN----	VQD	: 421
Caeno_eleg	: S.S.AP..ESL..K.....		S.R...K.EKIDN.SL.M-----			: 416
Eugl_gracilis	: ..S.AN..A.T..N.....		S...V.TKTDL.K.GL-----		E	: 419
Asperg_nidul	: ..S.AT..K.I.Q.....		N...EQ..	KEAP.Q.GL-----	D	: 418
Ustilago_violac	: ..N.AS..K.T.A...Q.....		N...PQ.QKEAM.EK.L-----		D	: 420
Schizosacch_jap	: ..S.AS..K.T.D.....		N...Q..	KESI.E.SL-----	D	: 419
Schizosacch_pom	: ..S.AS..K.T.D.....		N...EQ..	KEAI.E..L-----	N	: 419
Cochlio_hetero	: -----					: -
Physarum_polyc	: ..S.HS...QI.K...T.....		HN.....	VKESI.S.SL-----	D	: 413
Guillardia_thet	: ..SFNP.IK.I.QN.EL.....		N...EY.CGEILLDEA.-----			: 401

	460	*	480	*	500	
Nicotiana_tab	:	EFDESRDVIESLVDEYKACESPDYIKRGMEDPDHVLTGEGNASGTVDPKL	:			472
Arabid_thalia	:	W.....	EQ.....	V.....	472
Hordeum_vulg	:E...G.....	W....L-----	DA.VAAA.ES..		467
Oryza_sativa	:E.....	W....A-----	A.VAAA..S..		467
Zea_mays	:E.....	W.....	-----	A.VVAA..S..	467
Physcom_pat	:E...N.....	A....W....	RGKQ.....	T.....S..	472
Anemia_phyll	:E.....	A....W....	RSKT..AD.----	LS..	469
Chlamydo_reinh	:	..ADA.E...D.A...A...A...Q.Q.MAS	-----			468
Homo_sap1	:	.M.T..E...Q.....	H.ATR....	SW.T.EQ	-----	451
Homo_sap2	:	.M.R..E...E.....	H.ATQ....	SW.T.EQ	-----	451
Canis_famil	:	.L.T..E...HQ.....	H.ATR....	SW.A.EQ	-----	451
Dros_melano1	:	.L....ET.DC..Q..E.ATRE...	QFS.KRG.GP.DSKSED.R..	TSAG		474
Dros_melano2	:	.L.IA..T.DC..Q..E.ATQI..	PQWSP-----	AVEASKAG		457
Sacch_cerev	:	..A...E.....ED.V.A.QDS..	DD----	VLVDDENMVGELEEDLDAD		467
Caeno_eleg	:	-M.DAMH...D.....	VVQK...T...-----			444
Eugl_gracilis	:	...S..E...N..E.....	R....NW.SSMY.	-----	E.GTPAM.	461
Asperg_nidul	:	...A.A..MD..G..E.A.RE...	DPDAGKDEVG.	-----		454
Ustilago_violac	:	...A.AT..D..E..Q...KA...DY.	AGPGYVKGEDRREKGREAVEG-			469
Schizosacch_jap	:	...N..E..AD..R..E...Q.E..SM	-----			446
Schizosacch_pom	:	...S.....AD.....E...D....SL	-----			446
Cochlio_hetero	:	-----				-
Physarum_polyc	:	...S..E..A.....I.A.GS...NY..	DKG-----	Q...N.NN.		454
Guillardia_thet	:	L.R....Y.LD...N.DNIL.YY	-----			424

Nicotiana_tab	:	SL----	:	474
Arabid_thalia	:	AF----	:	474
Hordeum_vulg	:	V.----	:	469
Oryza_sativa	:	V.----	:	469
Zea_mays	:	V.----	:	469
Physcom_pat	:	GAS---	:	475
Anemia_phyll	:	PSS---	:	472
Chlamydo_reinh	:	-----	:	-
Homo_sap1	:	-----	:	-
Homo_sap2	:	-----	:	-
Canis_famil	:	-----	:	-
Dros_melano1	:	..-----	:	475
Dros_melano2	:	-----	:	-
Sacch_cerev	:	GDHKL	:	473
Caeno_eleg	:	-----	:	-
Eugl_gracilis	:	-----	:	-
Asperg_nidul	:	-----	:	-
Ustilago_violac	:	-----	:	-
Schizosacch_jap	:	-----	:	-
Schizosacch_pom	:	-----	:	-
Cochlio_hetero	:	-----	:	-
Physarum_polyc	:	-----	:	-
Guillardia_thet	:	-----	:	-

7.5 Sequenzen für die im Rahmen der Arbeit neu entwickelten Primer

7.5.1 Actin (255bp)

Die Actin-Sequenz: *Nicotiana tabacum*: Accessionnummer X63603
Arabidopsis thaliana: Accessionnummer U41998

Die Primersequenzen von „Harry“ und „Potter“ sind gelb unterlegt.

```

          1180          *          1200          *          1220          *
ARab : CAGAAAGCTATTTCTGATTCAATCAGGGTTTATTTGACTGTATTGAACTCTTT-----TTGTGT :
Nico : .TCGTGA.--.CT..G.GTG.GA.ATT....CC.TTGC.CCA..CT.C.C..CAATG..A..C :

          1240          *          1260          *          1280          *          1300
ARab : GTTTGCAGCTCATAAAAAA-TGGCTGAGGCTGATGATATTCACCAATCGTGTGTGACAATG-GT :
Nico : TA..AT.AAG.....A.TA.CACT...T-.G..G.T.TTT.T....C.T.TGT.T.AC.. :

          *          1320          *          1340          *          1360
ARab : ACCGGTATGGTGAAGGCTGGATTTGCAGGAGATGATGCTCCAGGGCTGTTTTCCAGTGTGT :
Nico : G..CA.T.TA.--....A..G.....T.....A..A..A..A.....G...A.... :

          *          1380          *          1400          * →          1420          *
ARab : TGGTAGGCAAGACATCATGGTGTTCATGGTTGGGATGAACCAGAAGGATCGATATGTTGGTGATG :
Nico : ....C.C...C.C..CACA.....G.....C...GGG..A..A..... :

          1440          *          1460          *          1480          *
ARab : AAGCACAATCCAAGAGAGGTATTCTTACCTTGAAGTATCCTATTGAGCATGGTGTGTGTAGCAAC :
Nico : ...T.....AC.T.....A..T....A....A....A.....A..... :

          1500          *          1520          *          1540          *          1560
ARab : TGGGATGATATGGAAAAGATCTGGCATCACACTTTCTACAATGAGCTTCGTATTGCTCCTGAAGA :
Nico : .....G..A.....T..A..T....C..A.....G...G..A..G.. :

          *          1580          *          1600          *          1620
ARab : GCACCCTGTTCTTCTTACCGAGGCTCCTCTTAACCCAAAGGCCAACAGAGAGAAGATGACTCAAA :
Nico : A.....A..A..C..T..A..A.....G.....T..TC.C..A..... :

          *          1640          *          1660          *          1680          *
ARab : TCATGTTTGAGACCTTAACTCTCCCGCTATGTATGTCGCCATCCAAGCTGTTCTCTCCTGTAC :
Nico : .....A....TA...T.....T.....C....A...C.T..T :
          Potter ←

          1700          *          1720          *          1740          *
ARab : GCCAGTGGTTCGTACAACCGGTTAGTACATTTT-----AGGCTTTTTGTTTATACTC :
Nico : .....C.....A..G.AC.TT.C.CCTGTATCCAAACTC.A.G..G...AGGA..C. :

          1760          *          1780          *          1800          *          1820
ARab : AT-----TGATCA-----TTATTTGAACT-----GAGC :
Nico : ..AAAGTTTAAATTCTGGATTTCGCCTCTGCTCC...T.ATTTT..CC....A.TATCTA.... :

          *          1840          *          1860          *          1880
ARab : TCTGATTATCTTCCATTGA-----ACAGGTATTGTGCTGGATTCTGGTG :
Nico : .TG..CG..TC.G.T..A.CATCAGATGTTTAAATGTACGT.....C..... :

```

7.5.2 Histon H4 (205bp)

Die Histon H4 Sequenz: *Pisum sativum*: Accessionnummer U10042
Arabidopsis thaliana: Accessionnummer NM_115233
Lycopersicon esculentum: Accessionnummer X69179
Zea mays: Accessionnummer X84376

Die Primersequenzen von „H4 vorne deg“ und „H4 hinten deg“ sind gelb unterlegt

```

                                H4 vorne deg
                                300          *          320          *          340→          *
Pisum      : GTCTCTGAAAGTAAGAATCAACTACCAATAACATCACCATGTCTGGAAGAGGTTAAAGGTTG :
arabidopsi : C.T.T.CTT...TC...TT.A.TT.C-C..G.GA.AA.....A..CC...A..G..A. :
Lycopersic : CCTAGAATC.TC.CCTT.TTCAA.TTTC..TGTGA.AA.....TC.T..A..G..A. :
zea        : TCAC.A.TTCT.CG.TCCGCGTC.GAG.GGC.GCGG.G.....GC.C..C..G..C. :

                                360          *          380          *          400          *
Pisum      : GAAGGGTTTGGGAAAGGGTGGTGCAAAGCGTCACCGTAAGGTTCTGAGGGATAACATTC :
arabidopsi : ...A..A..A.....A..A..C...A..A..T..G..A..A..C..A..C.....C. :
Lycopersic : .C....A.....G..A..C...A..G..TA.G.....A..A..C..T..A. :
zea        : .C.....C.....C.CGCGG.....C.....G.....G..CC.C..C.....C. :

                                420          *          440          *          460          *
Pisum      : AGGGAATAACAAAGCCTGCGATTTCGCCGCTTGCAAGGCGTGGTGGTGTGAAGCGTATCA :
arabidopsi : .A..G..T..C..A.....T.....C..G..AA.A..A..C..... :
Lycopersic : ...T..C..T....A..T.....A.G.....TC.TA.G.....T :
zea        : ...C..C..C.....G.....C..GA.G..G..T..A.G.....C.....C..T :

                                480          *          500          *          520          *
Pisum      : GTGGATTAATCTATGAAGAACTCGCGGTGTTTTGAAGATCTTTCTGGAGAA TGTATCC :
arabidopsi : ...T..G.....G.....C...C.C.....C.....C..G..T. :
Lycopersic : C..TC.C.....G..G..C..T....G.....T.....G..T. :
zea        : CG..GC.C.....C..G..G..C.....C..GCGC.....C.....C..C..... :
                                H4
                                540          *          560          *          580          *
Pisum      : GTGACGCCGTTACTTACACGGAGCATGCTCGCCGGAAGACTGTTACTGCAATGGACGTTG :
arabidopsi : .....C.....A.....G..G.....C. :
Lycopersic : ....T.T..C..C.....T....C..CA.GA.....A....T....T..C. :
zea        : .C.....C..C.....C.....C..G.....C.....C..G..C..C.....C. :
                                hinten deg ←
                                600          *          620          *          640          *
Pisum      : TTTATGCTCTCAAGAGACAGGGAAGAACTCTTTACGGATTTGGCGGTTAGAAAATTTGGGA :
arabidopsi : ...C.....A...C.....T.G..T....C.....C..A.TCG..C... :
Lycopersic : .C.....T.....G.....C..T.....C.....A.--.G...G :
zea        : .C..C..G.....C.C.....CC.C..C.....C..C..A..C...GCTAGAC.CC :

                                660          *          680          *          700          *
Pisum      : AATACAATTTCAATTAGG-GTTTCTTGTAAT-TCAAATCTCAACGTTGATATGCACTACT :
arabidopsi : T-.G.....-----A...TG.AA.C.C.TC...T...G.A.C---.G.G.T.T.A :
Lycopersic : TT..TGT.GGTG..AT..T.G.AAA...GGGATTT.GT.T.CAA.---GC.T.TGT.. :
zea        : TC.T..TAG..-----.G.AC.GG.TAGGGGA..TG...TGT..G---...TT.CTG :

                                720          *          740          *          760          *
Pisum      : GTGTAAAAGTACCCGAGTTTTAGCATTAAACATTAGTTTTTGTCTTTCTTATAGTTATA :
arabidopsi : .AT.TGT.A.TT.TC...AA.CG..G..TG-----A..GA. :
Lycopersic : ...TGG.TAT.TGT...GC.GTTC...-----G.C.TAG :
zea        : TG...GT.T.G.TGC.A.AGCT.TG.A.T.CA.C.C..C...AA.GAAGCGC.T.AG.C. :

```

7.5.3 Elongationsfactor-1 α (bp)

Für die Erstellung der Primer wurden zwei *Nicotiana tabacum* Sequenzen verwendet.

Accessionnummer: AF120093 und D63396

```

          *           560           *           580           *           600
gi|4731315 : AGGTACGATGAAATCGTGAAGGAGGTTTCTTCTTCTACCTCAAGAAGGTAGGATACAACCT :
gi|927382| : .....T.....

          *           620           *           640           *           660
gi|4731315 : GACAAGATCCCCTTTGTCCCCATCTCTGGTTTGAAGGTGACAACATGCTCGAAAGATCA :
gi|927382| : ..T..A.....C..G.....T.....A.....

          *           680           *           700           *           720
gi|4731315 : ACAAACCTTGACTGGTACAAGGCCCAACACTTCTTGATGCTCTTGACCAGATTAATGAG :
gi|927382| : ..C.....T.....G.....C.....

          *           740           *           760           *           780
gi|4731315 : CCCAAGAGGCCACAGACAAGCCTCTCAGGCTCCCACTTCAGGATGTTTACAAGATTGGT :
gi|927382| : .....T.....C.....G.....

          *           800           *           820           *           840
          NT_elongla_fw
          →
gi|4731315 : GGAATTGGTACTGTCCCTGTTGTCGTTGGAAACTGGTGTCTCAAGCCTGGTATGGTT :
gi|927382| : ..T.....C.....G.....

          *           860           *           880           *           900
gi|4731315 : GTTACTTTTGGTCCCCTGCTGACCCTGAAGTTGGATCTGTTGAGATGCACCACGAA :
gi|927382| : ..G.....AA.....

          *           920           *           940           *           960
          NT_elong
          →
gi|4731315 : GCTCTTCAGGAGGCACCTTCCGGTGACAATGTTGGATTTAATGTCAAGAATGTTGCGGTT :
gi|927382| : .....C..C.....C.....A...

          *           980           *           1000          *           1020
          la_rev
          ←
gi|4731315 : AAGGATCTCAAGCGTGGGTTTGTGCTTCCAACCTCC--GGATGTCCAGCAATGGGTGCT :
gi|927382| : .....A.....AA.....A.....T.A.....

          *           1040          *           1060          *           1080
gi|4731315 : -TCAGCTTTACCTCCAAGCTATCATCATGAACCATTTCAGGACAGATTGGCAATGGATAT :
gi|927382| : GC.....TC.....C.....A.....

          *           1100          *           1120          *           1140
gi|4731315 : GCTCCAGTTCTGGACTGCCACACCTCCCA---TGCTGTCAG---TGCAGAAATTTTGACC :
gi|927382| : .....G..T.....CAT.....AGTT.....

          *           1160          *           1180          *           1200
gi|4731315 : AATATTGCCAGGCGTTCTGGTCAGGAGATTGCGAAAGAGCCCAGGTTTCTTTGAATGGT :
gi|927382| : ..G..C.A.....A.....A...G.....A...T.GAA.....

          *           1220          *           1240          *           1260
gi|4731315 : TGTGCTGGTTTTGTTATGATGATTCCCACCTACCCATGGTTGTTGCAAGGATCCTCTCT :
gi|927382| : GA.....A.G...A.....AAG.....--A..C.T.....

```

7.6 Extinktionswerte der Photometrie und Berechnungen der gRNA

7.6.1 Zellsuspensionskultur (BY-2)

Stadien	Extinktion 260nm				Extinktion 280nm			
	I	II	III	Ø	I	II	III	Ø
0	0,048	0,047	0,043	0,046	0,023	0,023	0,024	0,023
3	0,059	0,061	0,057	0,059	0,037	0,033	0,035	0,035
6	0,039	0,040	0,038	0,039	0,021	0,021	0,021	0,021
9	0,027	0,027	0,028	0,027	0,018	0,018	0,017	0,018
12	0,017	0,016	0,018	0,017	0,010	0,008	0,009	0,009

Stadium	Eingesetzte Frischmasse in mg	Ø OD 260 (n=3)	Ø OD 280 (n=3)	RNA-Konzentration [µg/ml]	OD 260/OD 280
0	200	0,046	0,0023	184	2,0
3	400	0,059	0,035	236	1,69
6	400	0,039	0,021	156	1,86
9	400	0,027	0,018	108	1,5
12	400	0,017	0,009	68	1,89

7.6.1.2 Tabakpflanze (SR1)

Stadien	Extinktion 260nm				Extinktion 280nm			
	I	II	III	Ø	I	II	III	Ø
I	0,102	0,083	0,074	0,076	0,063	0,052	0,044	0,053
II	0,163	0,184	0,156	0,168	0,087	0,100	0,084	0,090
III	0,104	0,094	0,090	0,096	0,060	0,052	0,051	0,054
IV	0,040	0,052	0,049	0,047	0,023	0,028	0,027	0,026
V	0,017	0,016	0,018	0,017	0,010	0,010	0,009	0,010
VI	0,009	0,008	0,008	0,008				
VII	0,011	0,013	0,011	0,012				

Stadium	Eingesetzte Frischmasse in mg	Ø OD 260 (n=3)	Ø OD 280 (n=3)	RNA-Konzentration [µg/ml]	OD 260/OD 280
I	150	0,076	0,053	304	1,43
II	200	0,168	0,090	672	1,87
III	200	0,096	0,054	384	1,78
IV	200	0,047	0,026	188	1,81
V	200	0,017	0,010	68	1,70
VI	200	0,008		80	0,08
VII	200	0,012		120	0,12

7.7 Extinktionswerte der Proteinbestimmung und Berechnung des Gesamtproteins

7.7.1 Zellsuspensionskultur (BY-2)

Stadien	Extinktion 595nm			
	I	II	III	Ø
0	0,172	0,167	0,176	0,172
3	0,184	0,176	0,186	0,182
6	0,121	0,123	0,120	0,121
9	0,099	0,105	0,107	0,104
12	0,091	0,086	0,075	0,084

Stadium	Eingesetzte Frischmasse [mg]	Ø 595	Proteingehalt [$\mu\text{g}/\text{mg}$ Frischgewicht]
0	200	0,172	7,43
3	200	0,182	3,94
6	200	0,121	2,62
9	200	0,104	2,25
12	200	0,084	1,82

7.7.2 Tabakpflanze (SR1)

Stadien	Extinktion 595nm			
	I	II	III	Ø
I	0,140	0,136	0,137	0,138
II	0,172	0,167	0,172	0,170
III	0,170	0,172	0,171	0,171
IV	0,082	0,080	0,087	0,083
V	0,051	0,044	0,049	0,048
VI	0,047	0,045	0,044	0,045
VII	0,058	0,046	0,052	0,052

Stadium	Eingesetzte Frischmasse [mg]	Ø 595	Proteingehalt [$\mu\text{g}/\text{mg}$ Frischgewicht]
I	100	0,138	5,96
II	200	0,170	3,68
III	200	0,171	5,54
IV	200	0,083	1,79
V	200	0,048	1,08
VI	200	0,045	0,97
VII	200	0,052	1,12

7.7.3 Gerste


Stadien	Extinktion 595nm			
	I	II	III	Ø
I	0,132	0,127	0,136	0,132
II	0,186	0,199	0,185	0,190
III	0,055	0,045	0,040	0,047
IV	0,137	0,150	0,147	0,145
V	0,083	0,092	0,08	0,088
VI	0,066	0,056	0,064	0,062

Stadium	Eingesetzte Frischmasse [mg]	Ø 595	Proteingehalt [$\mu\text{g}/\text{mg}$ Frischgewicht]
I	200	0,132	2,85
II	200	0,190	4,11
III	200	0,047	1,02
IV	200	0,145	3,14
V	200	0,088	1,90
VI	200	0,062	1,34

7.8 Ergebnisse der Sequenzierungen

7.8.1 Sequenzier-Ergebnisse der Zellsuspensionskultur (BY-2)

7.8.1.1 γ -Tubulin von Stadium 12

>[gb|DQ471451.1](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/DQ471451.1)  Nicotiana tabacum gamma-tubulin mRNA, partial cds
Length=1512

Score = 217 bits (117), Expect = 2e-53
Identities = 125/129 (96%), Gaps = 0/129 (0%)
Strand=Plus/Minus

```


Query 69 CCTGAGTGGGATCAACTTCTCCTTGAATAATGTTTAAATATGGATATGACTTAGCCTGAC 128
          |||
Sbjct 973 CCTGAGTGGGATCAACTTCTCCTTGAATAATGTTTAAATATGGATATGACTTAGCCTGAC 914

Query 129 TGGCTTCTTTTGTTCGAGCATAGGATGACACCATGATATTCTTGGTCTGAAGGAGCCTTC 188
          |||
Sbjct 913 TGGCTTCTTTTGTTCGAGCATAGGAGGAAACCATGATATTCTTGGTCTGAAGGAGCCTTC 854

Query 189 TCATGACAT 197
          |||
Sbjct 853 GCATGACAT 845

```

7.8.1.2 α -Tubulin von Stadium 12

>[emb|AJ421413.1|NTA421413](#)  Nicotiana tabacum mRNA for alpha-tubulin (tubA3 gene)
Length=1553

Score = 582 bits (315), Expect = 4e-163
Identities = 323/327 (98%), Gaps = 0/327 (0%)
Strand=Plus/Plus

```

Query 87      TGGCAAGTATATGGCGTGTCTCATGTTCCGTGGTGTGGTGCCAAAGGATGTTAA 146
            |||
Sbjct 981     TGGCAAGTACATGGCTTGTCTCATGTTCCGTGGTGTGGTGCCAAAGGATGTTAA 1040

Query 147     TGCTGCTGTGGCCACCATCAAGACTAAGCGCACCATCCAATTCGTTGACTGGTGCCCTAC 206
            |||
Sbjct 1041    TGCTGCTGTGGCCACCATCAAGACTAAGCGCACCATCCAATTCGTTGACTGGTGCCCTAC 1100

Query 207     TGGATTCAAGTGTGGTATTAACATATCAGCCACCAACTGTTGTTCCCTGGTGGTGACCTTGC 266
            |||
Sbjct 1101    TGGATTCAAGTGTGGTATTAACATATCAGCCACCAACTGTTGTTCCCTGGTGGTGACCTTGC 1160

Query 267     TAAGGTGCAGAGGGCTGTTTGCATGATTTCCAACCAACCAGTGTGCTGAGGTCTTCTC 326
            |||
Sbjct 1161    TAAGGTGCAGAGGGCTGTTTGCATGATTTCCAACCAACCAGTGTGCTGAGGTCTTCTC 1220

Query 327     ACGCATTGACCATAAGTTTGTATCTGATGTATGCCAAGCGTGCCTTTGTCCATTGGTATGT 386
            |||
Sbjct 1221    ACGCATTGACCATAAGTTTGTATCTGATGTATGCCAAGCGTGCCTTTGTCCATTGGTATGT 1280

Query 387     TGGTGAGGGCATGGAAGAAGGCGAATT 413
            |||
Sbjct 1281    TGGTGAGGGCATGGAGGAAGGTGAATT 1307

```

7.8.1.3 Actin von Stadium 12

>[gb|U60489.1|NTU60489](#) Nicotiana tabacum actin (Tob93) gene, partial cds
Length=1465

Score = 427 bits (231), Expect = 2e-116
Identities = 248/256 (96%), Gaps = 2/256 (0%)
Strand=Plus/Minus

```

Query 78      ATGGCGACATACATAGCAGGGGCGTTGAAGGTTTCAAACATGATCTGAGTCATCTTTTCT 137
            |||
Sbjct 463     ATGGCGACATACATGGCAGGGGCGTTGAAGGTCTCAAACATGATCTGAGTCATCTTTTCT 404

Query 138     CGATTGGCCTTTGGATTAAGAGGAGCTTCTGTGAGGAGAACAGGGTGTCTTCTGGAGCC 197
            |||
Sbjct 403     CGATTGGCCTTTGGATTAGGAGGAGCTTCTGTGAGGAGAACAGGGTGTCTTCTGGAGCC 344


Query 198     ACACGAAGTTCATTGTAGAAGGTGTGATGCCAGATTTT-TTCCATATCATCCCAATTGCT 256
            |||
Sbjct 343     ACACGAAGTTCATTGTAGAAGGTGTGATGCCAAATTTTCTT-CATATCATCCCAATTGCT 285

Query 257     AACGATTCCTGTGTTCAATTGGATACTTCAAAGTCAAATACCCTTTTGGATTGAGCTTC 316
            |||
Sbjct 284     AACGATTCCTGTGTTCAATTGGATACTTCAAAGTCAAATACCCTTTTGGATTGAGCTTC 225

Query 317     ATCACCAACATATGCA 332
            |||
Sbjct 224     ATCACCAACATAAGCA 209

```

7.8.1.4 Histon H4 von Stadium 12

>[dbj|AB280787.1](#)  Nicotiana tabacum NtH4 mRNA for histone H4, complete cds
Length=312

Score = 342 bits (185), Expect = 5e-91
Identities = 194/198 (97%), Gaps = 1/198 (0%)
Strand=Plus/Plus

```
Query 59  AAGGGTGGCAAGGGATTAGGAAAGGGAGGAGCAAAACGACACCGNTAAGGTATTACGTGA 118
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 16  AAGGGAGGCAAGGGATTAGGAAAGGGAGGAGCAAAACGACACCG-TAAGGTATTACGTGA 74


Query 119 CAATATTCAGGGAATTACAAAGCCCTGCTATTAGGAGGCTAGCTAGAAGAGCGGAGTGAA 178
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 75  CAATATTCAGGGAATTACAAAGCCCTGCTATTAGGAGGCTAGCTAGAAGAGCGGAGTGAA 134

Query 179  GAGAATTAGCGGATTGATTTACGAAGAGACACGTGGAGTGTGAAGATCTTTCTAGAAAA 238
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 135  GAGAATTAGCGGATTGATTTACGAAGAGACACGTGGAGTGTGAAGATCTTTCTAGAAAA 194

Query 239  TGTGATCCGTGACGCTGT 256
          ||||| ||||| |||||
Sbjct 195  TGTGATTCGTGATGCTGT 212
```

7.8.1.5 Elongationsfaktor-1 α von Stadium 0 und 6

Stadium 0:

>[dbj|D63396.1|TOBBY2A](#)  Nicotiana tabacum mRNA for elongation factor-1 alpha, complete cds
Length=1671

Score = 291 bits (322), Expect = 7e-76
Identities = 185/194 (95%), Gaps = 7/194 (3%)
Strand=Plus/Minus


```
Query 14  GAGATCCTTAACTGCAACGNTTCCTTGGACGTTGAATCCAACATTGNTCACCAGGAAGTG 73
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 951  GAGATCCTTAACTGCAACGTT--CTTG-ACGTTGAATCCAACATTG-TCACCAGGAAGTG 896

Query 74  CCTCCTGAAGAGCTTCGNTGGTGCATCTCAACAGATTTAACTTCAGNTGGTCAGACCAGT 133
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 895  CCTCCTGAAGAGCTTCG-TGGTGCATCTCAACAGATTTAACTTCAG-TGGTCAGACCAGT 838

Query 134  GGGACCAAAAGTCACAACCATACCAGGCTTGAGGACACCGGTTTTCCACACGACCAACAG 193
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 837  GGGACCAAAAGTCACAACCATACCAGGCTTGAGGACACCGG-TTTCCACACGACCAACAG 779

Query 194  GGACAGTACCAATA 207
          ||||| ||||| |||||
Sbjct 778  GGACAGTACCAATA 765
```

Stadium 6:

>[dbj|D63396.1|TOBBY2A](#)  Nicotiana tabacum mRNA for elongation factor-1 alpha, complete
 cds
 Length=1671

Score = 259 bits (286), Expect = 4e-66
 Identities = 171/189 (90%), Gaps = 1/189 (0%)
 Strand=Plus/Minus

```


Query 6      TGAGATCCTTAACTGCAACATTCTTAAACATTGAACCCAACATTGTCACCAGGGNAGTGCC 65
          |||
Sbjct 952    TGAGATCCTTAACTGCAACGTTCTTGACGTTGAATCCAACATTGTCACCAGG-AAAGTGCC 894

Query 66     TCCTGGAGAGCTTCGTGGTGCATCTCTACAGACTTGACTTCAGTTGTCAGACCAGTAGGC 125
          |||
Sbjct 893    TCCTGAAGAGCTTCGTGGTGCATCTCAACAGATTTAACTTCAGTGGTCAGACCAGTGGGA 834

Query 126    CCAAAGGTCACAAGCATAACCAGGCTTGAGGACACCTGTTTCAACACGACCAACAGGGACA 185
          |||
Sbjct 833    CCAAAGGTCACAACCATAACCAGGCTTGAGCACACCGGTTTCCACACGACCAACAGGGACA 774

Query 186    GTACCAATA 194
          |||
Sbjct 773    GTACCAATA 765
  
```

7.8.2 Sequenzier-Ergebnisse der Tabakpflanze (SR1)**7.8.2.1 γ -Tubulin in altem Blattstadium**

>[emb|AJ278739.1|NTA278739](#)  Nicotiana tabacum mRNA for gamma tubulin (gtub gene)
 Length=1729

Score = 239 bits (129), Expect = 5e-60
 Identities = 129/129 (100%), Gaps = 0/129 (0%)
 Strand=Plus/Plus

```

Query 85     ATGTCATGAGAAGGCTCCTTCAGACCAAGAATATCATGGTTTCCTCCTATGCTCGAACAA 144
          |||
Sbjct 975    ATGTCATGAGAAGGCTCCTTCAGACCAAGAATATCATGGTTTCCTCCTATGCTCGAACAA 1034

Query 145    AGGAAGCCAGTCAGGCTAAATACATATCCATATTAACATTATTTCAGGGAGAAGTTGATC 204
          |||
Sbjct 1035   AGGAAGCCAGTCAGGCTAAATACATATCCATATTAACATTATTTCAGGGAGAAGTTGATC 1094

Query 205    CCACTCAGG 213
          |||
Sbjct 1095   CCACTCAGG 1103
  
```

