

# Etablierung transgener *BY-2* Zelllinien zur *in vivo* Lokalisierung pflanzlicher Cytoskelettproteine

Dissertation zur Erlangung des Grades

„Doktor der Naturwissenschaften“

Am Fachbereich Biologie

der Johannes Gutenberg-Universität

Mainz

Marcus Wolf

geboren in Ludwigshafen am Rhein

Frankenthal, 2015

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung:

**“There's more to the picture  
than meets the eye.”  
(Neil Young)**

# Inhaltsverzeichnis

## Abkürzungsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Das Cytoskelett.....	1
1.1.1	Aufbau der Mikrotubuli.....	2
1.1.2	Pflanzliche Mikrotubuli-Strukturen erfüllen Aufgaben beim Streckungswachstum und im Zellzyklus.....	3
1.1.3	Mikrotubuli organisierende Zentren.....	6
1.1.4	$\gamma$ -Tubulin.....	7
1.2	Proteinlokalisierung im lebenden Organismus.....	11
1.3	Transfer fremder DNA in Pflanzenzellen.....	12
1.4	Die <i>Bright Yellow-2</i> Zellkultur.....	14
1.5	Zielsetzung.....	15
2	Material und Methoden.....	16
2.1	Steriles Arbeiten.....	16
2.2	Umgang mit der <i>BY-2</i> Zellkultur.....	16
2.3	Verwendete Bakterienstämme.....	17
2.3.1	<i>Escherichia coli DH5<math>\alpha</math></i> .....	17
2.3.1.1	Umgang mit <i>E. coli</i> Bakterien.....	17
2.3.1.2	Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> Bakterien.....	18
2.3.1.3	Transformation kompetenter <i>E. coli</i> Bakterien.....	18
2.3.2	<i>Agrobacterium tumefaciens LBA4404</i> und <i>C58C1</i> .....	19
2.3.2.1	Umgang mit <i>A. tumefaciens</i> .....	19
2.3.2.2	Herstellung kompetenter <i>A. tumefaciens</i> .....	20
2.3.2.3	Transformation kompetenter <i>A. tumefaciens</i> .....	20
2.4	Verwendete Plasmide.....	20
2.4.1	pCATgfp.....	20
2.4.2	Gateway® TagRFP-AS-N entry clone.....	22
2.4.3	pJET1.2 blunt cloning vector (Thermo Scientific).....	22
2.4.4	pGEM®-T Easy Vector (Promega).....	23
2.4.5	pZPnpt.....	24
2.4.6	pZPbar.....	25
2.4.7	pMDC7_GFP.....	26
2.5	Isolation von Nukleinsäuren.....	27

---

2.5.1	Aufschluss von <i>BY-2</i> Zellen .....	28
2.5.2	DNA-Isolation .....	28
2.5.3	RNA-Isolation.....	29
2.5.4	Plasmid-Isolation .....	29
2.6	Polymerase-Kettenreaktion .....	29
2.6.1	Standard-PCR.....	29
2.6.2	Kolonie-PCR .....	31
2.6.3	<i>Nested</i> -PCR .....	32
2.6.4	Inverse-PCR.....	32
2.6.5	<i>Reverse Transkription</i> -PCR .....	33
2.7	Agarose-Gelelektrophorese .....	34
2.8	Aufreinigung von PCR-Produkten.....	35
2.9	Klonierung .....	36
2.9.1	Standard-Klonierung.....	36
2.9.1.1	Restriktion .....	36
2.9.1.2	Ligation .....	37
2.9.2	Klonierung mit dem System CloneJET™ .....	38
2.9.3	Klonierung mit dem System pGEM®-T Easy .....	39
2.9.4	RF-Klonierung .....	39
2.10	Sequenzierung von Nukleinsäuren.....	43
2.10.1	Primer-Walking.....	43
2.10.2	Sequenzalignment <i>in silico</i> .....	43
2.11	Proteinextraktion aus <i>BY-2</i> Zellen .....	44
2.12	Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford.....	44
2.13	Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	45
2.14	Gesamtproteinfärbung im Polyacrylamidgel .....	46
2.15	Trocknen von Polyacrylamidgelen .....	47
2.16	Western-Blot .....	47
2.17	Ponceau-Rot-Färbung.....	48
2.18	Immunochemischer Proteinnachweis.....	48
2.19	Amidoschwarz-Färbung.....	50
2.20	Epifluoreszenzmikroskopie.....	50
3	Ergebnisse.....	52
3.1	Etablierung einer Methode zur <i>A. tumefaciens</i> vermittelten stabilen Transfektion von <i>BY-2</i> Zellen.....	52

---

3.1.1	Klonierung von Vektoren zur GFP-Überexpression in Pflanzenzellen.....	52
3.1.2	Optimierung der Transfektion.....	56
3.1.2.1	Kultivierung von <i>A. tumefaciens</i> .....	57
3.1.2.2	<i>A. tumefaciens</i> -Konzentration bei der Co-Kultivierung.....	57
3.1.2.3	Zustand und Volumen der eingesetzten <i>BY-2</i> Zellkultur.....	58
3.1.2.4	Transfektionsdauer.....	59
3.1.2.5	Modifizierte Transfektionsmethode.....	59
3.1.3	Selektion transfizierter <i>BY-2</i> Zellen.....	60
3.2	Klonierung der Fusionskonstrukte und die Etablierung der transgenen <i>BY-2</i> Zelllinien.....	62
3.2.1	Überexpression von GFP-markiertem $\gamma$ -Tubulin in <i>BY-2</i> Zellen.....	63
3.2.2	Sequenzierung des endogenen $\gamma$ -Tubulin-Promotors aus <i>BY-2</i> .....	67
3.2.3	Bestimmung der genomischen $\gamma$ -Tubulin-Volllängensequenz.....	70
3.2.4	Expression von GFP unter Verwendung des endogenen $\gamma$ -Tubulin-Promotors.....	70
3.2.5	Expression von GFP-markiertem $\gamma$ -Tubulin unter Verwendung des endogenen Promotors.....	75
3.2.6	Überexpression von GFP-markiertem $\alpha$ -Tubulin in <i>BY-2</i> Zellen.....	81
3.2.7	Überexpression von RFP in <i>BY-2</i> Zellen.....	87
3.2.8	Expression von RFP-markiertem $\alpha$ -Tubulin in <i>BY-2</i> Zellen.....	91
3.3	Versuche zur Reduzierung der Hintergrundfluoreszenz.....	96
3.3.1	Verwendung eines induzierbaren Promotorsystems.....	96
3.3.2	Dekonvolutionsmikroskopie.....	101
4	Diskussion.....	106
4.1	Etablierung einer Methode zur Agrobakterien vermittelten stabilen Transfektion von <i>BY-2</i> Zellen.....	106
4.2	Selektion transfizierter <i>BY-2</i> Zellen.....	109
4.3	Visualisierung von Cytoskelettproteinen in vivo.....	111
4.3.1	Die Expression von GFP-markiertem $\gamma$ -Tubulin durch den 35S-Promotor.....	111
4.3.2	Der endogene $\gamma$ -Tubulin-Promotor.....	111
4.3.2.1	Die Expression von GFP durch den $\gamma$ -Tubulin-Promotor.....	113
4.3.2.2	Die Expression von GFP-markiertem $\gamma$ -Tubulin durch den $\gamma$ -Tubulin-Promotor.....	113
4.3.3	Die Expression von GFP-markiertem $\alpha$ -Tubulin durch den 35S-Promotor.....	115
4.3.4	Die Expression von RFP durch den 35S-Promotor.....	115
4.3.5	Versuche zur Expression von RFP-markiertem $\alpha$ -Tubulin.....	116
4.3.6	Versuche zur Reduktion der Hintergrundfluoreszenz.....	118
4.3.6.1	Ein induzierbarer Promotor zur Reduktion der Hintergrundfluoreszenz?.....	118

4.3.6.2	Ausblenden der Hintergrundfluoreszenz durch Dekonvolutionsmikroskopie.....	119
5	Zusammenfassung.....	122
6	Literaturverzeichnis.....	124
7	Anhang.....	I
7.1	Nährmedien, Puffer und Lösungen .....	I
7.2	Verwendete Sequenzen .....	IX
7.2.1	$\gamma$ -Tubulin-Promotorsequenz.....	IX
7.2.2	Die genomische $\gamma$ -Tubulin-Vollängensequenz.....	XIII
7.2.3	Die $\alpha$ -Tubulin-CDS .....	XXV
7.3	Verwendete Primer .....	XXVIII

Abbildungsverzeichnis

Tabellenverzeichnis

## Abkürzungsverzeichnis

2,4-D	2,4-Dichlorphenoxyessigsäure
AmpR	Ampicillin-Resistenzgen
APS	Ammoniumpersulfat
<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
<i>A. tumefaciens</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
bar-Gen	Bialaphos-Resistenzgen
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
BY-2	<i>Bright Yellow-2</i>
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CDS	codierende Sequenz
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
Da	Dalton
ddH <sub>2</sub> O	bidestilliertes Wasser
DIC	differentieller Interferenzkontrast
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
ECL	verstärkte Chemilumineszenz
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EtBr	Ethidiumbromid
FP	fluoreszierendes Protein
FRET	Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer
G	Schwerebeschleunigung
Gew.-%	Gewichtsprozent
GFP	grün fluoreszierendes Protein
GOI	Zielgen
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
HRP	Meerrettichperoxidase
IPCR	Inverse-PCR
IPTG	Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranosid
Kan	Kanamycin
Kan <sup>r</sup>	Kanamycin-Resistenzgen
LB	linke Grenze
LB-Medium	Luria Bertani-Medium
LSM	Laser-Scanning-Mikroskop
LS-Medium	Linsmaier und Skoog-Medium
MCS	multiple Klonierungsstelle
min	Minute
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
MTOC	Mikrotubuli organisierende Zentren
<i>N. benthamiana</i>	<i>Nicotiana benthamiana</i>



---

Neo <sup>r</sup>	Neomycin-Resistenzgen
NOS	Nopalin-Synthase
nptII-Gen	Neomycin-Phosphotransferase-II-Gen
<i>N. tabacum</i>	<i>Nicotiana tabacum</i>
OD	optische Dichte
PCM	pericentriolare Matrix
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PPB	Präprophaseband
PPT	Phosphinothricin
PTGS	<i>post-transcriptional gene silencing</i>
PVDF-Membran	Polyvinylidendifluorid-Membran
RB	rechte Grenze
RF-Klonierung	restriktionsfreie Klonierung
RFP	rot fluoreszierendes Protein
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	<i>Reverse Transkription</i> -PCR
s	Sekunde
<i>sddH<sub>2</sub>O</i>	steriles bidestilliertes Wasser
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SPDM	Spectrale Präzisionsdistanzmikroskopie
SpecR	Spectinomycin-Resistenzgen
TBE-Puffer	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TBST-Puffer	Tris-buffered saline + Tween 20-Puffer
T-DNA	Transfer-DNA
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TE-Puffer	Tris-EDTA-Puffer
<i>TEV</i>	Tabak-Ätz-Virus
Ti-Plasmid	Tumor induzierendes Plasmid
TL	<i>TEV 5'-leader</i>
T <sub>m</sub>	Schmelztemperatur
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
u	Unit
ÜN	über Nacht
UTR	untranslatierter Bereich
UV	Ultraviolett
<i>Vir</i> -Gene	Virulenzgene
Vol.-%	Volumenprozent
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-Indoxyl-β-D-Galactopyranosid
YEB-Medium	Yeast Extract Beef-Medium
γ-TuRC	γ-Tubulin-Ringkomplex

# 1 Einleitung

## 1.1 Das Cytoskelett

Zwei der wesentlichen Merkmale des Lebens sind, neben vielen anderen, die Fortpflanzung und damit eng verbunden das Wachstum. Betrachtet man dabei die Zelle als kleinste lebende Einheit aller Organismen, ist eine Struktur hervorzuheben, die bei diesen Prozessen von eminenter Bedeutung ist: das Cytoskelett. Zentrale Mechanismen des Wachstums sind die Zellteilung und vor allem bei den grünen Landpflanzen die Zellstreckung. Gerade bei den Pflanzenzellen, die von einer Zellwand umgeben sind, wird klar, dass es sich dabei um äußerst komplexe Vorgänge handelt und dass das Cytoskelett ein hochgradig dynamisches Gebilde sein muss, um diese zu steuern. Neben den Teilungs- und Streckungsprozessen dient es außerdem der Stabilität und Formgebung, ist an Bewegungs- und Transportprozessen inner- und außerhalb der Zelle beteiligt und spielt eine zentrale Rolle bei der Kernteilung, im Besonderen der Segregation der Chromosomen (Alberts et al., 2008).

Das Cytoskelett ist ein Netzwerk, das sich innerhalb des Cytoplasmas über die ganze Zelle erstreckt. Es besteht im Grunde aus drei Filamenttypen, allesamt Protein-Polymere, die sich durch ihre Untereinheiten unterscheiden (Buchanan et al., 2000; Alberts et al., 2008).

Aktinfilamente, auch Mikrofilamente genannt, sind aus globulärem Aktin aufgebaut. Durch nicht-kovalente Bindungen lagern sich die Monomere zu einem helikal umeinander gewundenen Doppelstrang mit einem Durchmesser von etwa 8 nm zusammen. Im Verbund mit Proteinen der Myosin-Familie sind sie hauptsächlich an Transportprozessen innerhalb der Zelle beteiligt (Buchanan et al., 2000; Alberts et al., 2008; Pollard und Cooper, 2009).

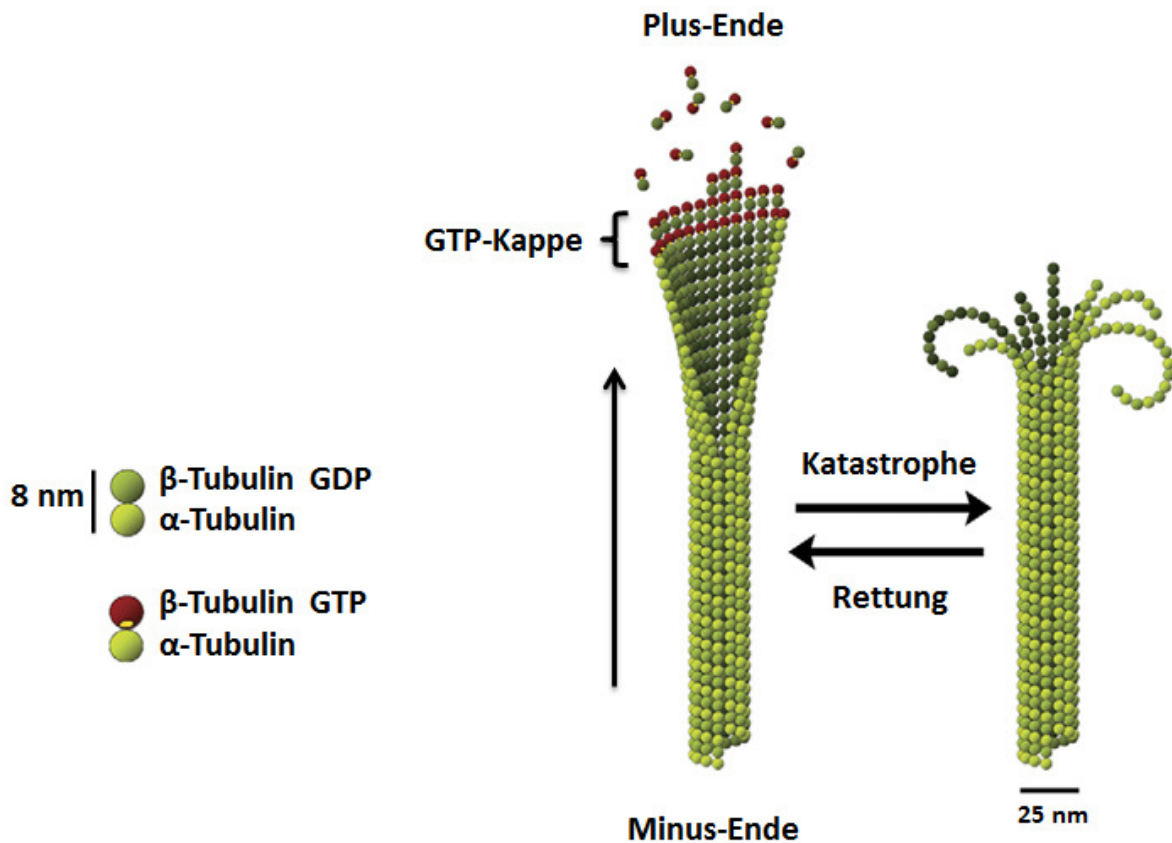
Der Durchmesser der Intermediärfilamente beträgt 10 nm und sie weisen im Gegensatz zu den beiden anderen Filamenttypen keine intrinsische Polarität auf. Ihre Hauptaufgabe ist die Vermittlung von mechanischer Stabilität zum Schutz der Zellen vor äußeren Krafteinwirkungen. Ihr Vorhandensein in Pflanzenzellen ist umstritten (Menzel, 1993; Buchanan et al., 2000). Selbst die Gene der in der Kernlamina von Metazoen auftretenden Lamine, Urtypen der Intermediärfilamente, sind in Pflanzen nicht nachweisbar. Da auch die Zellkerne von Pflanzen über eine Lamina verfügen, die strukturell und funktionell der der Metazoen sehr ähnlich ist, müssen sich hier zu den Laminen analoge Proteine entwickelt haben (Ciska und Moreno Díaz de la Espina, 2014).

Die Mikrotubuli stellen den dritten filamentösen Bestandteil des Cytoskeletts dar. Dabei handelt es sich um röhrenförmige Protein-Polymere, die aus den sogenannten Protofilamenten aufgebaut sind und einen Außendurchmesser von 25 nm aufweisen. Sie spielen eine bedeutende Rolle bei Teilungs-

und Wachstumsprozessen der Zellen und sind wesentlich an der Ausbildung von Strukturen, die in diese Vorgänge involviert sind, beteiligt. Da sie Gegenstand der vorliegenden Dissertation waren, werden sie nachfolgend detailliert beschrieben.

### **1.1.1 Aufbau der Mikrotubuli**

Die Grundbausteine der Mikrotubuli sind Heterodimere aus den globulären Proteinen  $\alpha$ - und  $\beta$ -Tubulin (Buchanan et al., 2000; Alberts et al., 2008). Die asymmetrischen Heterodimere lagern sich stets in gleicher Orientierung zu Protofilamenten zusammen, wodurch eine alternierende Abfolge der Monomere resultiert. In der Regel bestehen die Mikrotubuli aus 13 lateral assoziierten Protofilamenten (Goddard et al., 1994; Buchanan et al., 2000; Hashimoto, 2013). Dabei sind die benachbarten Polymere um etwa 0,9 nm in Längsrichtung gegeneinander verschoben, was zu einer spiraligen Anordnung der Tubulin-Untereinheiten führt (Wade, 2009). Der Aufbau weist eine strukturelle Polarität auf, wobei die  $\alpha$ -Tubulin-Untereinheiten zum langsam wachsenden Minus-Ende, die  $\beta$ -Tubulin-Untereinheiten zum schneller wachsenden Plus-Ende orientiert sind (Mitchison, 1993; Fan et al., 1996; Pastuglia und Bouchez, 2007). Bevor sie in die Mikrotubuli-Assemblierung eintreten, binden freie Heterodimere GTP, ihre Anlagerung findet dann bevorzugt am Plus-Ende statt (Buchanan et al., 2000). Obwohl beide Untereinheiten GTP binden, wird in der Folge nur das Nucleotid der  $\beta$ -Untereinheit hydrolysiert. Daraus resultiert eine Konformationsänderung, die die Depolymerisation des Mikrotubulus begünstigt (Krebs et al., 2005; Nogales und Wang, 2006). Im wachsenden Mikrotubulus übersteigt die Assemblierungsrate die Geschwindigkeit der GTP-Hydrolyse, wodurch sich eine GTP-Kappe am Plus-Ende ausbildet, die den Mikrotubulus stabilisiert. Geht diese verloren, wird der Mikrotubulus, aufgrund der bereits erwähnten Konformationsänderung, rasch depolymerisiert (Krebs et al., 2005; Nogales und Wang, 2006). Diese Vorgänge werden auch als dynamische Instabilität bezeichnet (Mitchison und Kirschner, 1984; Horio und Hotani, 1986), wobei es zu raschen Übergängen zwischen Phasen des Abbaus (Katastrophe) und des Aufbaus (Rettung) kommen kann (Wade, 2009). Ob ein Mikrotubulus schrumpft oder wächst, hängt dabei u. a. von der Verfügbarkeit an GTP-aktivierten Heterodimeren ab (Buchanan et al., 2000). Abbildung 1.1 zeigt eine schematische Darstellung.



**Abbildung 1.1: Dynamische Instabilität der Mikrotubuli.**

GTP-aktivierte Heterodimere treten in die Mikrotubuli-Assemblierung ein. Ihre Anlagerung findet bevorzugt am Plus-Ende statt. In der Folge wird das GTP der  $\beta$ -Untereinheit hydrolysiert, was zu einer Konformationsänderung innerhalb des Protofilaments führt. Dies wirkt sich destabilisierend auf den Mikrotubulus aus. Im wachsenden Mikrotubulus übersteigt die Assemblierungsrate die Geschwindigkeit der GTP-Hydrolyse und am Plus-Ende entsteht eine stabilisierende GTP-Kappe. Geht diese verloren, wird der Mikrotubulus rasch depolymerisiert. (Abbildung verändert nach Pastuglia und Bouchez, 2007).

### 1.1.2 Pflanzliche Mikrotubuli-Strukturen erfüllen Aufgaben beim Streckungswachstum und im Zellzyklus

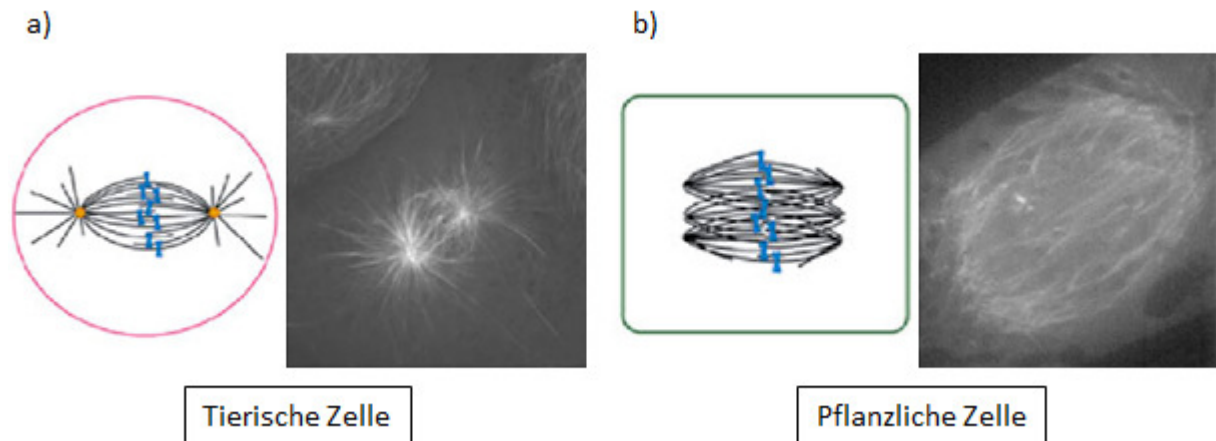
Während eine pflanzliche Zelle den mitotischen Zellzyklus durchläuft, erfährt ihr hochgradig organisiertes Mikrotubuli-Netzwerk eine Reihe phasentypischer Umstrukturierungen (Abb. 1.3). Die nacheinander auftretenden Strukturen sind, bis auf die mitotische Spindel, pflanzenspezifisch und in erster Linie der Ausbildung der Zellwand geschuldet.

Die Größenzunahme erfolgt bei Pflanzen hauptsächlich durch das Streckungswachstum der Zellen in der Interphase. An diesem Punkt des Zellzyklus sind die meisten Mikrotubuli zu einem kortikalen Netzwerk dicht unterhalb der Plasmamembran vereint. Hier sind sie mehr oder weniger parallel zueinander ausgerichtet und vorwiegend orthogonal zur Achse der Zellstreckung orientiert (Goddard et al., 1994; Wasteneys, 2002; Fishel und Dixit, 2013). Dieses hochgradig organisierte Netzwerk

steuert zunächst die Positionierung und anschließend auch die Bewegungsrichtung der Cellulosesynthase-Komplexe in der Plasmamembran und somit die Ausrichtung der Cellulosemikrofibrillen in den neu gebildeten Zellwänden (Deinum und Mulder, 2013; Shaw, 2013). Von der Orientierung der Mikrofibrillen hängt wiederum ab, in welche Richtung sich die Zellwand vorzugsweise ausdehnen kann. So ist das cortikale Mikrotubuli-Netzwerk maßgeblich an der Festlegung der Hauptwachstumsrichtung und Form der Zelle beteiligt (Goddard et al., 1994; Paradez et al., 2006; Paredez et al., 2006; Crowell et al., 2009).

Das erste Anzeichen für eine beginnende Mitose ist die Ausbildung des Präprophasebandes (PPB), das während der G<sub>2</sub>-Phase das cortikale Mikrotubuli-Netzwerk sukzessive ersetzt. Dabei bilden Mikrotubuli-Bündel eine zirkuläre Struktur, die die Zelle, meist im mittleren Bereich, dicht unter der Plasmamembran umringt (Goddard et al., 1994; Wasteneys, 2002; Deinum und Mulder, 2013; de Keijzer et al., 2014). Das PPB legt die spätere Teilungsebene fest. Bemerkenswert dabei ist, dass es mit einsetzender Spindelformierung abgebaut wird und zum Zeitpunkt der Zellteilung nicht mehr existiert. Der genaue Mechanismus dabei ist bis heute unbekannt. Forschungsergebnisse deuten darauf hin, dass es bei der Anlagerung weiterer Faktoren in diesem Bereich, die das PPB überdauern und für die korrekte Orientierung des Phragmoplasten verantwortlich sind, eine Rolle spielt (Walker et al., 2007; McMichael und Bednarek, 2013).

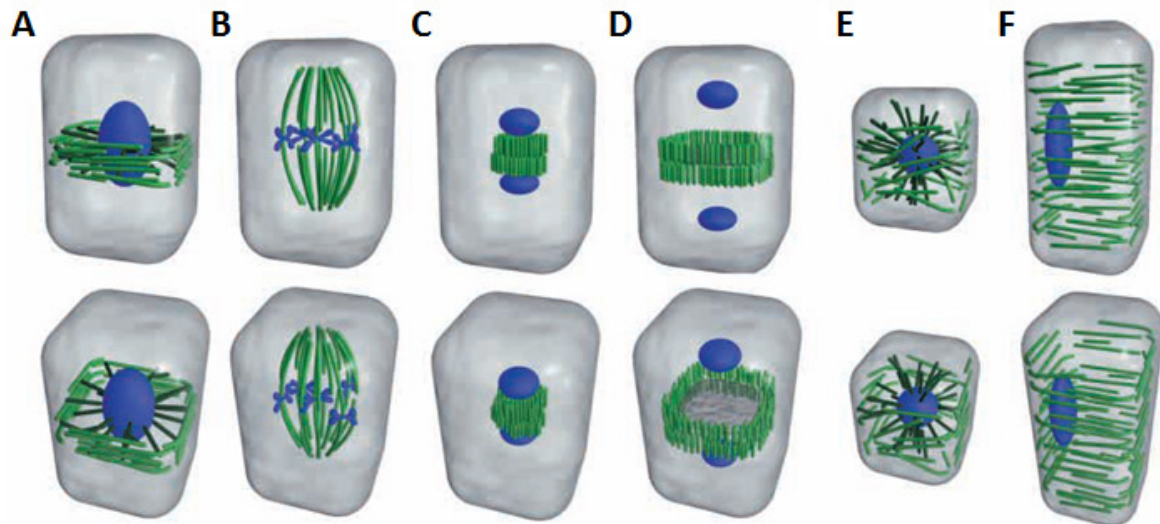
Wie bereits erwähnt, setzt parallel zum Verschwinden des PPB die Kernteilung ein. Die Kernhülle löst sich auf, und es formiert sich die aus Mikrotubuli aufgebaute mitotische Spindel. Sie ist für die korrekte Segregation der duplizierten Chromosomen verantwortlich. Obwohl sie in allen Eukaryoten die gleiche Aufgabe erfüllt, gibt es deutliche Unterschiede im Aufbau. In den meisten tierischen Zellen geht die Assemblierung der Spindel von den Centrosomen aus, distinkte Organellen, die an den Spindelpolen lokalisiert sind. Dagegen fehlen den grünen Landpflanzen vergleichbare Strukturen. Hier werden selbstregulierende Mechanismen diskutiert (Zhang und Dawe, 2011), wobei die genauen Abläufe noch nicht im Detail verstanden sind (Bannigan et al., 2008; Wadsworth et al., 2011). Die Unterschiede bei der Assemblierung wirken sich deutlich auf die Form der Spindel aus. So sind die Spindelpole tierischer Zellen auf die Centrosomen fokussiert. Dagegen erscheint die Spindel in pflanzlichen Zellen tonnenförmig mit wesentlich breiteren Polen (Wasteneys, 2002). Eine vergleichende Darstellung ist Abb. 1.2 zu entnehmen.



**Abbildung 1.2: Die mitotische Spindel in tierischen und pflanzlichen Zellen.**

**a+b)** Schematische Darstellung und mikroskopische Aufnahme der mitotischen Spindel einer tierischen bzw. pflanzlichen Zelle. (Abbildung nach Bannigan et al., 2008 bzw. Wadsworth et al., 2011).

Nach Segregation der Chromosomen, am Übergang zwischen Anaphase und Telophase, beginnt die Ausbildung des Phragmoplasten. Dabei handelt es sich, genau wie bei der mitotischen Spindel, um einen bipolaren Komplex aus Mikrotubuli, deren Plus-Enden sich im Äquatorbereich gegenüberstehen (Wasteneys, 2002). Der Phragmoplast dient dem Transport von Vesikeln, die Material für die entstehende Zellplatte liefern, die später als neue Wand die Tochterzellen voneinander trennt (Lee und Liu, 2013). Der Mikrotubuli-Doppelring wächst mit der Zellplatte zentrifugal bis zum Erreichen der Wand der Mutterzelle im durch das PPB festgelegten Bereich (de Keijzer et al., 2014).



**Abbildung 1.3: Die Organisation der Mikrotubuli während des pflanzlichen Zellzyklus.**

Dreidimensionale Darstellung einer pflanzlichen Zelle aus zwei unterschiedlichen Perspektiven. **A)** Das Präprophaseband umringt die Zelle dicht unter der Plasmamembran und legt die spätere Teilungsebene fest. **B)** Mitotische Spindel während der Metaphase. **C)** Die Formierung des Phragmoplasten, setzt zu Beginn der Telophase ein. **D)** Der Phragmoplast wächst zentrifugal bis zum Erreichen der Wand der Mutterzelle im durch das PPB festgelegten Bereich. **E)** Nach der Zellteilung breiten sich Mikrotubuli vom Zellkern zum Cortex aus. Mit der Plasmamembran assoziierte Mikrotubuli erscheinen. **F)** In der Interphase sind die meisten Mikrotubuli, mehr oder weniger parallel zueinander, in einem corticalen Netzwerk organisiert. Dabei sind sie vorwiegend orthogonal zur Achse der Zellstreckung orientiert. (Nach Wasteneys, 2002).

Die sukzessive Abfolge derart komplexer Strukturen erfordert eine räumlich und zeitlich hochgradig organisierte Regulation der Mikrotubuli.

### 1.1.3 Mikrotubuli organisierende Zentren

Bei hohen Tubulin-Konzentrationen können sich Mikrotubuli *in vitro* spontan selbst assemblieren. Die in lebenden Zellen vorherrschende Tubulin-Konzentration liegt allerdings deutlich niedriger, was zum einen verhindert, dass sich in der Zelle unkontrolliert Mikrotubuli bilden, zum anderen allerdings einen Mechanismus erforderlich macht, der eine Assemblierung unter den vorherrschenden Bedingungen gestattet. Zur Überwindung dieser kinetischen Barriere und zur Kontrolle der zeitlichen und räumlichen Organisation der Mikrotubuli haben sich in vielen eukaryotischen Organismen spezielle zelluläre Strukturen, die Mikrotubuli organisierenden Zentren (MTOC), entwickelt (Oakley, 1992; Joshi und Palevitz, 1996; Wiese und Zheng, 2006; Pastuglia und Bouchez, 2007).

In den meisten tierischen Zellen dient das Centrosom als MTOC. Es besteht im Wesentlichen aus einem Paar Centriolen, die in eine pericentriolare Matrix (PCM) eingebettet sind. Bei der Nukleation eines Mikrotubulus bleibt sein Minus-Ende mit dem MTOC verbunden, während das Plus-Ende in

Richtung Zellwand wächst. Im Gegensatz zu den meisten anderen Eukaryoten besitzen die Zellen von Pflanzen, mit Ausnahme einiger Algengruppen und spezieller Entwicklungsstadien mancher Gymnospermen, keine Centriolen. Ein dem Centrosom vergleichbares distinktes MTOC konnte in höheren Pflanzen bis heute nicht nachgewiesen werden. Diese Tatsache wirft viele Fragen auf und ist deshalb Gegenstand intensiver Forschung, denn die bereits erwähnten, teilweise dramatischen Umstrukturierungen des Mikrotubuli-Netzwerkes im Verlauf des Zellzyklus, setzen eine zeitliche und räumliche Regulation der Mikrotubuli-Nukleation voraus. Auch wenn viele der dabei involvierten Mechanismen noch nicht verstanden sind, so ist doch zumindest eine diffuse Verteilung von Nukleationsstellen über die kortikalen (Shaw et al., 2003; Lloyd und Chan, 2004; Murata et al., 2005; Ehrhardt und Shaw, 2006) und kernhüllennahen (Mizuno, 1993; Stoppin et al., 1994; Canaday et al., 2000; Rose et al., 2004) Bereiche des Cytoplasmas evident.

#### 1.1.4 $\gamma$ -Tubulin

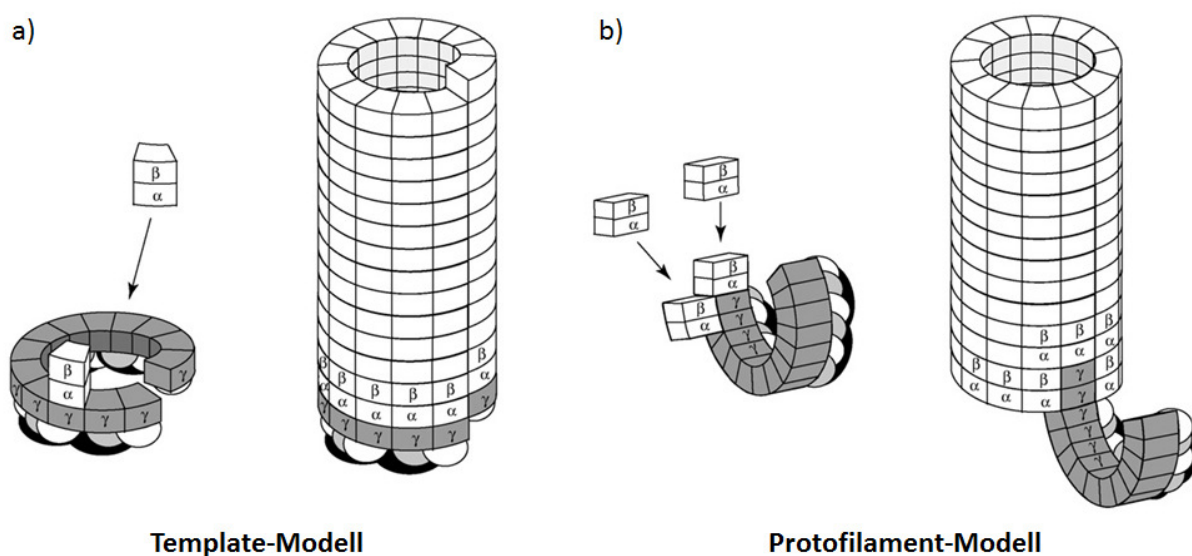
Die genaue Funktion der MTOCs bei der Initiation der Mikrotubuli-Assemblierung und vor allem, welche Proteine dabei involviert sind, ist noch nicht im Detail geklärt. Als gesichert gilt aber die Beteiligung eines weiteren Mitglieds der Tubulin-Superfamilie. Es wurde durch Oakley und Oakley (1989) bei genetischen Untersuchungen des Pilzes *Aspergillus nidulans* entdeckt. Die Autoren konnten durch Aminosäuresequenzvergleiche zeigen, dass das Genprodukt des *mipA* Gens mit  $\alpha$ - und  $\beta$ -Tubulin verwandt, aber keine Isoform eines der beiden anderen Tubuline ist. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde das  $\gamma$ -Tubulin als eigenständiges Mitglied in die Tubulin-Superfamilie aufgenommen (Oakley und Oakley, 1989; McKean et al., 2001). In den folgenden Jahren konnte es in weiteren Organismen nachgewiesen werden, so z.B. in *Drosophila melanogaster* und *Homo sapiens* (Zheng et al., 1991). Heute geht man davon aus, dass es vermutlich in allen Eukaryoten zu finden ist (Oakley, 1992; Wade, 2009).

Die ersten Nachweise für eine Beteiligung des  $\gamma$ -Tubulins an den MTOCs bzw. der Mikrotubuli-Organisation erfolgten durch verschiedene Methoden. Oakley et al. (1990) konnten zeigen, dass eine Mutation im  $\gamma$ -Tubulin-Gen von *A. nidulans* zu einer Hemmung der Kernteilung führt. Der Aufbau der mitotischen Spindel wurde nahezu völlig unterdrückt und die Anzahl cytoplasmatischer Mikrotubuli stark reduziert. Durch Immunofluoreszenzuntersuchungen konnte  $\gamma$ -Tubulin in Centrosomen von *Drosophila melanogaster* und *Homo sapiens* (Zheng et al., 1991) sowie anderen tierischen Organismen (Stearns et al., 1991) lokalisiert werden. Joshi et al. (1992) zeigten, dass ein gegen das  $\gamma$ -Tubulin gerichteter Antikörper die Mikrotubuli-Nukleation und die Ausbildung der mitotischen Spindel in Säugetierzellen hemmt. Durch diese und viele weitere Untersuchungen konnte gezeigt



werden, dass dem  $\gamma$ -Tubulin eine Schlüsselfunktion in den MTOCs zukommt. Heute weiß man, dass es dabei durch weitere Proteine unterstützt wird und mit diesen einen Proteinkomplex, den  $\gamma$ -Tubulin-Ringkomplex ( $\gamma$ -TuRC), bildet (Zheng et al., 1995; Murphy und Stearns, 1996; Hashimoto, 2013). Zheng et al. (1995) zeigten, dass der  $\gamma$ -TuRC die Mikrotubuli-Assemblierungsrate *in vitro* deutlich steigert. Zudem spricht die Form und der einem Mikrotubulus entsprechende Durchmesser von etwa 25 nm für die Funktion als Nukleationsinitiator.

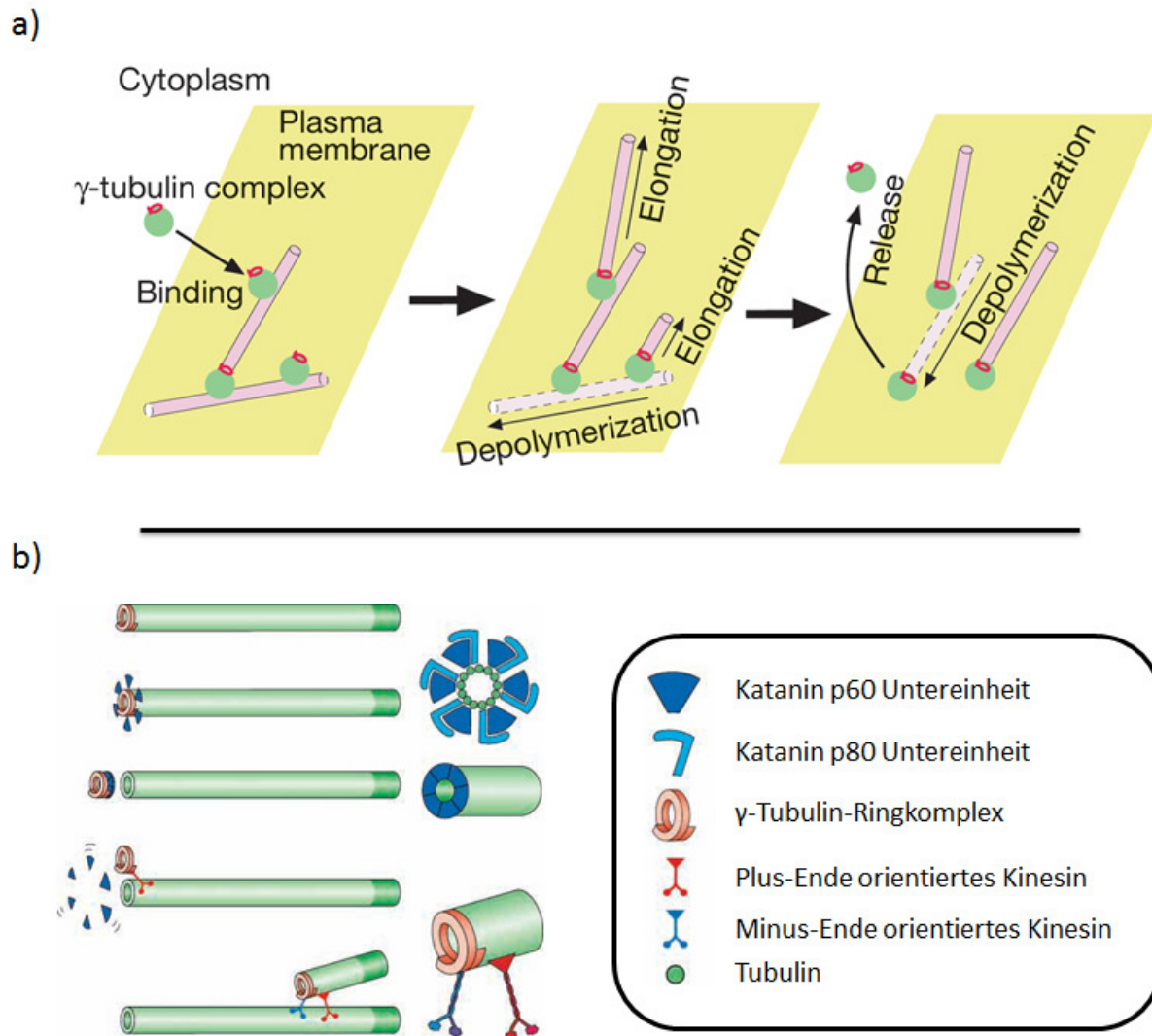
In tierischen Zellen liegen die  $\gamma$ -TuRCs in der PCM der Centrosomen, wo sie mit den Minus-Enden der Mikrotubuli verbunden sind (Eckardt, 2006). Welche Moleküle am Aufbau des Ringkomplexes beteiligt und v.a. wie sie angeordnet sind, wird bis heute intensiv diskutiert. So geht das „Template-Modell“ (Abb. 1.4a) von einer lateralen Assoziation der  $\gamma$ -Tubulin-Moleküle aus, an die sich longitudinal die Tubulin-Heterodimere anlagern. Dagegen postuliert das „Protofilament-Modell“ (Abb. 1.4b) eine perpendikuläre Anordnung der  $\gamma$ -Tubulin-Moleküle, die so als initiales Protofilament fungieren, das lateral mit den Heterodimeren interagiert (Erickson, 2000; Moritz et al., 2000; Moritz und Agard, 2001; Wiese und Zheng, 2006). Obwohl zahlreiche Forschungsergebnisse für das „Template-Modell“ sprechen, fehlen eindeutige Beweise für oder gegen eines der beiden Modelle (Wiese und Zheng, 2006; Raynaud-Messina und Merdes, 2007; Kollman et al., 2011).



**Abbildung 1.4: Mikrotubuli-Nukleation am  $\gamma$ -TuRC.**

Ein Vergleich der beiden diskutierten Modelle. **a)** Template-Modell: Die  $\gamma$ -Tubulin-Moleküle (grau) sind lateral assoziiert und bilden eine ringförmige Struktur. Die Anlagerung der Heterodimere erfolgt longitudinal. **b)** Protofilament-Modell: Die  $\gamma$ -Tubulin-Moleküle (grau) sind longitudinal assoziiert und bilden eine gebogene Struktur. Die Anlagerung der Heterodimere erfolgt sowohl lateral als auch longitudinal. (Abbildung verändert nach Raynaud-Messina und Merdes, 2007).

Auch in pflanzlichen Genomen konnten  $\gamma$ -Tubulin-Gene nachgewiesen werden. Die erste vollständig sequenzierte cDNA stammte aus dem Farn *Anemia phyllitidis* (Fuchs et al., 1993). Es folgten die Sequenzen aus *Arabidopsis thaliana* (Liu et al., 1994), *Zea mays* (Lopez et al., 1995), dem Laubmoos *Physcomitrella patens* (Wagner et al., 1999; GenBank: AF142098.1) und *Oryza sativa* (Kim et al., 1999). In unserer Arbeitsgruppe gelang die Sequenzierung der  $\gamma$ -Tubulin-cDNA aus *Nicotiana tabacum* und *Hordeum vulgare* (Schröder et al., 2002). Ähnlich wie in tierischen Zellen, konnten auch in Pflanzen  $\gamma$ -Tubulin-Komplexe identifiziert werden (Stoppin-Mellet et al., 2000; Dryková et al., 2003). Jedoch entspringen, wie bereits beschrieben, neu assemblierte Mikrotubuli in Pflanzen keinem distinkten MTOC wie dem Centrosom in tierischen Zellen. Vielmehr findet deren Nukleation über die Zelle (bzw. die Strukturen, an deren Aufbau Mikrotubuli beteiligt sind) verteilt statt. Auch das  $\gamma$ -Tubulin konnte in den entsprechenden Regionen, wie z.B. dem kortikalen und kernhüllennahen Bereich des Cytoplasmas bzw. entlang sämtlicher pflanzlicher Mikrotubuli-Strukturen, mit immunologischen Methoden detektiert werden (Liu et al., 1993; Liu et al., 1994; Panteris et al., 2000). Trotz oder gerade wegen dieser Verteilung wurde seine Beteiligung an der Mikrotubuli-Nukleation in Pflanzen für lange Zeit kontrovers diskutiert. Es ist nämlich nicht nur auf die (Minus)-Enden der Mikrotubuli beschränkt, was man bei einem in die Nukleation involvierten Protein erwarten würde, sondern punktiert über ihre gesamte Länge verteilt zu finden (Liu et al., 1993; Binarová et al., 1998; Canaday et al., 2000). Eine mögliche Erklärung liefert die Arbeit von Murata et al. (2005). Ihre Ergebnisse lassen vermuten, dass die Nukleation neuer Mikrotubuli im kortikalen Netzwerk an bereits vorhandenen Mikrotubuli stattfindet, dass daran  $\gamma$ -Tubulin beteiligt und an den Verzweigungspunkten lokalisiert ist. Sie schlossen aus ihren Ergebnissen, dass ein cytosolischer  $\gamma$ -Tubulin-Komplex an die Seiten eines Mikrotubulus binden kann, wodurch er aktiviert wird und die Assemblierung eines neuen Mikrotubulus initiiert (Abb. 1.5a). Eine andere Theorie (Abb. 1.5b) geht von einem Katanin vermittelten Abspalten des am Minus-Ende eines Mikrotubulus gebundenen  $\gamma$ -TuRC aus, der anschließend entweder durch Kinesin in Richtung Plus-Ende transportiert wird (Wasteneys, 2002) oder nach seiner Freisetzung an einen anderen Mikrotubulus bindet (Nakamura et al., 2010), wo er erneut als Initiationskeim dient.



**Abbildung 1.5: Modelle der über die Zelle verteilten Mikrotubuli-Nukleation in Pflanzen.**

**a)** Ein cytosolischer  $\gamma$ -Tubulin-Komplex bindet an die Seite eines bestehenden Mikrotubulus, wodurch er aktiviert wird und die Assemblage eines neuen Mikrotubulus initiiert. Er kann sich erst wieder lösen, wenn der durch ihn assemblierte Mikrotubulus depolymerisiert wurde. (Nach Murata et al., 2005). **b)** Ein  $\gamma$ -TuRC wird durch Katanin vom Minus-Ende eines Mikrotubulus abgespalten. Es folgt ein Kinesin vermittelter Transport in Richtung Plus-Ende, wo der  $\gamma$ -TuRC die Assemblage eines neuen Mikrotubulus initiiert. (Verändert nach Wasteneys, 2002).

Obwohl Untersuchungen existieren, die eine Beteiligung des  $\gamma$ -Tubulins an der Mikrotubuli-Nukleation in Pflanzen bestätigen (Dryková et al., 2003; Murata et al., 2005; Pastuglia et al., 2006), bleibt zu bedenken, dass seine Rolle in den MTOCs noch nicht gänzlich geklärt ist. Es besteht die Möglichkeit, dass es noch andere Aufgaben erfüllt. So könnte die beschriebene Verteilung entlang der Mikrotubuli evtl. auch der Stabilisierung dienen (Joshi und Palevitz, 1996; Panteris et al., 2000; Shimamura et al., 2004).

Trotz Jahrzehnte der Forschung bleiben noch immer viele Fragen bezüglich der Funktion des  $\gamma$ -Tubulins, der Mikrotubuli-Nukleation und der Dynamik des gesamten Netzwerkes gerade bei den

acentrosomalen Pflanzen offen. Zur Klärung sind weitere Versuche v.a. *in vivo* erforderlich, wobei eine möglichst einfache Detektion der Mikrotubuli und des  $\gamma$ -Tubulins von Vorteil wäre.

## 1.2 Proteinlokalisierung im lebenden Organismus

Eine klassische Methode zur Detektion von Makromolekülen ist die Immunlokalisierung. Dabei werden die gesuchten Proteine in den Zellen mit Hilfe spezifischer Antikörper, die eine Markierung tragen, visualisiert. Obwohl es sich hierbei um eine sehr sensitive Nachweismethode handelt, birgt sie doch wesentliche Nachteile. So erfordert sie z.B. die Permeabilisierung und Fixierung der zu untersuchenden Zellen, wodurch feinere Strukturen, wie sie im Cytoskelett häufig auftreten, schwierig bzw. überhaupt nicht zu detektieren sind (Wasteneys und Yang, 2004). Auch in unserer Arbeitsgruppe gelang durch diese Methode die Visualisierung von Cytoskelett-Strukturen, es wurde jedoch vermutet, dass die feinen Strukturen durch die destruktive Behandlung (Permeabilisierung/Fixierung) zerstört wurden (mündliche Mitteilung Prof. Dr. W. Wernicke). Ein weiterer Nachteil der Methode besteht darin, dass *in vivo* Beobachtungen nicht möglich sind, da die Zellen während der Behandlung absterben.

Eine elegante Möglichkeit, diese Probleme zu umgehen, liefert das *genetic engineering*. Die Herstellung chimärer Gene und deren Expression im zu untersuchenden Organismus gestattet die Beobachtung *in vivo*. Die resultierenden Fusionsproteine bestehen dabei aus dem Zielprotein und einem Reporterprotein, welches die Detektion ermöglicht.

Der wohl am weitesten verbreitete Reporter ist das, durch Shimomura et al. (1962) entdeckte, grün fluoreszierende Protein (GFP) aus der Qualle *Aequorea victoria*. Bei Anregung mit ultraviolettem bzw. blauem Licht emittiert es eine grüne Fluoreszenz. Das Anregungsspektrum des Wildtyp GFP zeigt zwei Peaks bei  $\lambda = 395$  nm und  $\lambda = 475$  nm. Wird es mit Licht der entsprechenden Wellenlängen angeregt, zeigt es Emissionsmaxima bei  $\lambda = 508$  nm bzw.  $\lambda = 503$  nm (Tsien, 1998). Chalfie et al. (1994) waren die Ersten, die erkannten, dass das GFP als Markerprotein eingesetzt werden kann. Ihnen gelang die Expression in Prokaryoten (*Escherichia coli*) wie auch Eukaryoten (*Caenorhabditis elegans*) und sie zeigten dabei, dass die GFP-Fluoreszenz unabhängig von exogenen Cofaktoren bzw. Substraten zu detektieren war. Außerdem ist es für die meisten Zellen, in denen es exprimiert wird, nicht toxisch und beeinflusst als Fusionspartner nur selten die Aktivität des Zielproteins (Zimmer, 2002). Durch diese und weitere Eigenschaften wurde es in den letzten 20 Jahren zu einem der wichtigsten Werkzeuge der Zellbiologie. Dies spiegelt sich auch in den zahlreichen Mutanten wider, die für unterschiedlichste Fragestellungen und Methoden optimiert wurden. Die Veränderungen reichen von Anpassungen an das *codon usage* unterschiedlicher Organismen, über die Steigerung der

Photostabilität (Shaner et al., 2008) bis zur qualitativen als auch quantitativen Veränderung der Fluoreszenzeigenschaften (Shaner et al., 2005; Shaner et al., 2007). Die Verfügbarkeit an unterschiedlichen fluoreszierenden Proteinen (FP) wurde zudem noch durch Varianten, die in anderen Organismen entdeckt und ihrerseits wiederum gentechnisch verändert wurden, erweitert (Merzlyak et al., 2007; Shaner et al. 2004).

Die große Auswahl an unterschiedlichen FPs und ihre Verwendung als Marker in Fusionsproteinen eröffnet uns heute ein breites Repertoire an Methoden wie z.B. die Co-Lokalisation unterschiedlicher Proteine oder der *Fluorescence Resonance Energy Transfer* (FRET) bei Protein-Protein-Interaktionsstudien (Zimmer, 2002). Auch Erkenntnisse bezüglich des pflanzlichen Cytoskeletts beruhen auf *in vivo* Untersuchungen unter Verwendung entsprechender Fusionsproteine (Ueda et al., 1999; Hasezawa et al., 2000; Kumagai et al., 2001; Shaw et al., 2003; Voigt et al., 2005; Yoneda et al., 2007).

### 1.3 Transfer fremder DNA in Pflanzenzellen

Möchte man ein Fusionsprotein in Pflanzenzellen exprimieren, muss das klonierte Konstrukt zunächst in den Zielorganismus transferiert werden. Zur stabilen Integration von Fremdgenen in Pflanzenzellen werden häufig *Agrobacterium tumefaciens* vermittelte Transfektionsmethoden eingesetzt. Das phytopathogene, gramnegative *Agrobacterium* löst in der Natur bei vielen Dikotyledonen die Bildung von Wurzelhalsgallen bzw. Tumoren aus. Das proliferierende Gewebe versorgt das Bakterium mit Opinen, die ihm als Stickstoff- und Kohlenstoffquelle dienen (Hellens und Mullineaux, 2000). Die für die Tumorinduktion und Opin Biosynthese benötigten Gene werden dabei durch *A. tumefaciens* in die Pflanzenzellen übertragen, wo sie in das Kerngenom integriert und exprimiert werden (Hellens und Mullineaux, 2000; McCullen und Binns, 2006). Bei diesem Vorgang spielt das sogenannte Tumor induzierende (Ti) Plasmid eine zentrale Rolle. Es trägt sowohl die zu transferierenden Gene, die in einem Bereich, der Transfer-DNA (T-DNA) genannt wird, lokalisiert sind als auch die Virulenzgene (*Vir-Gene*), deren Produkte den Transfer ermöglichen. Der als Transfektion bezeichnete Vorgang beginnt mit der Anlagerung von *A. tumefaciens* an einen geeigneten Wirtsorganismus. Dies geschieht in der Regel in verwundeten Bereichen von Pflanzengeweben. Hier treten u. a. Phenole wie Acetosyringon und verschiedene Zucker aus, die bei der chemotaktischen Orientierung der Bakterien eine wichtige Rolle spielen (Shaw et al., 1988; Shaw, 1991). Die gleichen Substanzen sind auch in die Induktion der *Vir-Gene* involviert. Dabei bilden die konstitutiv exprimierten *Vir-Proteine* *VirA* und *VirG* ein Zweikomponenten-Regulationssystem. Die pflanzenspezifischen Signalstoffe führen zur Autophosphorylierung der membrangebundenen

Sensorkinase *VirA*. Diese überträgt die Phosphatgruppe auf *VirG*, wodurch es aktiviert wird und die Expression der *Vir-Gene* einleitet (Gelvin, 2003; McCullen und Binns, 2006).

Vor dem Gentransfer ist eine Prozessierung der T-DNA erforderlich. Sie wird auf dem Ti-Plasmid durch spezifische Sequenzen begrenzt, die *Left* und *Right Border* (LB bzw. RB) genannt werden. Diese werden durch den *VirD1/VirD2*-Proteinkomplex erkannt, der wiederum dafür sorgt, dass ein T-DNA-Einzelstrang aus dem Ti-Plasmid ausgeschnitten wird. Am 5´ Ende des Einzelstranges bleibt ein *VirD2*-Protein kovalent gebunden. Diese Anordnung wird auch unreifer T-Komplex genannt und in dieser Form, zusammen mit weiteren *Vir-Proteinen*, in die Wirtszelle transferiert (Gelvin, 2003; Tzfira und Citovsky, 2006; Permyakova et al., 2009).

Der Transport erfolgt durch den *VirB/D4*-Komplex, der aus 12 verschiedenen Proteinen (*VirB1-11* und *VirD4*) aufgebaut wird (Gelvin, 2003; McCullen und Binns, 2006). Dabei handelt es sich um ein Typ IV-Sekretionssystem, das sich strukturell durch einen die Zellhülle überspannenden Multiprotein-Kanal und einen extrazellulären Pilus auszeichnet (Christie, 2004; Wallden et al., 2010; Zechner et al., 2012).

In der Wirtszelle binden hunderte von *VirE2* Molekülen an die T-DNA und ummanteln so den T-Komplex. Dies verleiht ihm zum einen Schutz und Struktur auf seinem Weg durch das Cytoplasma. Zum anderen besitzt *VirE2*, genau wie das am 5´ Ende gebundene *VirD2*, Kernlokalisations-signale und ist wahrscheinlich in den Transport zum Nucleus involviert. Zudem interagiert der T-Komplex mit Pflanzenproteinen, die diesen Vorgang unterstützen (Gelvin, 2010). Auch wird vermutet, dass das pflanzliche Cytoskelett, in Verbindung mit Motorproteinen, am aktiven Transport durch das Cytosol beteiligt ist (Tzfira, 2006; Gelvin, 2010).

Erreicht der T-Komplex den Zellkern, wird er wahrscheinlich aktiv durch die Kernimport-Maschinerie der Wirtszelle aufgenommen. Im Zellkern angekommen wird die T-DNA zunächst von den gebundenen Proteinen befreit, bevor sie in das Genom integriert wird. Man geht davon aus, dass das DNA-Reparatursystem der Zelle die T-DNA zunächst in einen Doppelstrang konvertiert, diesen als gebrochenes DNA-Fragment deutet und in das Wirtsgenom einbaut (Tzfira und Citovsky, 2006).

Die *Agrobacterium* vermittelte Transfektion wird heute in zahlreichen Labors auf der ganzen Welt eingesetzt, um Fremdgene in Pflanzen zu transferieren. Bevor das System gentechnisch genutzt werden konnte, mussten Wissenschaftler einige Modifikationen vornehmen. Natürlich vorkommende Ti-Plasmide sind sehr groß (200 - 800 kbp), was bei der Klonierung eines Zielgens erhebliche Probleme bereiten kann (Gelvin, 2003). Außerdem ist in den meisten Versuchen die Ausbildung von Tumoren unerwünscht. Um diese Probleme zu umgehen, werden heute hauptsächlich binäre Vektorsysteme verwendet, die auf den Erkenntnissen von Hoekema et al.

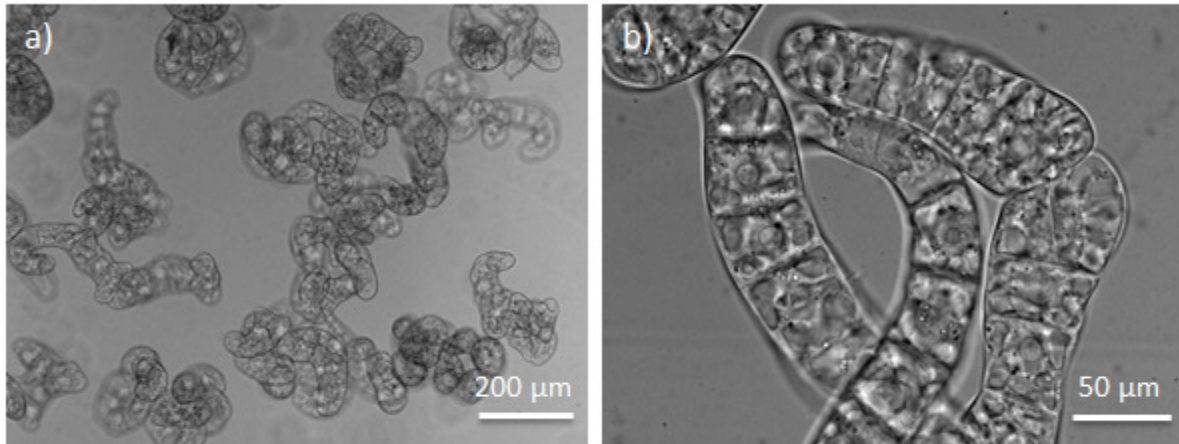
(1983) basieren. Die Autoren konnten zeigen, dass *A. tumefaciens* auch dann Tumore induziert, wenn die T-DNA und die *Vir-Region* auf zwei unterschiedlichen Plasmiden in der selben Bakterienzelle liegen.

Bei den heute verwendeten Systemen werden *A. tumefaciens* Stämme eingesetzt, die ein „entwaffnetes“ Ti-Plasmid (Helfer-Ti-Plasmid) tragen. Dieses verfügt über eine *Vir-Region*, wogegen die T-DNA deletiert wurde. Diese befindet sich wiederum auf einem separaten Replikon, dem sogenannten binären Vektor. Die Onkogene der T-DNA wurden in der Regel durch andere Elemente ersetzt, wie eine *Multiple Cloning Site* (MCS) und Resistenzgene gegen Antibiotika oder Herbizide, die zur Selektion transfizierter Pflanzenzellen dienen. Binäre Vektoren sind verhältnismäßig kleine Plasmide, die sich durch gentechnische Methoden relativ einfach verändern lassen. Ein zu transferierendes Gen wird zunächst in die MCS der T-DNA kloniert. Ein zusätzlicher Replikationsursprung ermöglicht die Vervielfältigung des klonierten Konstruktes in *E.coli*, bevor der Vektor auf das „entwaffnete“ *Agrobacterium* übertragen wird. Bei einer Transfektion von Pflanzenzellen ermöglichen die *Vir-Gene* des Helfer-Ti-Plasmids den Transfer der T-DNA des binären Vektors und somit des Zielgens (Hellens und Mullineaux, 2000; Gelvin, 2003; Lee und Gelvin, 2008).

#### 1.4 Die *Bright Yellow-2* Zellkultur

Die mikroskopische Untersuchung zellulärer Strukturen an intakten Geweben grüner Landpflanzen stellt eine große Herausforderung dar. Dies gilt im Besonderen für die unterschiedlichen Teilungsstadien, da die Zellteilung in höheren Pflanzen in kompakten Meristemen stattfindet und diese durch meist mehrere Gewebeschichten überdeckt und geschützt sind (de Keijzer et al., 2014). Durch diese kompakte Anordnung und geschützte Lage ist auch eine Präparation vitaler Zellen aus einem Meristem sehr zeitintensiv und nahezu unmöglich. Deshalb werden bei entsprechenden Untersuchungen häufig Zellkulturen verwendet. Hier eignet sich vor allem die Tabak Zellkultur *Bright Yellow-2* (BY-2). Sie wurde ursprünglich aus einem Kallus, der aus einem Sämling der Tabakpflanze *Nicotiana tabacum* L. cv. Bright Yellow 2 hervorging, gewonnen und stammt aus dem heutigen *Tobacco Science Research Laboratory* der *Japan Tobacco Inc.* (Kato et al., 1972). Auszeichnend ist eine hohe Homogenität und starke Teilungsrate (Nagata et al., 1992). Die Zellen der Flüssigkultur liegen in Clustern vor, dabei sind häufig Teilungsmuster zu beobachten, die denen in longitudinal wachsenden Pflanzenorganen ähnlich sind. Beispiele sind in Abb. 1.6 gezeigt. Aufgrund guter Eigenschaften bei der *Agrobacterium* vermittelten stabilen Transfektion (David und Perrot-Rechenmann, 2001) und der mikroskopischen Analyse GFP-markierter Proteine (Geelen und

Inzé, 2001) entwickelte sich diese Zellkultur zu einem Modellorganismus für Studien des pflanzlichen Cytoskeletts.



**Abbildung 1.6: Die Bright Yellow-2 Zellkultur.**

a) Die Zellen einer BY-2 Flüssigkultur liegen meist in Clustern vor. b) Häufig sind Teilungsmuster zu beobachten, die denen in longitudinal wachsenden Pflanzenorganen ähnlich sind.

## 1.5 Zielsetzung

Auch wenn einige der Funktionen, die die Mikrotubuli während des pflanzlichen Zellzyklus und der Zelldifferenzierung übernehmen, heute weitgehend verstanden sind, bleiben doch wichtige Fragen bezüglich der Organisation und Regulation des dem ständigen Auf-, Ab- und Umbau unterliegenden Mikrotubuli-Netzwerkes offen. So sind beispielsweise noch immer viele Details bezüglich der Mikrotubuli- Nukleation ungeklärt. Es wird zwar vermutet, dass das  $\gamma$ -Tubulin hier eine zentrale Rolle spielt, seine genaue Funktion dabei und ob es daneben noch andere erfüllt, ist allerdings noch immer unbekannt. Eine geeignete Grundlage für die weitere Erforschung des dynamischen Mikrotubuli-Netzwerkes und seiner Regulation stellt die *in vivo* Lokalisation involvierter Proteine dar.

Deshalb ist das Ziel der vorliegenden Arbeit die Etablierung von BY-2 Zelllinien, die verschiedene FP-markierte Proteine des Cytoskeletts exprimieren. Dabei soll zum einen das Mikrotubuli-Netzwerk, zum anderen das  $\gamma$ -Tubulin, als an dessen Regulation beteiligtes Protein, fluoreszenzmikroskopisch visualisiert werden. Dies setzt zunächst die Entwicklung einer effizienten Methode zur *A. tumefaciens* vermittelten stabilen Transfektion der entsprechenden Zelllinie voraus.



## 2 Material und Methoden

### 2.1 Steriles Arbeiten

Um Kontaminationen von Proben durch fremd-DNA bzw. unerwünschte Mikroorganismen zu verhindern, wurden sämtliche hitzeunempfindlichen Verbrauchsmaterialien und Medien autoklaviert. Die hitzelabilen Antibiotika wurden den abgekühlten Nährmedien erst nach dem Autoklavieren unter sterilen Bedingungen zugegeben. Die verwendeten Glasmaterialien wurden bei trockener Hitze, für 3 Stunden, bei 180 °C, in einem Heißluft-Sterilisationsschrank (U50, Memmert GmbH + Co. KG, Schwabach, Germany) sterilisiert. Die Arbeitsbereiche und Einweg-Latexhandschuhe wurden mit Ethanol (70 Vol.-%) oberflächendesinfiziert. Die Arbeiten mit Zell- bzw. Bakterienkulturen und autoklavierten Medien oder Lösungen wurden stets unter einer Laminar Air-Flow Sterilbank (BDK Luft- und Reinraumtechnik GmbH, Sonnenbühl-Genkingen, Germany) ausgeführt. Dabei verwendete Instrumente zum Entnehmen, Übertragen oder Ausplattieren (z.B. Pinzette, Impföse oder Drigalskispatel) wurden abgeflammt bzw. ausgeglüht.

### 2.2 Umgang mit der *BY-2* Zellkultur

Die für die vorliegende Arbeit verwendete *BY-2* Zellkultur ist ein Modellorganismus für Studien des pflanzlichen Cytoskeletts. Aufgrund guter Eigenschaften bei der *Agrobacterium* vermittelten stabilen Transfektion und der mikroskopischen Analyse FP-markierter Proteine eignet sie sich besonders für molekularbiologische Untersuchungen.

Die in dieser Arbeit etablierten Zelllinien wurden durch zwei unterschiedliche Methoden kultiviert. Um eine schnelle Verfügbarkeit größerer Mengen einer Zelllinie zu gewährleisten, wurde diese als Flüssigkultur im 7 tägigen Turnus in steriles, nach Nagata et al. (1992) modifiziertes, Linsmaier und Skoog (LS)-Medium (Linsmaier und Skoog, 1965) überimpft (siehe Anhang). Dabei wurden 0,5 ml einer 7 Tage alten Kultur, mit weitlumiger Pipette, in 100 ml Erlenmeyerkolben mit 25 ml LS-Medium überführt. Um eine hohe Teilungsrate sicherzustellen, die Elongation zu verhindern und die Zellen in einem undifferenzierten Zustand zu halten, wurde dem Medium Auxin in Form von 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure (2,4-D) hinzugefügt (Hasezawa und Syōno, 1983). Die Kulturen wurden auf einem Rotationsschüttler (Infors AG, Bottmingen, Schweiz) bei 100 Umdrehungen pro Minute (rpm), in einem Klimaraum bei konstanten 24°C, im Dunkeln angezogen.

Zur sicheren und langfristigen Erhaltung der Zelllinien wurden Kalluskulturen angelegt. Dabei wurden alle 3 Wochen mit einer Impföse stecknadelkopfgroße Fragmente eines Kallus auf sterile LS-Platten,

die mit 4 g/L GELRITE® (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Germany) verfestigt wurden, überführt. Die mit Nesco-Film verschlossenen Platten wurden in einem Klimaraum bei konstanten 24°C im Dunkeln angezogen.

Das Überimpfen fand stets an einer Sterilbank statt. Den Medien wurde gegebenenfalls ein adäquates Antibiotikum zugegeben. Zur Sicherheit wurden je 2 Erlenmeyerkolben mit LS-Medium bzw. LS-Platten angeimpft.

## 2.3 Verwendete Bakterienstämme

### 2.3.1 *Escherichia coli* DH5 $\alpha$

Für sämtliche Klonierungsversuche mit *Escherichia coli* (*E. coli*) wurden Bakterien vom Stamm DH5 $\alpha$  verwendet. Dieser zeichnet sich durch eine hohe Transformationseffizienz, auch beim Einsatz größerer Plasmide, aus (Focus BRL 1986). Der Genotyp wird im Folgenden aufgeführt (Grant et al., 1990):

F<sup>-</sup> endA1 hsdR17 (r<sub>k</sub><sup>-</sup>, m<sub>k</sub><sup>+</sup>) supE44 thi-1  $\lambda$ <sup>-</sup> recA1 gyrA96 relA1 deoR  $\Delta$ (lacZYA-argF)U169  $\phi$ 80dlacZ  $\Delta$ M15

#### 2.3.1.1 Umgang mit *E. coli* Bakterien

Alle Versuche mit *E. coli* fanden unter sterilen Bedingungen statt. Die Bakterien wurden in flüssigem oder auf verfestigtem Luria Bertani (LB)-Medium kultiviert (siehe Anhang). Gegebenenfalls wurden den Nährmedien, zur Selektion, Antibiotika zugegeben. Falls nicht anders angegeben, wurden die Kulturen über Nacht (ÜN), für mindestens 16 h, bei 37°C inkubiert. Die Flüssigkulturen wurden im Schüttelwasserbad bei 140 rpm, Plattenkulturen im Inkubationsschrank kultiviert. Zur kurzfristigen Lagerung (Stunden bis wenige Tage) konnten die Bakterienkulturen bei 4°C im Kühlschrank aufbewahrt werden. Für eine langfristige und sichere Verwahrung der Flüssigkulturen wurden diese in 1,5 ml Reaktionsgefäßen 1:1 mit Glycerol (65 Vol.-%) versetzt und bei -72°C gelagert. Auf diese Weise behandelte Kulturen werden im Weiteren als Dauerkulturen bezeichnet.

### 2.3.1.2 Herstellung kompetenter *E. coli* Bakterien

Um Fremd-DNA in Form von Plasmiden auf *DH5 $\alpha$* -Zellen übertragen zu können, mussten diese zunächst auf chemischem Wege kompetent gemacht werden. Die verwendete Methode basiert auf der Arbeit von Cohen et al. (1972).

Dazu wurden 10 ml LB-Medium in einer Laborglasflasche mit 1 Vol.-% einer *DH5 $\alpha$* -Dauerkultur inokuliert. Es folgte eine Inkubation der Kultur über Nacht im Schüttelwasserbad bei 140 rpm und 37°C. Am folgenden Tag wurden 200 ml LB-Medium in einer Laborglasflasche mit 1 Vol.-% der *DH5 $\alpha$* -Übernachtskultur beimpft. Sobald die Kultur eine optische Dichte bei  $\lambda = 600 \text{ nm}$  ( $OD_{600\text{nm}}$ ) von 0,5 - 0,7 aufwies, wurden die Bakterien in einem sterilen Zentrifugengefäß für 10 min bei 3000 g und 4°C pelletiert (Beckman J2-21 mit JA-14 Festwinkelrotor, Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Germany). Der Überstand wurde abgenommen und verworfen. Das Pellet wurde in 10 ml TFB I Puffer (siehe Anhang) resuspendiert und für 5 min auf Eis abgekühlt. Die Bakterienlösung wurde anschließend erneut für 8 min bei 3000 g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde wieder verworfen und das resultierende Pellet in 1 ml TFB II Puffer (siehe Anhang) resuspendiert. Die Bakterien wurden in 1,5 ml Reaktionsgefäßen zu 50  $\mu\text{l}$  aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die somit kompetenten Bakterien konnten für mehrere Monate bei -72°C gelagert werden.

### 2.3.1.3 Transformation kompetenter *E. coli* Bakterien

Die verwendete Methode zum Transfer von Plasmiden in chemisch kompetente *DH5 $\alpha$*  Bakterien, basiert auf den Arbeiten von Mandel und Higa (1970), Hanahan (1983) und Pope und Kent (1996).

Für jeden Transformationsansatz wurde ein Aliquot chemisch kompetenter Bakterien (siehe 2.3.1.2) auf Eis aufgetaut. Zu dem Ansatz wurden 200 ng Plasmid-DNA pipettiert. Das Reaktionsgefäß wurde mehrfach vorsichtig invertiert und für 20 min auf Eis inkubiert. Es folgte ein Hitzeschock bei 42°C für 45 s und eine weitere Inkubation des Ansatzes für 2 min auf Eis. Nach Hinzugabe von 200  $\mu\text{l}$  LB-Medium wurden die Bakterien für 90 min bei 37°C und 140 rpm im Schüttelwasserbad angezogen. Dieser Schritt sorgt dafür, dass Resistenz-Gene, die auf den Plasmiden liegen, in transformierten Zellen vor der folgenden Selektion exprimiert werden, was zu einer Steigerung der Transformationsrate führt (Cohen et al., 1972). Anschließend wurden 100  $\mu\text{l}$  des Ansatzes auf LB-Agarplatten mit adäquaten Antibiotika ausgebracht und ÜN in einem Inkubationsschrank bei 37°C kultiviert. Am folgenden Tag wurden Einzelkolonien in flüssiges LB-Medium, mit entsprechenden Antibiotika, überführt. Die Anzucht erfolgte ÜN bei 37°C und 140 rpm im Schüttelwasserbad. Abschließend wurde eine Kolonie-PCR (siehe 2.6.2) zur Identifikation erfolgreich transformierter *E. coli* durchgeführt.

### 2.3.2 *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 und C58C1

Zu Beginn der 80er Jahre beschrieben Jozef Schell und Marc van Montagu eine Methode zum Transfer fremder DNA durch *Agrobacterium tumefaciens* in pflanzliche Zellen. Die Agrobakterien vermittelte Transfektion von Pflanzen ist seither eine der wichtigsten Methoden der Grünen Gentechnik, sie wird ständig weiterentwickelt und an unterschiedlichste Fragestellungen angepasst.

Die in der vorliegenden Arbeit überwiegend verwendeten Agrobakterien vom Stamm *LBA4404*, zeichnen sich durch eine hohe Transfektionsrate, gerade in Bezug auf *BY-2* Zellen, aus (Geelen und Inzé, 2001). Auch wurden in den vergangenen Jahrzehnten zahlreiche Publikationen veröffentlicht, in denen dieser Stamm zur Transfektion von Tabak, insbesondere der *BY-2* Zellkultur (z.B. David und Perrot-Rechenmann, 2001 oder Kumagai et al., 2003), verwendet wurde. Der Genotyp wird im Folgenden aufgeführt (Hoekema et al., 1983):

Ach5 pTiAch5ΔT [pAL4404]

Für einzelne Versuche mit einem induzierbaren Promotorsystem wurde eine Kombination aus dem Vektor *pMDC7* (Curtis und Grossniklaus, 2003) und dem Agrobakterienstamm *C58C1* (Deblaere et al., 1985) eingesetzt. Dieses System wurde in Versuchen zur transienten Transfektion von *Nicotiana benthamiana* (Ostertag, 2012) in der Arbeitsgruppe verwendet. Der Genotyp wird im Folgenden aufgeführt (Deblaere et al., 1985; Hellens und Mullineaux, 2000):

C58 (Rif<sup>R</sup>) NOP

#### 2.3.2.1 Umgang mit *A. tumefaciens*

Alle Versuche mit *A. tumefaciens* fanden unter sterilen Bedingungen statt, sämtliche Arbeitsschritte wurden an einer Sterilbank durchgeführt. Die Bakterien wurden in flüssigem oder auf verfestigtem YEB-Medium kultiviert (Vervliet et al., 1975; siehe Anhang). Gegebenenfalls wurden den Nährmedien zur Selektion Antibiotika zugegeben. Flüssigkulturen wurden im Schüttelwasserbad bei 140 rpm und 28°C ÜN für mindestens 16 h inkubiert. Plattenkulturen wurden im Inkubationsschrank bei 28°C für 24 - 72 h kultiviert. Für eine langfristige und sichere Verwahrung wurden Dauerkulturen, wie unter 2.3.1.1 beschrieben, angelegt.

### **2.3.2.2 Herstellung kompetenter *A. tumefaciens***

Um Plasmid-DNA auf *A. tumefaciens* übertragen zu können, wurden kompetente Agrobakterien durch die Methode nach Höfgen und Willmitzer (1988) hergestellt. Aus einer Übernachtskultur wurden 2 ml Inokulum in 200 ml YEB-Medium überführt. Nach 3 - 4 h befanden sich die Zellen in der logarithmischen Wachstumsphase. Es folgte eine 20 minütige Zentrifugation bei 3000 g und 4°C. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet einmal mit 10 ml vorgekühltem TE-Puffer (siehe Anhang) gewaschen. Abschließend wurde das Pellet in 20 ml frischem YEB-Medium resuspendiert. Die Bakterien wurden in 2 ml Reaktionsgefäßen zu 500 µl aliquotiert und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die kompetenten Bakterien konnten für mehrere Monate bei -72°C gelagert werden.

### **2.3.2.3 Transformation kompetenter *A. tumefaciens***

Für den Transfer von Plasmiden in kompetente Agrobakterien wurde die von Höfgen und Willmitzer (1988) abgewandelte freeze-thaw Methode nach Holsters et al. (1978) angewandt.

Die kompetenten Agrobakterien wurden auf Eis aufgetaut und mit 1 µg Plasmid-DNA durch mehrfaches vorsichtiges Invertieren gemischt. Es folgten drei Inkubationsschritte: für 5 min auf Eis, für 5 min in flüssigem Stickstoff und für 5 min bei 37°C im Wasserbad. Nach Zugabe von 1 ml YEB-Medium wurden die Bakterien für 3 h bei 28°C und 140 rpm im Schüttelwasserbad angezogen. Die Ansätze wurden alle 30 min mehrfach invertiert. Von jedem Ansatz wurden 200 µl auf einer YEB-Platte, die adäquate Antibiotika enthielt, ausplattiert. Die Bakterien wurden für 48 - 72 h bei 28°C im Inkubationsschrank kultiviert. Anschließend wurden Einzelkolonien in flüssiges YEB-Medium überführt. Die Kultivierung erfolgte ÜN bei 28°C und 140 rpm im Schüttelwasserbad. Am folgenden Tag wurde eine Kolonie-PCR (siehe 2.6.2) zur Identifikation erfolgreich transformierter *A. tumefaciens* durchgeführt.

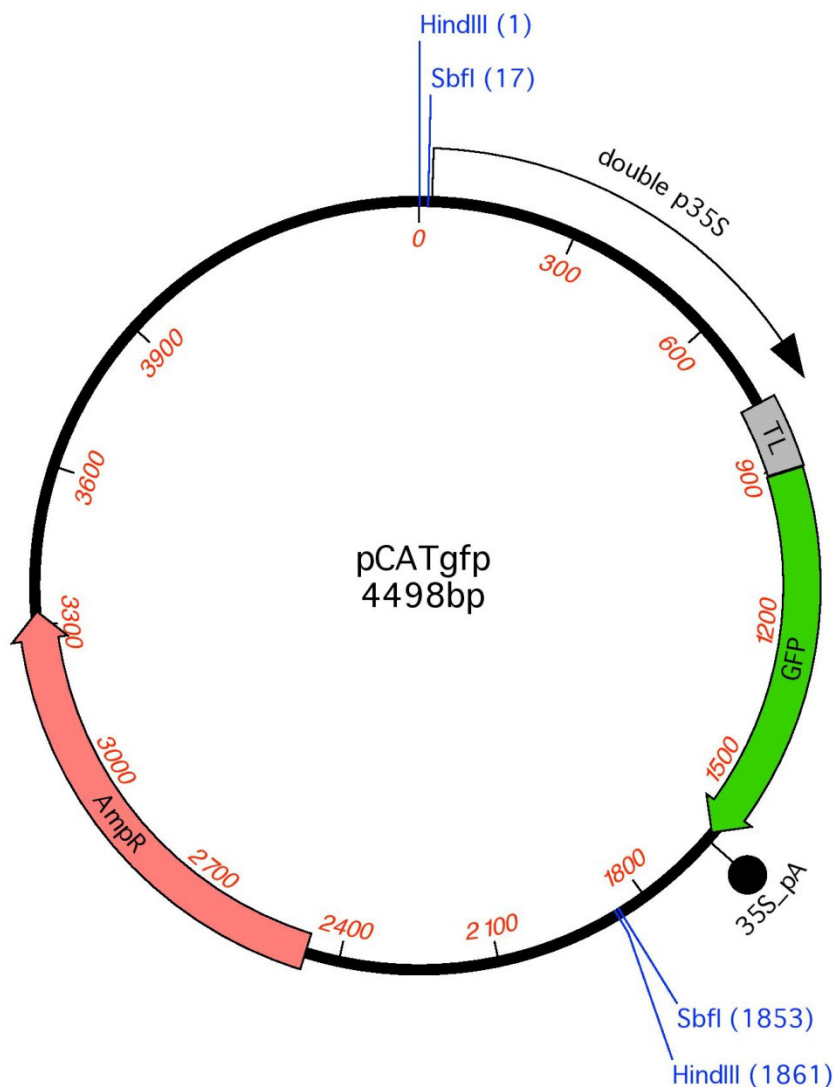
## **2.4 Verwendete Plasmide**

Für die Versuche der vorliegenden Arbeit standen folgende Plasmide zur Verfügung.

### **2.4.1 pCATgfp**

Das Plasmid pCATgfp wurde der Arbeitsgruppe durch AlPlanta (Institute for Plant Research, RLP AgroScience GmbH, Neustadt a.d. Weinstraße) überlassen. Es verfügt über die Sequenz eines GFP-Gens unter Kontrolle eines doppelten 35S-Promotors und des 35S-Terminators. Bei der GFP-Sequenz

handelt es sich um eine Variante, die für eine Expression in Pflanzenzellen optimiert wurde. Die Expression eines nativen GFP-Gens in Pflanzen führt zu einem aberranten *Splicing* eines kryptischen Introns, wodurch es aus der codierende Sequenz (CDS) entfernt wird (Haseloff und Amos, 1995). Um dies zu verhindern, wurde die Sequenz an den Positionen, die für das fehlerhafte *Splicing* verantwortlich sind, verändert. Dabei wurden ausschließlich synonyme Codons verwendet, wodurch bei einer Expression ein zum Wildtyp identisches Protein entsteht (Haseloff et al., 1997). Zur Verbesserung der Fluoreszenzeigenschaften verfügt das GFP über die S65C Mutation (Cubitt et al., 1995; Heim et al., 1995; Reichel et al., 1996). Zudem befindet sich ein Ampicillin-Resistenzgen (AmpR) auf dem Plasmid. Eine schematische Darstellung zeigt Abbildung 2.1.

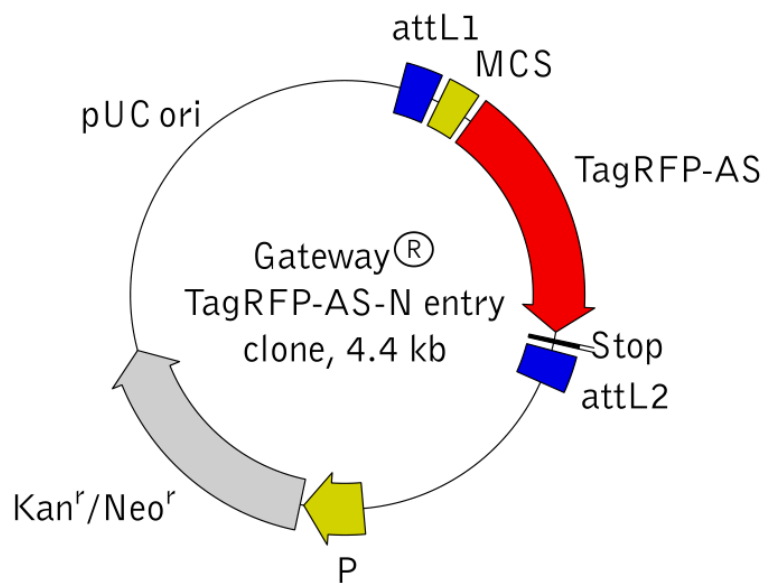


**Abbildung 2.1: Vektorkarte von pCATgfp.**

Schematische Darstellung des Vektors pCATgfp. Für die Arbeit relevante Bestandteile sind farblich hervorgehoben. Double p35S (doppelter 35S-Promotor), TL (*tobacco etch viral 5'-leader*), GFP (GFP-CDS), 35S\_pA (35S-Terminator), AmpR (Ampicillin-Resistenzgen).

### 2.4.2 Gateway® TagRFP-AS-N entry clone

Bei dem Gateway® TagRFP-AS-N entry clone (Evrogen JSC, Moscow, Russia) handelt es sich um einen Vektor, der die codierende Sequenz für das rot fluoreszierende Protein TagRFP enthält. Durch Anpassung an das *codon usage* wurde die Sequenz für hohe Expressionsraten in *Arabidopsis* und *Saccharomyces* optimiert. Am 5'-Ende des promotorlosen Gens befindet sich eine MCS. Auf dem Backbone des Plasmids ist zudem ein pUC ori (Replikationsursprung) und die Sequenz eines Kanamycin/Neomycin-Resistenzgens für die Selektion in Prokaryoten lokalisiert. Eine schematische Darstellung zeigt Abbildung 2.2.



**Abbildung 2.2:** Vektorkarte von Gateway® TagRFP-AS-N entry clone.

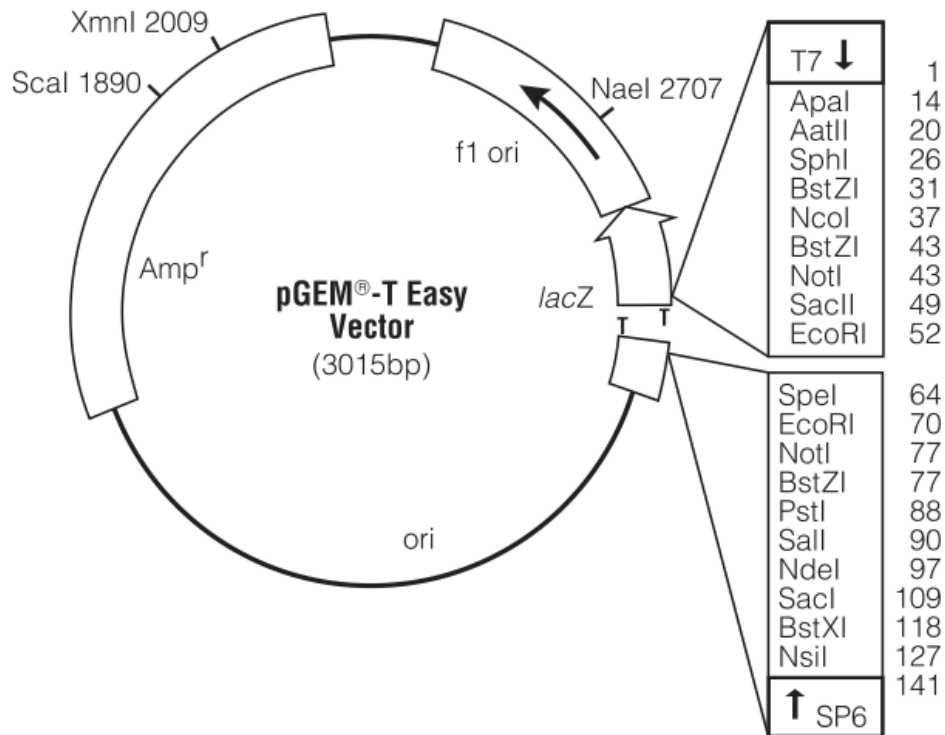
Schematische Darstellung des Vektors Gateway® TagRFP-AS-N entry clone. attL1 und attL2 (Rekombinationsstellen für Gateway® Cloning), MCS (multiple cloning site), TagRFP-AS (codierende Sequenz für das rot fluoreszierende Protein TagRFP, mit Anpassungen an das *codon usage* von *Arabidopsis* und *Saccharomyces*), P (Promotor), Kan<sup>r</sup>/Neo<sup>r</sup> (Kanamycin/Neomycin-Resistenzgen), pUC ori (Replikationsursprung). (Quelle: www.evrogen.com)

### 2.4.3 pJET1.2 blunt cloning vector (Thermo Scientific)

Das Plasmid pJET1.2 blunt ist ein linearisierter Klonierungsvektor, der über ein Letalfaktor-Selektionssystem verfügt. Wird ein Insert in die Klonierungsstelle ligiert, ist das letale Gen inaktiv, da die Sequenz durch das eingebrachte Fragment unterbrochen wird. Bei Zirkularisierung ohne Integration fremder DNA kommt es zu der funktionellen Form des Gens. Da das linearisierte Plasmid über glatte Enden verfügt, handelt es sich um eine *Blunt-End*-Klonierung, die Integrationsstelle befindet sich innerhalb der MCS. Durch die Kombination mit einem Ampicillin-Resistenzgen auf dem Vektor können Bakterien, die ein rekombinantes Plasmid aufgenommen haben, positiv selektiert





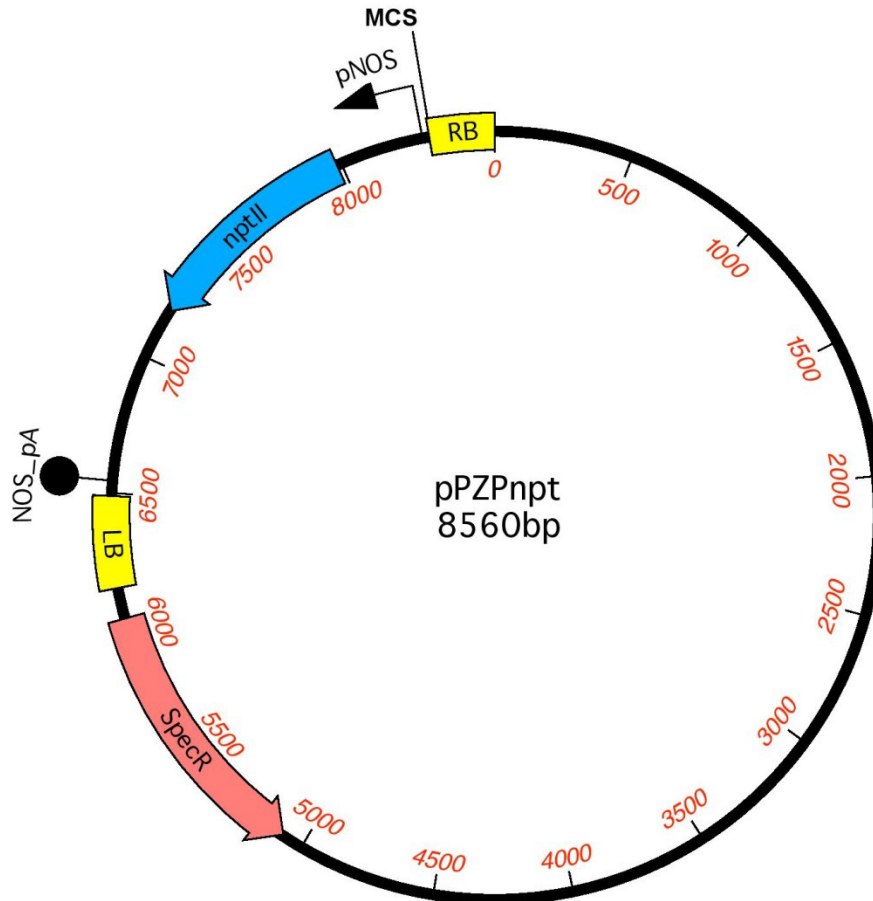


**Abbildung 2.4: Vektorkarte von pGEM®-T Easy Vector.**

Schematische Darstellung des Vektors pGEM®-T Easy. Die Klonierungsstelle befindet sich innerhalb des *lacZ*-Gens (Gen für  $\beta$ -Galactosidase) und verfügt über Thymidin-Überhänge an den 3'-Enden. Ori (Replikationsursprung), Amp<sup>r</sup> (Ampicillin-Resistenzgen). (Quelle: www.promega.de)

### 2.4.5 pPZPnpt

Das Plasmid pPZPnpt wurde der Arbeitsgruppe ebenfalls durch AIPlanta überlassen. Hierbei handelt es sich um einen binären Vektor, der zum Transfer von DNA in Pflanzenzellen via *Agrobacterium* genutzt wird. Es basiert auf dem Backbone des Plasmids pPZP200 (Hajdukiewicz et al., 1994) und verfügt über eine LB und eine RB. Dazwischen liegt eine *multiple cloning site* (MCS) und das Neomycin-Phosphotransferase-II (*nptII*) Gen unter Kontrolle des Nopalinsynthase-Promotors (pNOS) und des entsprechenden Terminators (NOS\_pA). Das *nptII*-Gen vermittelt eine Resistenz gegen Kanamycin (Kan) und dient der Selektion transfizierter Pflanzenzellen. Außerhalb der Bordersequenzen befindet sich zudem ein Spectinomycin-Resistenzgen (SpecR) für die Selektion in Prokaryoten. Eine schematische Darstellung zeigt Abbildung 2.5.

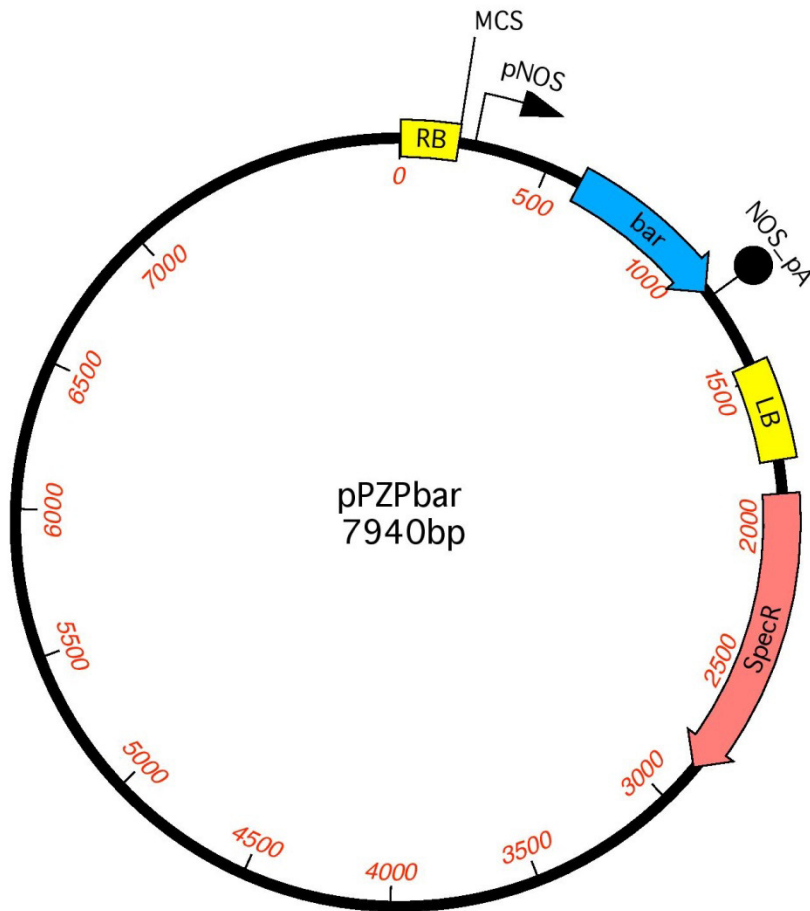


**Abbildung 2.5: Vektorkarte von pPZPnpt.**

Schematische Darstellung des binären Vektors pPZPnpt. Für die Arbeit relevante Bestandteile sind farblich hervorgehoben. RB (*right border*), MCS (*multiple cloning site*), pNOS (Nopaline-Synthase-Promotor), nptII (Neomycin-Phosphotransferase-II-Gen, vermittelt Resistenz gegen Kan), NOS\_pA (Nopaline-Synthase-Terminator), LB (*left border*), SpecR (Spectinomycin-Resistenzgen).

#### 2.4.6 pPZPbar

Auch das Plasmid pPZPbar wurde der Arbeitsgruppe durch AlPlanta überlassen. Im Wesentlichen unterscheidet es sich von pPZPnpt durch das Vorhandensein eines Bialaphos-Resistenzgens (*bar*-Gens) anstelle des *nptII*-Gens. Das *bar*-Gen vermittelt eine Resistenz gegen Phosphinothricin (PPT) und dient der Selektion transfizierter Pflanzenzellen. Eine schematische Darstellung zeigt Abbildung 2.6.

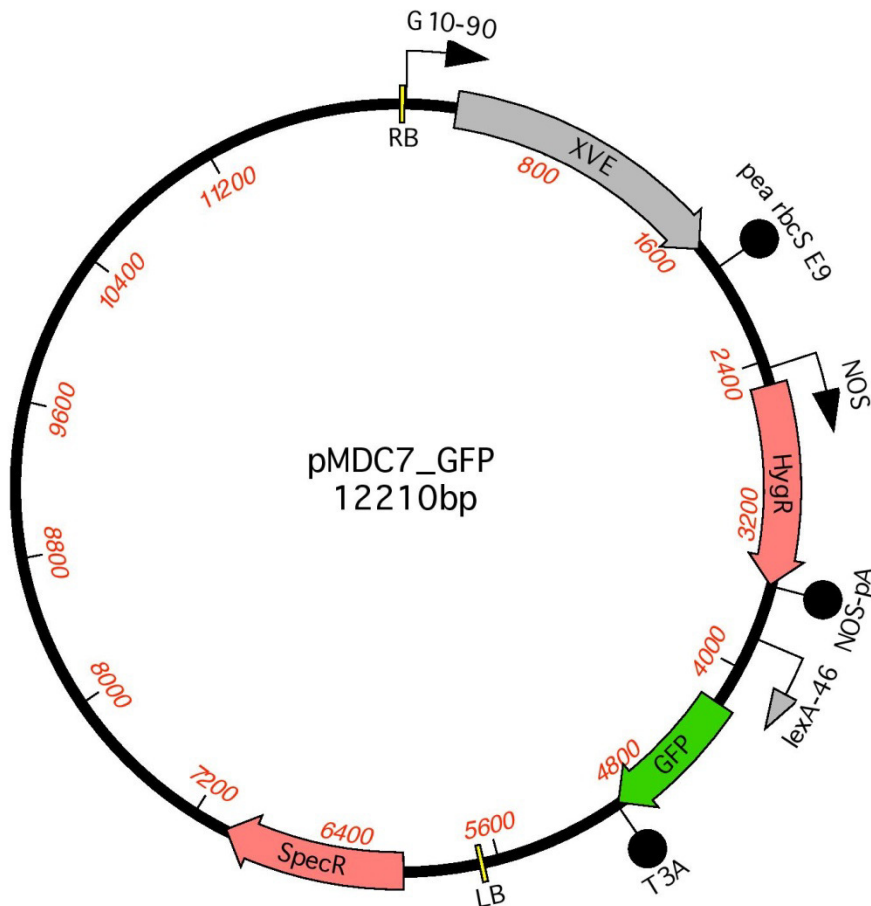


**Abbildung 2.6: Vektorkarte von pPZPbar.**

Schematische Darstellung des binären Vektors pPZPbar. Für die Arbeit relevante Bestandteile sind farblich hervorgehoben. RB (*right border*), MCS (*multiple cloning site*), pNOS (Nopalinsynthase-Promotor), bar (Bialaphos-Resistenzgen, vermittelt Resistenz gegen PPT), NOS\_pA (Nopalinsynthase-Terminator), LB (*left border*), SpecR (Spectinomycin-Resistenzgen).

#### 2.4.7 pMDC7\_GFP

Der Vektor pMDC7\_GFP lag bereits in der Arbeitsgruppe vor, er wurde durch Michael Ostertag kloniert und in *A. tumefaciens* LBA4404 und C58C1 zur Verfügung gestellt. Es handelt sich um einen binären Vektor, der zum *Agrobacterium* vermittelten Transfer von DNA in Pflanzenzellen genutzt wird. Der Vektor verfügt über Bordersequenzen (LB und RB), dazwischen liegt ein der Selektion transfizierter Pflanzenzellen dienendes Hygromycin-Resistenzgen und die GFP-CDS unter Kontrolle des induzierbaren XVE-Promotorsystems (Zuo et al., 2000). Außerhalb der Bordersequenzen befindet sich zudem ein Spectinomycin-Resistenzgen für die Selektion in Prokaryoten. Eine schematische Darstellung zeigt Abbildung 2.7.



**Abbildung 2.7: Vektorkarte von pMDC7\_GFP.**

Schematische Darstellung des binären Vektors pMDC7\_GFP. Für die Arbeit relevante Bestandteile sind farblich hervorgehoben. RB (*right border*), G 10-90 (konstitutiver Promotor), XVE (CDS des Transkriptionsaktivators XVE), *pea rbcS E9* (Terminator), NOS (Nopalinsynthase-Promotor), HygR (Hygromycin-Resistenzgen), NOS-pA (Nopalinsynthase-Terminator), *lexA-46* (induzierbarer Promotor), GFP (GFP-CDS aus dem Vektor pCATgfp), T3A (Terminator), LB (*left border*), SpecR (Spectinomycin-Resistenzgen).

## 2.5 Isolation von Nukleinsäuren

Um Nukleinsäuren für die unterschiedlichsten Versuche wie die Amplifikation einzelner Bereiche der DNA, die Sequenzierung der selbigen oder die Klonierung einer Sequenz verfügbar zu machen, muss diese zunächst aus dem entsprechenden Organismus isoliert werden. Im Folgenden werden die Methoden beschrieben, die in der vorliegenden Arbeit zur Präparation von Nukleinsäuren aus *BY-2* Zellen und Bakterien eingesetzt wurden. Die Berechnung der Nukleinsäurekonzentration in den Lösungen erfolgte mit Hilfe der photometrisch bestimmten optischen Dichte (OD) bei  $\lambda = 260 \text{ nm}$  (Sambrook und Russell, 2001; Mülhardt, 2006).

### 2.5.1 Aufschluss von *BY-2* Zellen

Pflanzliche Zellen besitzen neben der Zellmembran eine äußerst robuste Zellwand. Aufgrund dessen ist bei einer Nukleinsäure-Extraktion aus pflanzlichem Gewebe oder einer Zellkultur ein mechanischer Zellaufschluss erforderlich.

Die Zellen wurden geerntet, indem sie in einem sterilen Corex-Zentrifugenröhrchen sedimentiert wurden. Der Überstand (Nährmedium) wurde verworfen und die Zellen zu 100 mg Portionen in Taschen aus Aluminiumfolie in flüssigem Stickstoff eingefroren. Für eine kurzfristige Lagerung wurden die Zellen im flüssigen Stickstoff belassen, langfristig konnten sie bei -72°C gelagert werden.

Für jeden Aufschluss wurde ein Aliquot der entsprechenden Probe in einen mit Chloroform gereinigten und flüssigem Stickstoff vorgekühlten Mörser überführt. Mit Hilfe eines Pistills konnten die Zellen zu einem sehr feinen Pulver homogenisiert werden. Um die Gefahr eines Abbaus durch Nukleasen möglichst gering zu halten, durften die Proben bis zum Überführen in einen Extraktionspuffer nicht auftauen. Dies wurde durch wiederholte Zugabe von flüssigem Stickstoff gewährleistet. Die Weiterverarbeitung des Homogenats wurde wie unter 2.5.2 (DNA-Isolation), respektive 2.5.3 (RNA-Isolation) beschrieben durchgeführt.

### 2.5.2 DNA-Isolation

Zur DNA-Isolation aus *BY-2* Zellen wurde das Kit NucleoSpin® Plant II (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Germany) verwendet. Die Durchführung fand nach Herstellerangaben statt. Ernte und Aufschluss des Zellmaterials wurden wie unter 2.5.1 beschrieben vorgenommen. Das Kit beinhaltet zwei alternativ verwendbare Lysepuffer. Der Puffer PL1 basiert auf CTAB, PL2 auf SDS. In Vorversuchen wurde nach Herstellerempfehlung eine simultane DNA-Isolation durchgeführt, um den optimalen Lysepuffer für *BY-2* Zellen zu bestimmen. Die resultierenden Isolate wurden sowohl durch qualitative als auch quantitative Methoden bewertet (Ergebnisse nicht gezeigt). Auf der Grundlage dieses Vergleiches wurde in der Folge ausschließlich PL2 verwendet.

Abweichend vom Standardprotokoll wurde, der Empfehlung des Herstellers folgend, die Inkubationszeit der Proben im Lysepuffer von 10 auf 30 min verlängert, wodurch eine höhere DNA-Ausbeute erzielt werden konnte. Um mögliche negative Einflüsse auf Folgereaktionen zu verhindern, fand bei der Elution der DNA steriles bidestilliertes Wasser (*sddH<sub>2</sub>O*) an Stelle des PE-Puffers Verwendung. Die Isolate konnten für mehrere Wochen bei 4°C gelagert werden.

### 2.5.3 RNA-Isolation

Zur RNA-Isolation aus *BY-2* Zellen wurde das Kit NucleoSpin® RNA Plant (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Germany) verwendet. Die Durchführung fand nach Herstellerangaben statt. Ernte und Aufschluss des Zellmaterials wurden wie unter 2.5.1 beschrieben vorgenommen. Zur Lyse wurde der Puffer RA1 und  $\beta$ -Mercaptoethanol, wie im Standardprotokoll beschrieben, eingesetzt. Nach der Elution mit *sddH*<sub>2</sub>O konnten die Isolate über einen kurzen Zeitraum bei -22°C gelagert werden.

### 2.5.4 Plasmid-Isolation

Um Plasmide aus Bakterien zu isolieren, wurde das Kit NucleoSpin® Plasmid (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Germany) verwendet. Die Durchführung fand nach Herstellerangaben statt. Abweichend vom Standardprotokoll wurden 10 ml einer Übernachtskultur für 2 min bei 11000 g pelletiert. Entsprechend der Volumenverdopplung der Bakteriensuspension wurden die verwendeten Volumina der Puffer A1, A2 und A3 angepasst. Der optionale Waschpuffer AW wurde stets eingesetzt. Um die vollständige Trocknung der Silica-Membran nach den Waschschritten zu gewährleisten, wurde die Zentrifugation auf 4 min verlängert. Die Elution erfolgte mit *sddH*<sub>2</sub>O, die resultierenden Isolate konnten dauerhaft bei -22°C gelagert werden.

## 2.6 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (englisch *Polymerase Chain Reaktion*, PCR) wurde vor etwa drei Jahrzehnten entwickelt (Saiki et al., 1985) und zählt heute zu den wichtigsten Standardmethoden der Molekularbiologie. Die in der vorliegenden Arbeit eingesetzten Varianten werden im Nachfolgenden vorgestellt.

### 2.6.1 Standard-PCR

Bei der Standard-PCR kamen, je nach Fragestellung, zwei unterschiedliche Enzyme zum Einsatz. Für Routineuntersuchungen wurde die kostengünstigere GoTaq®Flexi DNA Polymerase (Promega, Madison, USA) verwendet. Musste eine sequenztreue Amplifikation sichergestellt werden, z.B. bei der DNA-Vervielfältigung für eine Klonierung, wurde die über eine *Proofreading*-Funktion verfügende Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase (Fisher Scientific-Germany GmbH, Schwerte, Germany) benutzt. Im Gegensatz zur Taq- produziert die Phusion®-Polymerase keine 3'-A-Überhänge. Die Amplifikate konnten bei einer *Blunt-End*-Klonierung (siehe 2.9.2) ohne weitere Arbeitsschritte eingesetzt werden. Dagegen war bei einer T/A-Klonierung ein *A-tailing* erforderlich (siehe 2.9.3).

Der Standard-PCR-Ansatz für die GoTaq® Flexi DNA Polymerase ist Tabelle 2.1 zu entnehmen.

**Tabelle 2.1: Standard-PCR-Ansatz für die GoTaq® Flexi DNA Polymerase**

Komponenten	Volumen [ $\mu$ l]
5x GoTaq® Flexi Puffer	10,0
MgCl <sub>2</sub> Lösung [25,0 mM]	6,0
dNTPs [2,5 mM]	4,0
<i>Forward</i> Primer	0,5
<i>Reverse</i> Primer	0,5
GoTaq® Flexi DNA Polymerase [5 u/ $\mu$ l]	0,25
<i>Template</i> -DNA [1,0 ng/ $\mu$ l]	5,0
<i>sdd</i> H <sub>2</sub> O	23,75
	$\Sigma$ 50,0 $\mu$ l

Der Standard-PCR-Ansatz für die Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase ist Tabelle 2.2 zu entnehmen.

**Tabelle 2.2: Standard-PCR-Ansatz für die Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase**

Komponenten	Volumen [ $\mu$ l]
5x Phusion® HF Puffer	10,0
dNTPs [2,5 mM]	4,0
<i>Forward</i> Primer	0,25
<i>Reverse</i> Primer	0,25
Phusion® DNA Polymerase [2 u/ $\mu$ l]	0,5
<i>Template</i> -DNA [1,0 ng/ $\mu$ l]	5,0
<i>sdd</i> H <sub>2</sub> O	30,0
	$\Sigma$ 50,0 $\mu$ l

Die Reaktion wurde in einem Thermocycler (Primus 25, MWG-Biotech, Ebersberg, Germany) durchgeführt. Die verwendeten Parameter beim Einsatz der GoTaq® Flexi DNA Polymerase sind Tabelle 2.3 zu entnehmen.

**Tabelle 2.3: Zur PCR mit der GoTaq® Flexi DNA Polymerase verwendetes Cyclerprogramm.**

<sup>1)</sup>Die Annealingtemperatur richtete sich nach der Schmelztemperatur (T<sub>m</sub>) der eingesetzten Primer. Dabei war der Primer mit der niedrigeren T<sub>m</sub> maßgebend. <sup>2)</sup>Die zur Amplifikation verwendete Zyklenzahl wurde individuell an die Erfordernisse der einzelnen Versuche angepasst und lag zwischen 25 und 40 Zyklen.

Reaktionsschritte	Zeit [s]	Temperatur [°C]	Zyklenzahl
Initiale Denaturierung	150	95,0	1
Denaturierung	45	95,0	<sup>2)</sup>
Annealing	45	<sup>1)</sup>	
Elongation	60/kbp	72,0	
Finale Elongation	300	72,0	1
Kühlung	∞	4,0	1

Die verwendeten Parameter beim Einsatz der Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase sind Tabelle 2.4 zu entnehmen.

**Tabelle 2.4: Zur PCR mit der Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase verwendetes Cyclerprogramm.**

<sup>1)</sup>Die Annealingtemperatur richtete sich nach der T<sub>m</sub> der eingesetzten Primer. Nach Herstellerangaben wurde sie 3°C höher gewählt als die niedrigere T<sub>m</sub> der beiden Primer. <sup>2)</sup>Die zur Amplifikation verwendete Zyklenzahl wurde individuell an die Erfordernisse der einzelnen Versuche angepasst und lag zwischen 25 und 32 Zyklen.

Reaktionsschritte	Zeit [s]	Temperatur [°C]	Zyklenzahl
Initiale Denaturierung	30	98,0	1
Denaturierung	10	98,0	<sup>2)</sup>
Annealing	30	<sup>1)</sup>	
Elongation	30/kbp	72,0	
Finale Elongation	480	72,0	1
Kühlung	∞	4,0	1

## 2.6.2 Kolonie-PCR

Mit Hilfe der Kolonie-PCR ist es möglich, Bakterienkolonien zu identifizieren, die nach einer Transformation (siehe 2.3.1.3 und 2.3.2.3) das eingesetzte Plasmid aufgenommen haben. Auf eine Plasmidisolierung wird verzichtet, als *Template* dienen Übernachtskulturen der zu analysierenden Kolonien.

Der Ansatz entsprach dem Standard-PCR-Ansatz für die GoTaq®Flexi DNA Polymerase (Tabelle 2.1). Hiervon abweichend diente eine Übernachtskultur der zu analysierenden Kolonie als *Template*. Die initiale Denaturierung des Cyclerprogrammes für die GoTaq® Flexi DNA Polymerase (Tabelle 2.3) wurde auf 450 s verlängert. Durch diesen Schritt wurde der Aufschluss der Bakterien gewährleistet. Auf diese Weise konnte schnell und kosteneffizient überprüft werden, ob eine Bakterienkultur über ein bestimmtes Plasmid verfügt.



### 2.6.3 *Nested-PCR*

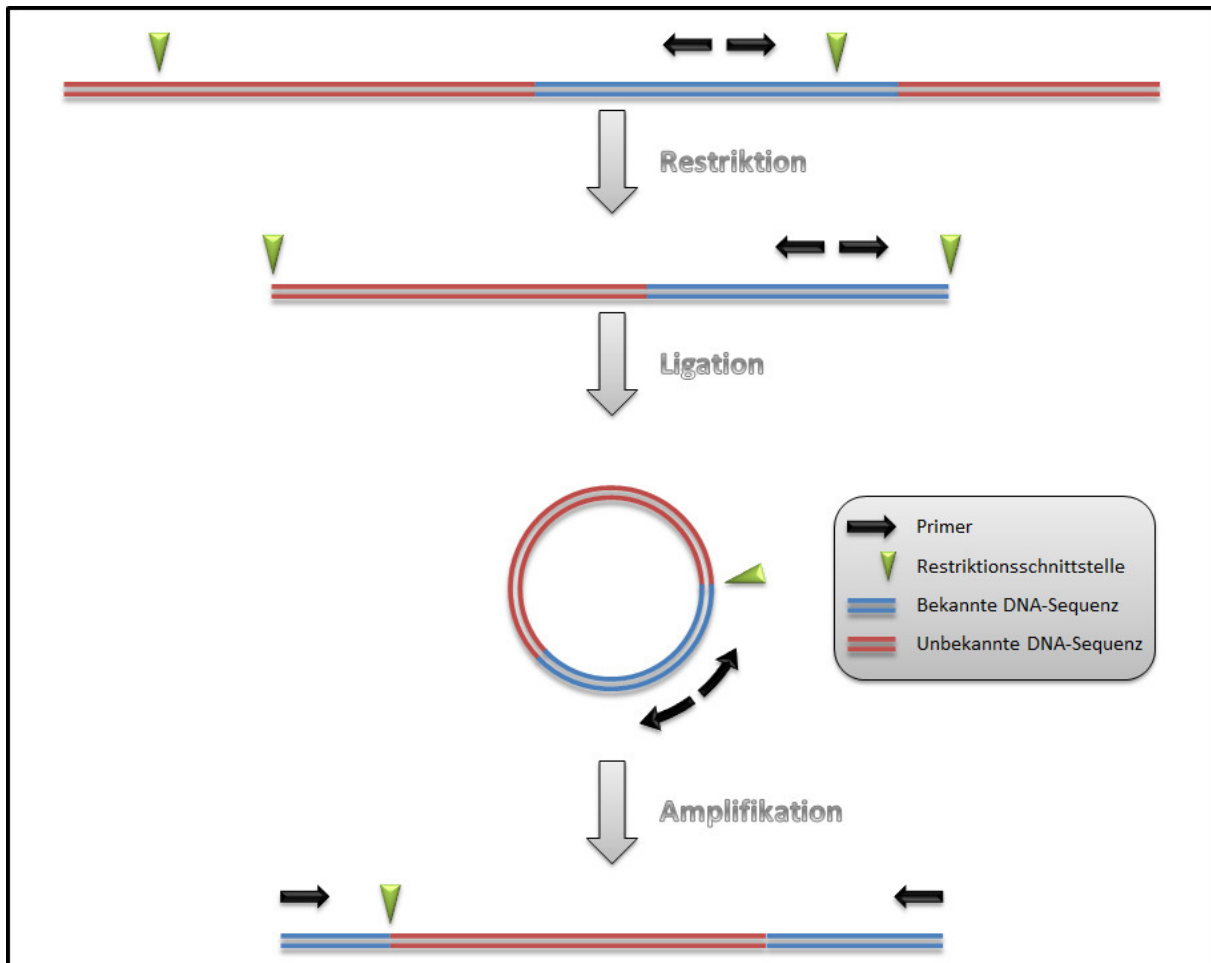
Die verschachtelte oder *nested-PCR* dient der Amplifikation eines DNA-Abschnittes, der nur in geringer Menge, im Verhältnis zur Gesamtmenge an DNA, in einer Probe vorliegt. Dabei wird eine PCR durchgeführt, bei der neben dem gewünschten DNA-Abschnitt aufgrund unspezifischer Bindungen der Primer auch andere Sequenzen amplifiziert werden können. Das resultierende Produkt dient wiederum als *Template* für eine zweite PCR. Dabei kommen Primer zum Einsatz, die innerhalb des gewünschten Amplikons *downstream* der zuerst verwendeten Primer liegen. Auf diese Weise kommt es zu einer Selektion und verstärkten Amplifikation der Zielsequenz (Mülhardt, 2006).

Die beiden Durchläufe der *nested-PCR* wurden, unter Verwendung geeigneter Primer, wie für die Standard-PCR mit GoTaq®Flexi DNA Polymerase (siehe 2.6.1) beschrieben, durchgeführt.

### 2.6.4 *Inverse-PCR*

Mit Hilfe der Inversen-PCR (IPCR) ist es möglich, unbekannte Bereiche einer DNA zu amplifizieren (Abb. 2.8). Voraussetzung dafür ist, dass mindestens ein Bereich (5' oder 3') der zu amplifizierenden Sequenz bekannt ist. In diesem Abschnitt werden Primer designt, die im Gegensatz zu denen einer Standard-PCR voneinander wegweisen. Außerdem ist eine Erkennungssequenz für eine Restriktionsendonuklease erforderlich, die abhängig von der Lage des bekannten Bereichs *upstream* oder *downstream* des Primerpaares liegen muss. Bei einer Restriktion (siehe 2.9.1.1) wird das entsprechende Enzym mit hoher Wahrscheinlichkeit auch im unbekanntem Bereich schneiden. Durch eine darauf folgende Ligation (siehe 2.9.1.2) kommt es unter anderem zur Zirkularisierung der betreffenden DNA. Dies hat zur Folge, dass die ursprünglich voneinander wegweisenden Primer nun wie die Primer einer Standard-PCR orientiert sind mit dem unbekanntem DNA-Abschnitt dazwischen (Ochman et al., 1988; Triglia et al., 1988; Mülhardt, 2006).

Die für eine IPCR verwendeten Primer und Schnittstellen wurden nach oben genannten Kriterien designt bzw. ausgewählt. Die Restriktion wurde wie unter 2.9.1.1 beschrieben durchgeführt. Die Vorgehensweise bei der Ligation ist Abschnitt 2.9.1.2 zu entnehmen. Da als *Template* für die IPCR stets eine Gesamt-DNA aus BY-2 diente, war davon auszugehen, dass es bei der Ligation, neben zahlreichen anderen Konstrukten, nur sehr selten zur Selbstzirkularisierung des gesuchten Fragments kam. Aus diesem Grund wurde die nachfolgende Amplifikation als *nested-PCR* ausgeführt.



**Abbildung 2.8:** Schematische Darstellung einer IPCR.

Die bekannte DNA-Sequenz ist blau, die unbekannt rot dargestellt. Die Primer sind, von der Standard-PCR abweichend, voneinander weg orientiert. Eine Restriktionsschnittstelle, die im bekannten Bereich liegt, befindet sich mit hoher Wahrscheinlichkeit auch an unbekannter Position in der flankierenden Sequenz. Nach Restriktionsverdau und einer Zirkularisierung des Fragmentes weisen die Primer wie in einer Standard-PCR aufeinander zu. Dabei liegt der unbekannt DNA-Abschnitt zwischen ihnen und kann nun amplifiziert werden.

### 2.6.5 Reverse Transkription-PCR

Bei der *Reverse Transkription-PCR* (RT-PCR) macht man sich die Fähigkeit sogenannter Reverser Transkriptasen (RNA-abhängige DNA-Polymerasen) zunutze, an einer RNA einen komplementären DNA-Strang zu synthetisieren. Dies kann zum Beispiel bei der Klonierung eines Gens von Vorteil sein, da hier die Länge der zu klonierenden Sequenz limitierend ist. Die prozessierte mRNA, und somit auch die resultierende *complementary DNA* (cDNA), ist kürzer als die genomische Vollständigsequenz, enthält aber trotzdem die vollständige codierende Sequenz.

Zur Herstellung von cDNA diente das Verso™ cDNA Kit (Fisher Scientific-Germany GmbH, Schwerte, Germany). Die Durchführung fand nach Herstellerangaben statt. Der im Kit enthaltene *Anchored Oligo dT* Primer wurde verwendet. Dieser bindet aufgrund seiner Struktur unspezifisch an den

Poly-A-Schwanz eukaryotischer mRNA. Der RT-Enhancer wurde stets eingesetzt. Während der Transkription der RNA entfernt er durch Degradation die kontaminierende doppelsträngige DNA aus dem Ansatz. Um die Effizienz zu steigern, mussten störende Sekundärstrukturen in der *Template*-RNA entfernt werden. Dazu wurde sie für 5 min bei 70°C inkubiert und anschließend auf Eis gekühlt.

Der RT-PCR-Ansatz für das Verso™ cDNA Kit ist Tabelle 2.5 zu entnehmen.

**Tabelle 2.5: RT-PCR-Ansatz für das Verso™ cDNA Kit.**

<sup>1)</sup>Die Menge an *sddH<sub>2</sub>O* war abhängig vom eingesetzten *Template*-Volumen.

Komponenten	Volumen [ $\mu$ l]
5x cDNA synthesis buffer	4,0
dNTP-Mix	2,0
<i>Anchored Oligo dT</i> Primer	1,0
RT Enhancer	1,0
Verso Enzyme Mix	1,0
<i>sddH<sub>2</sub>O</i>	<sup>1)</sup>
<i>Template</i> -RNA [1 ng]	1,0 – 5,0
	$\Sigma$ 20,0 $\mu$ l

Die Reaktion wurde in einem Thermocycler (Primus 25, MWG-Biotech, Ebersberg, Germany) durchgeführt. Die verwendeten Parameter sind Tabelle 2.6 zu entnehmen.

**Tabelle 2.6: Zur RT-PCR mit dem Verso™ cDNA Kit verwendetes Cyclerprogramm.**

Reaktionsschritte	Zeit [min]	Temperatur [°C]	Zyklenzahl
cDNA Synthese	40	50,0	1
Inaktivierung	2	95,0	1
Kühlung	$\infty$	4,0	1

Um eine doppelsträngige cDNA eines Gens zu erhalten, wurde diese anschließend mit genspezifischen DNA-Primern in einer Standard-PCR (siehe 2.6.1) amplifiziert.

## 2.7 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese diente der Auftrennung von Nukleinsäuren nach ihrer Größe. Dabei konnte je nach Anzahl der Proben zwischen den zwei Elektrophorese-Systemen Mini-Sub® Cell GT bzw. Wide Mini-Sub® Cell GT (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Germany) gewählt werden. Es wurden Gele mit einem Volumen von 30,0 ml (Kantenlänge 7,0 cm x 7,0 cm) bzw. 60,0 ml

(Kantenlänge 15,0 cm x 7,0 cm) hergestellt. Die Anzahl der Taschen war abhängig vom eingesetzten Kamm und betrug 8 oder 15 (Mini-Sub<sup>®</sup> Cell GT) bzw. 20 oder 35 (Wide Mini-Sub<sup>®</sup> Cell GT). Es wurden stets Gele mit einer Agarosekonzentration von 1,0 Gew.-% verwendet. Zu deren Herstellung wurde die Agarose (peqGold Universal-Agarose, PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Germany) in einem entsprechenden Volumen 0,5x Tris-Borat-EDTA Puffer (0,5x TBE-Puffer; siehe Anhang) in einer Mikrowelle (MICRO-CHEF FM 3510, Moulinex, Radolfzell), für 5 min aufgekocht. Nach dem Gießen und Auspolymerisieren der Agarose-Lösung wurde das Gel in eine Elektrophoresekammer mit 0,5x TBE-Puffer überführt. Vor dem Auftragen wurden die Proben mit dem Ladepuffer 5x Orange-G-Dye (siehe Anhang) im Verhältnis 4:1 versetzt. Als Größenstandard diente die *1 kbp-DNA-Leiter* (Carl Roth, Karlsruhe) bzw. *100 bp-DNA-Leiter extended* (Carl Roth, Karlsruhe). Für die spätere Visualisierung wurde 1 µl einer Ethidiumbromid (EtBr)-Stammlösung (1 Gew.-%) in die Anoden-Kammer pipettiert. Der Fluoreszenzfarbstoff bewegt sich im angelegten elektrischen Feld, aufgrund seiner Ladung, zur Kathode. Die Proben werden so, da sie in entgegengesetzter Richtung wandern, während der Elektrophorese im Gel gefärbt. Die Durchführung der Elektrophorese fand bei 70 V statt. Die benötigte Spannung wurde durch das Netzgerät PowerPac 300 (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Germany) erzeugt. Der Fortschritt konnte anhand der orangenen Lauffront des Ladepuffers bestimmt werden.

Die Visualisierung und Dokumentation der Gele erfolgte mit Hilfe eines UV-Transilluminators (TF-20.M-Bioblock Scientific, Illkirch, Frankreich) und einem computergestützten Kamerasystem (CF8/1 FMCC, Kappa, Göttingen, Germany) unter Verwendung der Software WinTV2000 (Hauppauge Computer Works Inc., USA). Die Bilddateien konnten digital gesichert und durch einen Thermodrucker (Video Copy Processor P67E, Mitsubishi, Japan) ausgedruckt werden.

## 2.8 Aufreinigung von PCR-Produkten

Manche der an eine Amplifikation eines DNA-Fragmentes anschließenden Versuche machen die Aufreinigung des PCR-Produktes erforderlich. Dabei wird die Bande des aufzureinigenden Amplifikats durch Ausschneiden aus dem Gel isoliert. Nach Auflösen der Gelmatrix wird die DNA an eine Säule gebunden, gereinigt und schließlich eluiert. So werden in Folgereaktionen störende Sekundärstoffe und Primer, die sich im PCR-Ansatz befinden, eliminiert.

Zur Aufreinigung von PCR-Produkten wurde das Kit NucleoSpin<sup>®</sup> Extract II (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Germany) verwendet. Die Durchführung fand nach Herstellerangaben statt. Die Auftrennung der Amplifikate wurde wie unter 2.7 beschrieben durchgeführt. Abweichend wurde für die präparativen Gele eine spezielle Agarose (GTQ Agarose, Carl Roth, Karlsruhe, Germany)

verwendet. Außerdem wurden die gesamten PCR-Ansätze mit einem adäquaten Volumen des Ladepuffers 5x Orange-G-Dye versetzt und auf mehrere Taschen eines Agarosegels aufgeteilt. Nach erfolgter Auftrennung konnten die Banden des gewünschten Fragments auf einem UV-Transilluminator (TF-20.M-Bioblock Scientific, Illkirch, Frankreich) mit Hilfe eines sterilen Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten werden. Dabei war auf eine möglichst kurze Bestrahlung des Gels zu achten, um Schädigungen der DNA durch das Einwirken von UV-Licht zu verhindern.

Um die Ausbeute zu maximieren, wurde die Elution, abweichend vom Standardprotokoll, mit zweimal 12,5 µl *sdd*H<sub>2</sub>O durchgeführt. Die aufgereinigten Amplifikate konnten dauerhaft bei -22°C gelagert werden.

## **2.9 Klonierung**

### **2.9.1 Standard-Klonierung**

Die Standard-Klonierung dient der massenhaften Vermehrung eines spezifischen DNA-Moleküls. Dabei wird das gewünschte DNA-Fragment, mittels Restriktion und Ligation, in einen geeigneten Vektor integriert. Die Vervielfältigung findet nach einer Transformation (siehe 2.3.1.3) in Bakterien statt. Ein weiterer Aspekt der Klonierung ist die Möglichkeit, das zu integrierende Fragment zu modifizieren oder ihm durch den verwendeten Vektor zusätzliche Eigenschaften hinzuzufügen (Mülhardt, 2006). Dies macht sie zu einer der zentralen Methoden des *genetic engineering*.

#### **2.9.1.1 Restriktion**

Für alle Restriktionen wurden FastDigest® Enzyme (Fisher Scientific-Germany GmbH, Schwerte, Germany) verwendet. Die Durchführung fand nach Herstellerangaben statt. Zur Gewährleistung eines vollständigen Verdaus wurde die Inkubationszeit, ohne Gefahr eines unspezifischen Schneidens, auf 2 h verlängert. Bei Klonierungen wurde beim Schneiden eines Vektors mit nur einem Restriktionsenzym, dem Ansatz 10 min vor Ende der Inkubationszeit 1 µl FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase (Fisher Scientific-Germany GmbH, Schwerte, Germany) hinzugefügt. Durch die Dephosphorylierung wurde die Wahrscheinlichkeit einer Selbstligation des Vektors verringert. Zum Beenden der Reaktionen wurden, sofern möglich, die Enzyme durch Hitze inaktiviert. Der Restriktionsansatz für FastDigest® Enzyme ist Tabelle 2.7 zu entnehmen.

**Tabelle 2.7: Restriktionsansatz für FastDigest® Enzyme.**

<sup>1)</sup> Das Volumen an *sddH<sub>2</sub>O* war abhängig vom eingesetzten Volumen der DNA-Lösung. <sup>2)</sup> Für einen Verdau wurde 1 µg DNA eingesetzt. Das verwendete Volumen richtete sich nach der Konzentration der Nukleinsäurelösung. <sup>3)</sup> Der Einsatz von FastAP war optional. Das Enzym wurde 10 min vor Ende der Inkubationszeit hinzugefügt.

Komponenten	Volumen [µl]
<i>sddH<sub>2</sub>O</i>	<sup>1)</sup>
10X FastDigest Puffer	2,0
DNA	<sup>2)</sup>
FastDigest Enzym	1,0
FastAP (optional) <sup>3)</sup>	1,0
	Σ 20,0 µl

Die Reaktion wurde in einem Thermocycler (Primus 25, MWG-Biotech, Ebersberg, Germany) durchgeführt. Die verwendeten Parameter sind Tabelle 2.8 zu entnehmen.

**Tabelle 2.8: Zur Restriktion mit FastDigest® Enzymen verwendetes Cyclerprogramm.**

<sup>1)</sup> Bei der Inaktivierung war die Dauer und Temperatur abhängig vom verwendeten Enzym.

Reaktionsschritte	Zeit [min]	Temperatur [°C]	Zyklenzahl
Restriktion	120	37,0	1
Inaktivierung	<sup>1)</sup>	<sup>1)</sup>	1
Kühlung	∞	4,0	1

### 2.9.1.2 Ligation

Für die Ligation wurde das Enzym T4 DNA Ligase (Fisher Scientific-Germany GmbH, Schwerte, Germany) verwendet. Die Durchführung fand nach Herstellerangaben statt. Bei der Ligation eines Inserts in einen Vektor wurden stets 100 ng Vektor-DNA eingesetzt. Die Insert-Menge ergab sich aus dem molaren Verhältnis von 1:3 (Vektor:Insert). Abweichend von den Herstellerangaben wurden stets 5 u der Ligase eingesetzt, unabhängig von der Beschaffenheit der Enden (*sticky* oder *blunt*) der zu ligierenden Fragmente. Darüber hinaus wurde die Inkubationszeit auf eine Stunde bei RT verlängert. Diese Abwandlungen des Standardprotokolls steigerten die Effizienz der Reaktion. Der Ligationsansatz für die verwendete T4 DNA Ligase ist Tabelle 2.9 zu entnehmen.

**Tabelle 2.9: Ligationsansatz für das Enzym T4 DNA Ligase.**

<sup>1)</sup> Es wurden 100 ng des linearisierten Vektors eingesetzt. Das Volumen errechnete sich aus der Konzentration der Vektor-DNA Lösung. <sup>2)</sup> Eingesetzte Menge und Volumen ergaben sich aus dem molaren Verhältnis von 1:3 (Vektor:Insert) und der Konzentration der Insert-DNA Lösung. <sup>3)</sup> Mit *sddH<sub>2</sub>O* wurde der Ansatz auf 20 µl aufgefüllt.

Komponenten	Volumen [µl]
Vektor-DNA (linearisiert)	<sup>1)</sup>
Insert-DNA	<sup>2)</sup>
10X T4 DNA Ligase Puffer	2,0
T4 DNA Ligase [5 u/µl]	1,0
<i>sddH<sub>2</sub>O</i>	<sup>3)</sup>
	Σ 20,0 µl

Ob eine Ligation erfolgte, konnte durch eine PCR (siehe 2.6.1) mit geeigneten Primern und dem Ligationsansatz als *Template* überprüft werden. Für eine Transformation (siehe 2.3.1.3) wurden 17,5 µl des Ligationsansatzes verwendet. Die Identifikation positiver Klone erfolgte durch eine Kolonie-PCR (siehe 2.6.2). Die entsprechenden Vektoren wurden isoliert und die korrekte Abfolge der Nukleotide durch Sequenzieren (siehe 2.10) überprüft.

### 2.9.2 Klonierung mit dem System CloneJET™

Zur Subklonierung von PCR-Produkten wurde das CloneJET™ PCR Cloning Kit (Fisher Scientific-Germany GmbH, Schwerte, Germany) verwendet. Wie in 2.4.3 bereits beschrieben, liegt der im Kit enthaltene Vektor pJET1.2 linearisiert und mit *blunt-ends* vor. Sämtliche zur Klonierung eingesetzten Amplifikate wurden mit der Phusion Polymerase, die eine *Proofreading*-Funktion aufweist, generiert. Deshalb bedurfte es keiner weiteren Präparation der Inserts, da sie bereits über *blunt-ends* verfügten. Die Durchführung der Klonierung fand nach Herstellerangaben statt. Dabei wurde das bereits erwähnte molare Verhältnis von 1:3 (Vektor:Insert) berücksichtigt. Um die Effektivität zu steigern, wurde der Ligationsansatz, abweichend von den Herstellerangaben, für 1 h bei 22°C inkubiert. Anschließend konnte er direkt zur Transformation (siehe 2.3.1.3) eingesetzt werden. Die Selektion erfolgte auf LB-Agar mit 100 mg/l Ampicillin. Wie bereits erwähnt, wird durch die Zirkularisierung des Vektors ohne Integration eines Inserts das Gen für die letale Restriktionsendonuklease *eco47IR* aktiv. So war es nur Bakterien, die ein rekombinantes Vektorkonstrukt aufgenommen haben, möglich zu wachsen. Die Identifikation positiver Klone erfolgte durch eine Kolonie-PCR (siehe 2.6.2). Die entsprechenden Vektoren wurden isoliert und die korrekte Abfolge der Nukleotide durch Sequenzieren (siehe 2.10) überprüft.

### 2.9.3 Klonierung mit dem System pGEM<sup>®</sup>-T Easy

Eine weitere Möglichkeit zur Subklonierung von PCR-Produkten war das pGEM<sup>®</sup>-T Easy Vector System (Promega GmbH, Mannheim, Germany). Der Vektor pGEM<sup>®</sup>-T Easy ist ein linearisierter Vektor mit Thymidin-Überhängen an den 3'-Enden. So ist es möglich, ein Insert durch eine T/A-Klonierung in den Vektor zu integrieren. Da sämtliche zur Klonierung eingesetzten Amplifikate mit der Phusion Polymerase, die eine *Proofreading*-Funktion aufweist, generiert wurden, mussten diese durch ein *A-tailing* mit einem Adenosin-Überhang am 3'-Ende versehen werden. Das *A-tailing* wie auch die anschließende Klonierung erfolgten nach Herstellerangaben. Die Klonierungsstelle befindet sich innerhalb des für die  $\beta$ -Galactosidase codierenden *lacZ*-Gens. Das Enzym katalysiert die Hydrolyse des Farbstoffes X-Gal, was in Bakterien, die es exprimieren, zu einer blauen Färbung führt. Durch die Integration eines Inserts in das Gen entsteht eine inaktive Form des Enzyms, so kann X-Gal nicht umgesetzt werden und die Zellen bleiben weiß. Die Aktivität des *lacZ*-Gens wird durch eine IPTG Induktion reguliert.

Zur Vorbereitung der Selektion wurden auf einer LB-Agar-Platte mit 100 mg/l Ampicillin 40  $\mu$ l einer 50 mM X-Gal-Stammlösung und 8  $\mu$ l einer 100 mM IPTG-Stammlösung ausgespatelt. Die Platte wurde für 30 min bei 37°C in einem Trockenschrank inkubiert. Anschließend konnte der Transformationsansatz auf der präparierten LB-Agar-Platte ausplattiert und ÜN bei 37°C kultiviert werden. Am folgenden Tag wurden weiße Kolonien ausgewählt und je in 10 ml LB-Flüssigmedium mit 100 mg/l Ampicillin überführt. Zur Identifikation positiver Klone wurde eine Kolonie-PCR (siehe 2.6.2) unter Verwendung geeigneter Primer durchgeführt. Die entsprechenden Vektoren wurden isoliert und die korrekte Abfolge der Nukleotide durch Sequenzieren (siehe 2.10) überprüft.

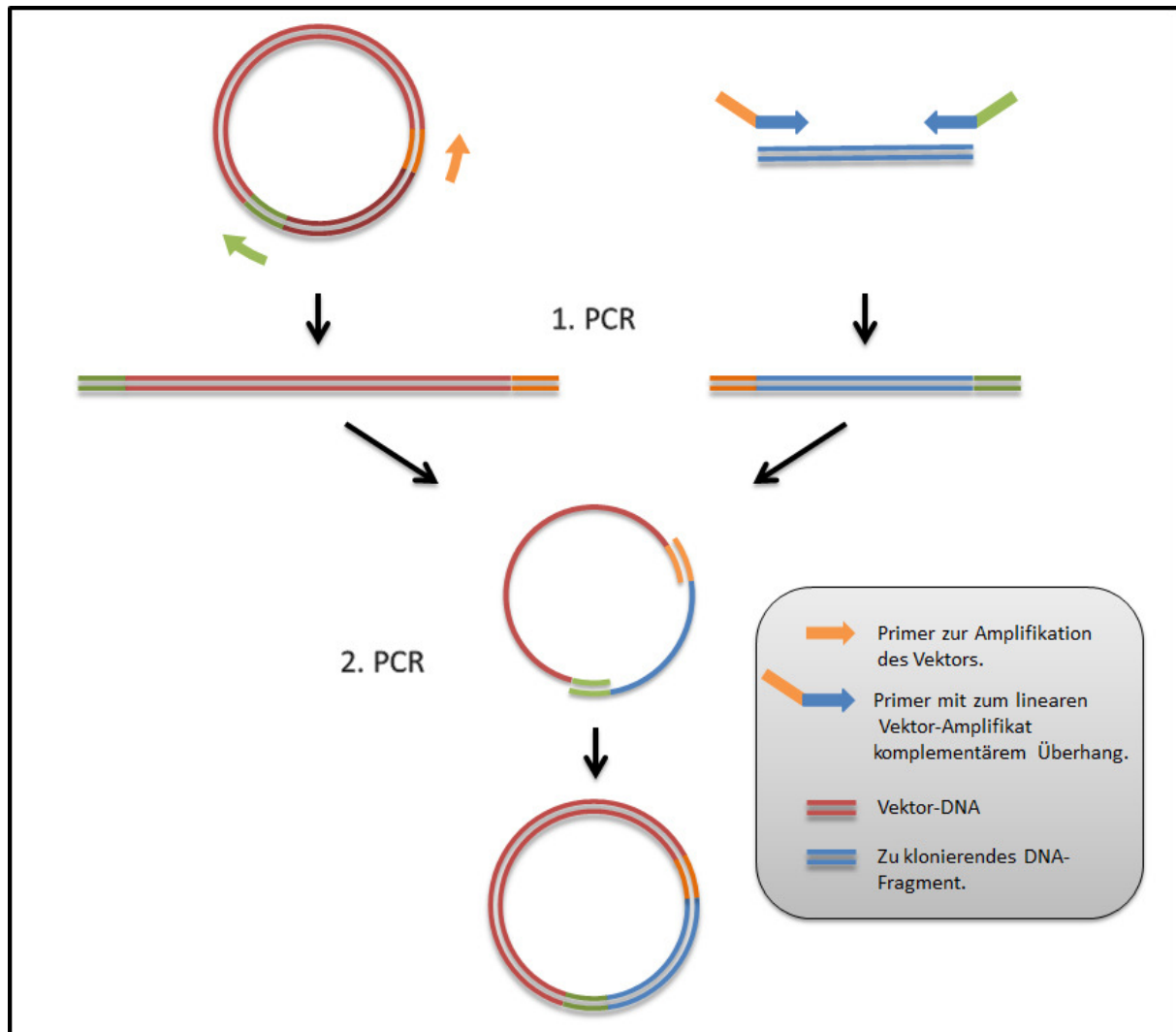
### 2.9.4 RF-Klonierung

Ein Nachteil der bereits beschriebenen Standard-Klonierung ist die Abhängigkeit von geeigneten Zielsequenzen für Restriktionsendonukleasen. Diese müssen häufig erst umständlich, an passender Stelle, in die zu verbindenden DNA-Sequenzen eingebracht werden. Einen weiteren Nachteil stellt das Abändern der Sequenz bzw. Einbringen zusätzlicher Nukleotide *per se* dar. Soll z.B. das zu integrierende Fragment mit einem bestimmten Bereich des Vektors verknüpft werden, ohne die Sequenz qualitativ oder quantitativ zu verändern, ist das Einbringen von Restriktionsschnittstellen keine Option.

Diese Probleme lassen sich durch eine sogenannte restriktionsfreie Klonierung (RF-Klonierung) umgehen (van den Ent und Löwe, 2006; Unger et al., 2010). Im Prinzip besteht die Methode aus zwei aufeinanderfolgenden Amplifikationen. Während der ersten PCR werden die beiden zu ligierenden



DNA-Sequenzen getrennt voneinander mit Primern amplifiziert, die an ihren 5'-Enden Überhänge tragen. Diese sind so design, dass die beiden resultierenden Fragmente an beiden Seiten zueinander komplementäre Enden aufweisen. Für die zweite PCR werden keine Primer eingesetzt, jedoch beide Produkte aus der ersten PCR. Das Insert hat die Funktion eines Megaprimers. Die komplementären Enden von Vektor und Insert hybridisieren und dienen so als Ansatzpunkt für die Polymerase. Diese synthetisiert durch Auffüllen einen doppelsträngigen Vektor mit integriertem Insert. Auf diese Weise lassen sich Fusionskonstrukte erstellen ohne die Notwendigkeit, eine Schnittstelle zwischen die beiden Bestandteile zu bringen und so die Sequenz zu verändern. Die Insertionsstelle ist durch das Primerdesign frei wählbar. Außerdem ist es möglich, während der Amplifikation des Vektors unerwünschte Bereiche zu deletieren. Die hier vorgestellte Methode ist eine Abwandlung der bei Chen et al. (2000), van den Ent und Löwe (2006) bzw. Unger et al. (2010) beschriebenen Methode. Abbildung 2.9 zeigt eine schematische Darstellung.



**Abbildung 2.9: Schematische Darstellung einer RF-Klonierung.**

Während der ersten PCR werden Vektor und Insert, durch den Einsatz geeigneter Primer, mit komplementären Enden versehen. Durch die zweite PCR werden die beiden Amplifikate fusioniert, ihre komplementären Enden hybridisieren und dienen so, anstelle von Primern, als Ansatzpunkt für die Polymerase. Diese synthetisiert einen doppelsträngigen Vektor mit integriertem Insert.

Wie bereits erwähnt, wurden in einer ersten Amplifikation die beiden zu fusionierenden Fragmente mit komplementären Enden synthetisiert. Bei diesem Schritt kam stets die Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase zum Einsatz, da sie über eine *Proofreading*-Funktion verfügt und im Gegensatz zur Taq-Polymerase keinen bei dieser Art der Klonierung störenden 3'-A-Überhang generiert. Die PCR wurde wie unter 2.6.1 beschrieben ausgeführt. Die Primer für die Amplifikation des Inserts wurden so designt, dass ihre 3'-Enden mit ihrer Zielsequenz hybridisieren konnten. Die 5'-Enden bildeten die zu den Vektorenden komplementären Bereiche. Der an die Zielsequenz bindende Teil hatte stets eine Länge von 18 – 26 bp, der Überhang 15 – 21 bp. Durch die Lage der Primer, die zur Amplifikation/Linearisierung des Vektors dienten, wurde die Insertionsstelle festgelegt und unerwünschte Bereiche deletiert. Um in die späteren Transformationsversuche möglichst wenig des

ursprünglichen Vektors zu verschleppen, wurde hier, abweichend von der Standard-PCR, nur 1 ng als *Template* eingesetzt. Beide Produkte wurden über ein Agarose-Gel aufgereinigt (siehe 2.8) und zusammen als *Template* für die folgende PCR verwendet. Es wurden insgesamt 300 ng DNA in einem molaren Verhältnis von 1:1 eingesetzt. Die Zugabe von Primern war nicht erforderlich. Der Ansatz wurde wie in Tabelle 2.10 beschrieben pipettiert. Das verwendete Cyclerprogramm ist Tabelle 2.4 zu entnehmen.

**Tabelle 2.10: PCR-Ansatz einer RF-Reaktion.**

<sup>1)</sup> Es wurden insgesamt 300 ng *Template*-DNA in einem molaren Verhältnis von 1:1 eingesetzt. <sup>2)</sup> Abhängig vom verwendeten Volumen an Vektor und Insert.

Komponenten	Volumen [ $\mu$ l]
5x Phusion® HF Puffer	10,0
dNTP-Mix [2,5 mM]	4,0
Vektor-Amplifikat aus PCR 1	<sup>1)</sup>
Insert-Amplifikat aus PCR 1 (Megaprimer)	<sup>1)</sup>
Phusion® DNA Polymerase [2 u/ $\mu$ l]	0,5
<i>sdd</i> H <sub>2</sub> O	<sup>2)</sup>
	$\Sigma$ 50,0 $\mu$ l

Ob die Verknüpfung der beiden Fragmente erfolgte, konnte durch eine PCR (siehe 2.6.1) mit geeigneten Primern überprüft werden. Für eine Transformation (siehe 2.3.1.3) wurden 20  $\mu$ l des RF-Reaktionsansatzes verwendet. Die Identifikation positiver Klone erfolgte durch eine Kolonie-PCR (siehe 2.6.2). Die entsprechenden Vektoren wurden isoliert und die korrekte Abfolge der Nukleotide durch Sequenzieren (siehe 2.10) überprüft.

Alternativ konnten durch diese Technik zwei Sequenzen auch ohne gleichzeitige Zirkularisierung miteinander verbunden werden. Dabei handelte es sich nicht um die Integration eines Inserts in einen Vektor, sondern um die Verknüpfung zweier Sequenzen zu einem Fusionskonstrukt, das zunächst subkloniert werden sollte, bevor es durch eine Standard-Klonierung in den Zielvektor integriert wurde. Auch hier lag der Vorteil darin, dass die Sequenz innerhalb des Konstruktes nicht durch das Einbringen einer Restriktionsschnittstelle verändert wurde. Zum Ausschneiden aus dem Subklonierungsvektor dienten die Schnittstellen der MCS, die außerhalb des Fusionskonstruktes lagen und somit keinen Einfluss auf dessen Sequenz hatten. Abweichend von der beschriebenen Methode wurden die Primer für die erste PCR so designt, dass die beiden resultierenden Fragmente nur an einem Ende komplementär zueinander waren. Nach der Fusionierung durch die zweite PCR wurde das lineare Konstrukt wie unter 2.9.2 bzw. 2.9.3 beschrieben subkloniert. Die Integration in den Zielvektor erfolgte dann wie unter 2.9.1 beschrieben.

## 2.10 Sequenzierung von Nukleinsäuren

Um die genaue Abfolge der Nukleotide eines DNA-Moleküls zu ermitteln, ist eine Sequenzierung erforderlich. Die heute etablierteste Methode ist sicher die Kettenabbruch-Synthese nach Sanger (Sanger et al., 1977) bzw. Weiterentwicklungen dieses Verfahrens. Aufgrund der hohen Kosten für die hierzu benötigten Geräte ist es oft wirtschaftlicher, Sequenzierungen bei externen Instituten in Auftrag zu geben.

Sämtliche Sequenzierungen wurden durch die Firmen GENterprise GENOMICS (Mainz, Germany) bzw. Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Germany) ausgeführt. Die Ansätze wurden nach Angaben der Firmen vorbereitet.

### 2.10.1 Primer-Walking

Primer-Walking ist vor allem beim Sequenzieren langer, unbekannter Bereiche eines DNA-Moleküls hilfreich. Man sequenziert mit einem Primer, der an einen bekannten Bereich unmittelbar vor der zu sequenzierenden Stelle bindet. Durch diesen ersten *read* wird ein Teil der unbekannt Sequenz entschlüsselt. In dieser Region wird ein Primer designt, der bei einer weiteren Sequenzierung eingesetzt wird. Dies lässt sich beliebig fortsetzen bis der gesamte zu sequenzierende Bereich aufgeklärt ist.

Die Durchführung der einzelnen Schritte entsprach der einer normalen Sequenzierung (siehe 2.10). Die verwendeten Primer wurden mit Hilfe des Programms Primer Premier 5 (PREMIER Biosoft International, Palo Alto, USA) designt.

### 2.10.2 Sequenzalignment *in silico*

Die Analyse der durch eine Sequenzierung ermittelten Nukleotid-Abfolge erfolgt in der Regel mittels spezieller Programme, die einen Vergleich zwischen zwei oder mehreren Sequenzen erlauben. So kann z.B. überprüft werden, ob ein kloniertes DNA-Molekül einer Referenzsequenz entspricht oder ob es während der Klonierung zu Veränderungen (Insertionen, Deletionen oder Substitutionen) der Nukleotid-Sequenz kam. Solche Programme sind unter anderem auch sehr hilfreich bei der Ausarbeitung von Klonierungsstrategien, da z.B. die Sequenz eines Fusionskonstrukts *in silico* erstellt und auf für eine Klonierung geeignete Schnittstellen überprüft werden kann.

Für sämtliche Sequenzalignments und Klonierungsstrategien wurde das Programm BioEdit (Tom Hall, Ibis Biosciences, Carlsbad, USA) verwendet.

### 2.11 Proteinextraktion aus *BY-2* Zellen

Zahlreiche Verfahren der Proteinanalyse setzen deren Isolation aus dem zu untersuchenden Organismus voraus. Bei Pflanzen geschieht dies meist auf mechanischem Weg.

Für die Extraktion von Proteinen aus *BY-2* Zellen wurden diese wie unter 2.5.1 beschrieben geerntet und aufgeschlossen. Abweichend hiervon wurden für jede Proteinextraktion 200 mg Zellmaterial verwendet.

Das resultierende Homogenat konnte mit einem vorgekühlten Spatel aus dem Mörser in ein Reaktionsgefäß mit 200 µl Denaturierungspuffer (verändert nach Laemmli, 1970; siehe Anhang) überführt und darin resuspendiert werden. Die im Puffer enthaltenen Bestandteile Natriumdodecylsulfat (SDS) und 2-Mercaptoethanol dienen der Denaturierung der Proteine, unterstützend wurden die Proben für 5 min bei 95°C in einem Wasserbad erhitzt. Zur Pelletierung des Debris folgte eine Zentrifugation bei RT und 13.000 g für 30 min (Biofuge A, Heraeus). Der proteinhaltige Überstand wurde anschließend in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Lagerung der Extrakte erfolgte bei 4°C.

### 2.12 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Eine verbreitete Methode zur Bestimmung des Proteingehaltes eines Extraktes ist der Bradford-Test (Bradford, 1976). Dabei wird ausgenutzt, dass sich das Absorptionsmaximum des Farbstoffes *Coomassie brilliant blue G-250* bei der Bindung an Proteine von  $\lambda = 465$  nm hin zu  $\lambda = 595$  nm verschiebt. Die Zunahme der Absorption bei 595 nm kann somit als Maß für die Proteinkonzentration einer Lösung herangezogen werden (Rehm, 2006).

Da sich das im Denaturierungspuffer enthaltene SDS negativ auf die Messungen auswirken kann (Rehm, 2006), wurden die Proben zunächst 1:1000 mit *sddH<sub>2</sub>O* unter die kritische Konzentration verdünnt. Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurden anschließend 800 µl eines verdünnten Extraktes mit 200 µl Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Germany) in Einmalküvetten (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Germany) überführt und durch mehrmaliges auf- und abpipettieren homogen gemischt. Nach einer Inkubationszeit von 5 min wurde die Absorption bei 595 nm in einem Spektralphotometer (Hitachi, U-1100) bestimmt. Für den Nullwertabgleich wurde reiner Denaturierungspuffer analog zu den Extrakten verdünnt und mit Bio-Rad Assay gemischt. Jede Messung wurde dreifach wiederholt und aus den Resultaten der Mittelwert gebildet. Die Ermittlung der Proteinkonzentration erfolgte mit Hilfe einer Eichgeraden, die aus den Extinktionswerten einer Rinderserumalbumin (BSA)-Verdünnungsreihe resultierte.

Die Konzentrationen wurden durch folgende Geradengleichung berechnet:

$$C_{Protein} = \frac{A_{595} * K}{m * V}$$

$C_{Protein}$  (Proteinkonzentration [ $\mu\text{g} * \mu\text{l}^{-1}$ ])

$A_{595}$  (Extinktion bei 595 nm)

$K$  (Verdünnungsfaktor)

$m$  (Steigung der Eichgeraden)

$V$  (Probenvolumen = 800  $\mu\text{l}$ )

### 2.13 Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Durch die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) ist es möglich, Proteine einer Lösung nach ihrem Molekulargewicht aufzutrennen (Rehm, 2006). In der vorliegenden Arbeit wurde eine Variante dieser Methode, die diskontinuierliche SDS-PAGE, angewandt. Dabei wird ein hochprozentiges Trenngel von einem kürzeren, niederprozentigen Sammelgel überschichtet (Laemmli, 1970). Dieses System dient einer besseren Trennschärfe der Proteinbanden. Je nach Größe der Proteine kann die Auftrennung durch die Konzentration an Acrylamid/Bisacrylamid im Trenngel optimiert werden.

Für die Herstellung der Polyacrylamidgele wurde das *Mini-Protean II Dual Slab Cell-System* (Bio-Rad, Richmond, USA) verwendet. Die Gießvorrichtung wurde nach Herstellerangaben zusammengesetzt. Die Lösungen für das Sammel- und Trenngel wurden hergestellt. Die beiden Komponenten Ammoniumpersulfat (APS) und Tetramethylethylendiamin (TEMED), die für die Polymerisation der Gele verantwortlich sind, wurden erst kurz vor dem Gießen der jeweiligen Lösung hinzupipettiert. Die Trenngellösung wurde bis zu einer Höhe von 5,0 cm in die Gelkammer gefüllt. Da Luftsauerstoff die Polymerisation hemmt, wurde die Gellösung mit Ethanol (20 Vol.-%) überschichtet. Nach Auspolymerisieren wurde das Ethanol abgegossen und die Kammer mit bidestilliertem Wasser ( $dd\text{H}_2\text{O}$ ) gespült. Nach Überschichten des Trenngels wurde in die noch flüssige Sammelgellösung ein Kamm zur Ausbildung der Probestaschen eingebracht. Für die Versuche der vorliegenden Arbeit wurden stets 4 Vol.-%ige Sammelgele und je nach Anforderung 10 Vol.-%ige bzw. 15 Vol.-%ige Trenngele verwendet. Die Zusammensetzungen sind Tabelle 2.11 zu entnehmen, die verwendeten Puffer und Lösungen sind im Anhang aufgeführt.

**Tabelle 2.11: Zusammensetzung der Polyacrylamidgele.**

APS und TEMED wurden erst kurz vor dem Gießen der jeweiligen Lösung hinzupipettiert.

	Trenngel [10 Vol.-% / 15 Vol.-%]	Sammelgel [4 Vol.-%]
<i>sdd</i> H <sub>2</sub> O	4,00 ml/2,33 ml	6,00 ml
Tris-HCl-Puffer (1,5 M)	2,50 ml	-
Tris-HCl-Puffer (0,5 M)	-	2,50 ml
Acrylamid/Bisacrylamid (30 Gew.-%)	3,33 ml/5,00 ml	1,33 ml
SDS (10 Gew.-%)	0,10 ml	0,10 ml
APS (10 Gew.-%)	60,0 µl	80,0 µl
TEMED	5,0 µl	10,0 µl

Jeweils zwei Gele wurden den Herstellerangaben entsprechend in einer dafür vorgesehenen Halterung arretiert und in eine Elektrophoresekammer *Mini-Protean Tube Cell* (Bio-Rad, Richmond, USA) eingesetzt. Die Kammer wurde mit Laufpuffer (siehe Anhang) befüllt und die Kämme der Gele entfernt.

Von jeder Probe wurden 15,0 µg Gesamtprotein mit einem adäquaten Volumen eines 5x Probenpuffers (siehe Anhang) in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß gemischt. Die in dem Probenpuffer enthaltenen Bestandteile SDS und 2-Mercaptoethanol dienen der Denaturierung der Proteine. Ein Erhitzen der Proben für 5 min bei 95°C, kurz vor dem Auftragen auf das Gel, unterstützte diesen Vorgang. Anschließend wurde das gesamte Volumen jeder Probe in je eine Tasche des Gels überführt. Neben den Proteinextrakten wurden stets 5,0 µl eines Protein-Größenmarkers, *Roti®-Mark Standard* (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Germany), auf das Gel aufgetragen.

Die für die Elektrophorese benötigte Spannung von 120 V lieferte ein *PowerPac 3000*-Netzteil (Bio-Rad, Richmond, USA). Der Fortschritt der Elektrophorese konnte anhand der Lauffront des im Probenpuffer enthaltenen Bromphenolblaus bestimmt werden. Das Migrationsverhalten des Farbstoffes während der Elektrophorese war mit dem eines 20 kDa Polypeptids vergleichbar. Nach Beendigung wurden Sammel- und Trenngel separiert. Das Sammelgel wurde verworfen und das Trenngel zur späteren Bestimmung der Orientierung an einer Ecke markiert.

## 2.14 Gesamtproteinfärbung im Polyacrylamidgel

Die in einer Elektrophorese aufgetrennten Proteine können im Polyacrylamidgel durch den Farbstoff *Coomassie Brilliant Blue G-250* irreversibel angefärbt werden. Dazu verwendet man eine Färbelösung, die neben dem Farbstoff auch Ethanol und Essigsäure enthält. Die beiden letztgenannten Bestandteile schwächen die Hydrathülle der Proteine, wodurch diese ausfallen und so im Gel fixiert werden.

Eines der beiden analog zueinander beladenen Gele wurde zur Überprüfung der SDS-PAGE in einer Coomassie Fixier-/Färbelösung (siehe Anhang) im Kühlschrank über Nacht inkubiert. Da sich die Färbung auf das gesamte Gel auswirkt, musste der proteinfreie Hintergrund, um die Banden deutlich erkennen zu können, entfärbt werden. Dies wurde durch mehrfaches Aufkochen in  $ddH_2O$  in einer Mikrowelle (MICRO-CHEF FM 3510, Moulinex, Radolfzell) erreicht. Das Wasser musste dabei mehrmals gewechselt werden.

### **2.15 Trocknen von Polyacrylamidgelen**

Um Polyacrylamidgele zu konservieren und sie einfacher dokumentieren zu können, besteht die Möglichkeit der Trocknung.

Um ein Gel zu trocknen, wurde es zusammen mit zwei Zellglasfolien (Folia Paper Bringmann, Wedelstein, Germany) für 30 min in einer Vortrocknerlösung (siehe Anhang) inkubiert. Anschließend wurde es auf einer Glasplatte zwischen die beiden Folien gelegt. Entstandene Luftblasen wurden herausgestrichen und die Folien mit dem eingeschlossenen Gel mittels Klebestreifen auf der Glasplatte fixiert. Die Trocknung erfolgte über mehrere Tage bei RT. So behandelte Gele konnten mit Hilfe eines Scanners digitalisiert werden.

### **2.16 Western-Blot**

Unter Western-Blot versteht man den elektrophoretischen Transfer von Proteinen aus einem Gel auf eine Membran, wobei die Anordnung der Proteine im Gel auf der Membran erhalten bleibt. Der Vorteil liegt darin, dass die Proteine auf einer Membran frei zugänglich sind. Dadurch werden weitere Analyseverfahren, wie Proteinfärbungen und immunochemische Proteinnachweise, effizienter bzw. überhaupt erst möglich. Zudem sind Membranen stabiler und handhabbarer als Gele (Rehm, 2006). Sämtliche Blots wurden im semidry-Verfahren nach Kyhse-Andersen (1984) durchgeführt. Dabei werden Gel und Membran in bestimmter Anordnung zwischen zwei Plattenelektroden gebracht. Bei angelegter Spannung wandern die negativ geladenen SDS-Proteinkomplexe aus dem Gel in Richtung der Anode, wobei sie auf der dazwischen liegenden Membran gebunden werden.

Für den Western-Blot wurden vier Stücke Filterpapier (Schleicher & Schuell Cle-Blotting-Papier, Dassel, Germany) zugeschnitten, zwei auf die Größe des Trenngels (8,5 cm \* 5,0 cm) und zwei etwas größere (10,0 cm \* 6,0 cm). Eine Polyvinylidendifluorid (PVDF)-Membran (Immobilin P, Millipore, Eschborn, Germany) wurde ebenfalls der Größe des Trenngels angepasst. Da die PVDF-Membran hydrophob ist, lässt sie sich nicht mit wässrigen Lösungen benetzen. Deshalb musste sie zunächst



1 min in Methanol quellen, bevor sie zusammen mit dem Gel und den Filterpapieren für 30 min in einem Transferpuffer (siehe Anhang) äquilibriert wurde. Zur Vorbereitung der Blotkammer (Trans-Blot SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell, BioRad, Richmond, USA) wurden die beiden größeren Filterpapiere zentral auf der Anode platziert, darauf die Membran, die dem Gel entsprechend markiert wurde (siehe 2.13), gefolgt von dem Gel, das abschließend mit den beiden kleineren Filterpapieren bedeckt wurde. Um ein homogenes, elektrisches Feld gewährleisten zu können, mussten sämtliche Schichten luftblasenfrei aufgelegt werden. Nach Schließen der Kammer wurde eine konstante Spannung von 12 V angelegt. Der Transfer wurde nach 25 min beendet.

### **2.17 Ponceau-Rot-Färbung**

Mit Ponceau-Rot lassen sich Proteine auf einer Blot-Membran reversibel anfärben. So kann man z.B. den Blot-Erfolg überprüfen oder die Position der Marker-Banden kennzeichnen (Rehm, 2006).

Die PVDF-Membran wurde nach dem Western-Blot für 1 min in einer Ponceau-Rot-Färbelösung (siehe Anhang) inkubiert. Durch das Waschen in TBST-Puffer (siehe Anhang) wurde der proteinfreie Hintergrund entfärbt bis die Banden deutlich zu sehen waren. Durch einen 5 minütigen und einen 10 minütigen Waschschrift in TBST-Puffer konnte der Farbstoff anschließend wieder vollständig entfernt werden.

### **2.18 Immunochemischer Proteinnachweis**

Proteine können mit Hilfe von Antikörpern spezifisch detektiert werden. Beim Nachweis eines Proteins auf einer Blot-Membran wird diese mit einem primären Antikörper inkubiert, der an das gesuchte Protein bindet. Um unspezifisch gebundene Antikörper zu entfernen, wird die Membran gewaschen. Anschließend wird sie mit einem zweiten markierten Antikörper inkubiert. Dieser sekundäre Antikörper bindet an den primären Antikörper und kann, nach erneutem Waschen, auf der Membran lokalisiert werden. Der in der vorliegenden Arbeit verwendete sekundäre Antikörper war Horseradish-Peroxidase (HRP) markiert. Die HRP katalysiert die Oxidation von Luminol, wobei Lichtquanten freigesetzt werden, die mit Hilfe eines Autoradiographie-Filmes oder eines digitalen Kamerasystems detektiert werden können. Diese äußerst sensitive Methode nennt man *enhanced chemiluminescence* (ECL), sie ist für den Nachweis geringer Proteinmengen geeignet.

Zur Vorbereitung der Immunfärbung mussten zunächst sämtliche freien Proteinbindungsstellen der Blot-Membran blockiert werden. Deshalb wurde sie nach dem Blotten über Nacht bei 4°C in TBST-Milchpulver-Puffer (siehe Anhang) inkubiert und am nächsten Tag zweimal 1 min, einmal 15 min und

einmal 5 min in TBST-Puffer gewaschen. Im Anschluss wurde die Membran für eine Stunde bei RT unter konstantem Schütteln mit dem primären Antikörper, der mit TBST-Milchpulver-Puffer auf eine geeignete Konzentration verdünnt wurde, inkubiert. Das eingesetzte Volumen der verwendeten Antikörperlösung betrug 0,1 ml/cm<sup>2</sup> Membran. Um ein Verdunsten der Lösung zu verhindern, wurde das Inkubationsgefäß mit einer Glasplatte abgedeckt. Nach Beendigung der Inkubationszeit wurde die Membran erneut unter den bereits angegebenen Bedingungen gewaschen. Die Inkubation mit dem sekundären Antikörper erfolgte entsprechend den Angaben für den primären Antikörper. Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Antikörper, sowie Spezifikationen wie Verdünnungsfaktor oder Organismus, aus dem der Antikörper gewonnen wurde, sind Tabelle 2.12 zu entnehmen.

**Tabelle 2.12: Verwendete Antikörper**

Antikörper	Primär/Sekundär	Gegen	Wirt	Verdünnungsfaktor	Entwickler/Hersteller
Anti-GFP	Primär	GFP	Maus	1:1000	Roche Diagnostics GmbH (Mannheim)
Mouse IgG, HRP-linked whole Antibody	Sekundär	Maus	Schaf	1:2500	GE Healthcare Life Sciences (Freiburg)

Um eine ECL-Reaktion detektieren zu können, wurde die PVDF-Membran, nach der Inkubation mit den Antikörpern, in eine Klarsichtfolientasche überführt. Das Detektionsreagenz wurde stets erst kurz vor Gebrauch gemischt. Die Zusammensetzung ist Tabelle 2.13 zu entnehmen.

**Tabelle 2.13: Zusammensetzung der ECL-Lösung**

Komponenten	Volumen
Tris pH 8,5 (100 mM)	5,0 ml
p-Cumarsäure (90 mM)	11,0 µl
Luminol (250 mM)	25,0 µl
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (10 Vol.-%)	5,0 µl

Das Detektionsreagenz wurde zur PVDF-Membran in die Klarsichtfolientasche pipettiert und nach einer Inkubationszeit von einer Minute wieder abgegossen. Die Membran wurde luftblasenfrei in die Tasche eingeschweißt und in einer Filmkassette (Cronex Lightning Plus, DuPont) mit Klebestreifen fixiert. Dabei musste sie mit der proteintragenden Seite nach oben orientiert werden. Alle folgenden Schritte der Dokumentation fanden in einer Dunkelkammer statt. Ein Autoradiographie-Film (Cronex 5, Agfa) wurde auf die Größe der PVDF-Membran zugeschnitten. Zur Belichtung wurde der Film, bündig mit der Membran, auf der Klarsichtfolientasche platziert und die Filmkassette verschlossen. Von jedem Blot wurden Filmreihen mit Belichtungszeiten von 2, 4, 8, 16 und 32 min aufgenommen.

Der belichtete Film wurde nacheinander für 5 min in eine Entwicklerlösung, zur Unterbrechung für einige Sekunden in Wasser, und abschließend für 1 min in ein Fixierbad überführt. Nach Spülen mit Wasser konnte der entwickelte Film getrocknet und anschließend mit Hilfe eines Scanners dokumentiert werden.

Alternativ war eine Detektion der ECL-Reaktion auf der Blot-Membran mit einem digitalen System möglich. Die Dokumentation erfolgte mit Hilfe der Kamera Deep Sky Imager II (Meade Instruments Corp., Irvine, USA). Diese war mit einem Desktop-Computer verbunden und wurde durch die Software AutoStar Envisage (Meade Instruments Corp., Irvine, USA) gesteuert.

### **2.19 Amidoschwarz-Färbung**

Um die Bindungseffizienz der Proteine auf einer Blot-Membran zu überprüfen, können diese mit Hilfe des Farbstoffs Amidoschwarz unspezifisch angefärbt werden. Die Färbung ist irreversibel und ein späterer immunochemischer Proteinnachweis nicht mehr möglich. Die auf der PVDF-Membran angefärbten Proteine können jedoch mit Hilfe eines Scanners digital dokumentiert werden.

Nach dem immunochemischen Proteinnachweis wurde die PVDF-Membran kurz in eine Amidoschwarz-Färbelösung (siehe Anhang) eingetaucht. Anschließend wurde der proteinfreie Hintergrund mit  $ddH_2O$  entfärbt. Nach dem Trocknen der Membran konnte das Ergebnis mit einem Scanner dokumentiert werden.

### **2.20 Epifluoreszenzmikroskopie**

Für fluoreszenzmikroskopische Routineuntersuchungen wurden die in der Arbeitsgruppe vorhandenen Axioplan Mikroskope (Carl Zeiss, Jena, Germany) verwendet. Je nach Anforderungen kamen die Filtersätze 09 (z.B. GFP) bzw. 15 (z.B. RFP) zum Einsatz (beide Carl Zeiss Microscopy GmbH, Göttingen, Germany). Das Anregungslicht wurde durch eine Quecksilberdampf-Kurzbogenlampe (HBO 50W L1, Osram GmbH, München, Germany) erzeugt. Die Dokumentation erfolgte über ein computergestütztes Kamerasystem (DSI III Color, Meade Instruments Corp., Irvine, USA) unter Verwendung der Software AutoStar Envisage (Meade Instruments Corp., Irvine, USA). Die Belichtungszeit bei fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen betrug in der Regel 0,25 s – 1,0 s.

Für genauere Analysen wurde das Mikroskop AF6000 LX (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany) in Verbindung mit der Kamera DFC360 FX (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany) und der Software LAS AF (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany) verwendet. Alternativ dazu

kam das Mikroskop IX71 (Olympus Deutschland GmbH, Hamburg, Germany) in Verbindung mit dem System Delta Vision® Core (Applied Precision Inc., Issaquah, WA, USA) und der Software softWoRx® (Applied Precision Inc., Issaquah, WA, USA) zum Einsatz. Beide Mikroskopsysteme waren für die Dekonvolutionsmikroskopie, als Äquivalent zur Konvokalen Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM), eingerichtet und wurden von der AG Wolfrum bzw. der AG Kirkpatrick zur Verfügung gestellt.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Etablierung einer Methode zur *A. tumefaciens* vermittelten stabilen Transfektion von *BY-2* Zellen

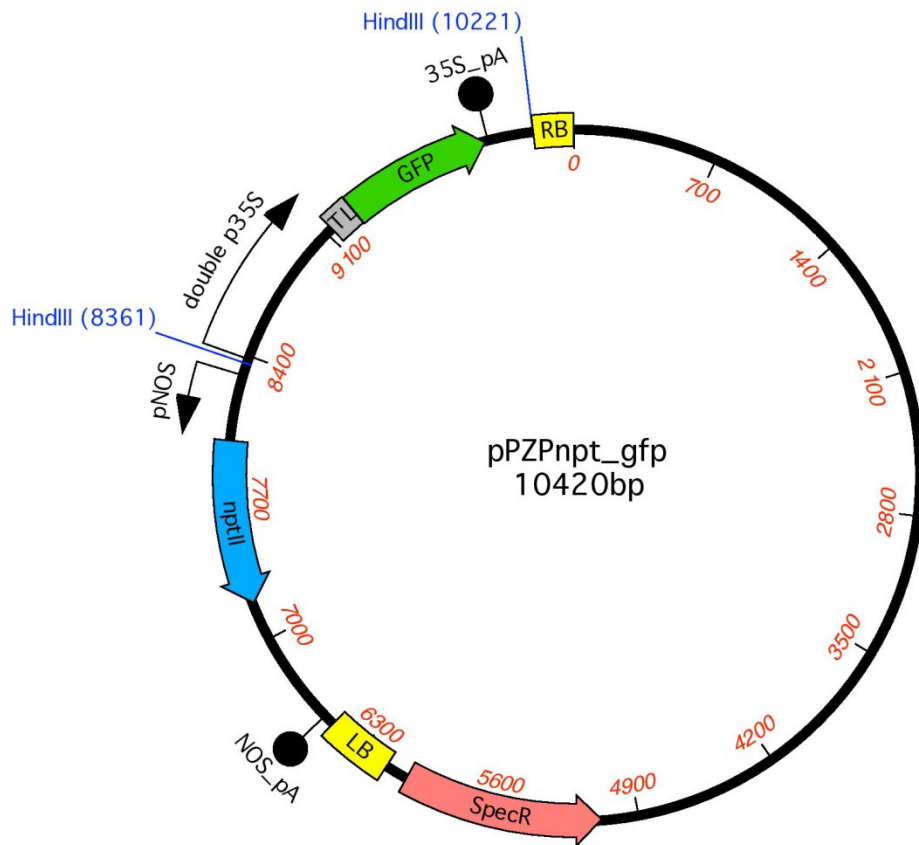
Vornehmliches Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung eines Systems zur fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung von Proteinen des mikrotubulären Cytoskeletts in lebenden Zellen. Das Mittel der Wahl war die Fusion der codierenden Sequenzen von Genen der Tubulin-Familie mit denen von Fluoreszenzproteinen und die Expression dieser Fusionskonstrukte in der Modell-Zellkultur *BY-2*. Dazu war zunächst die Etablierung einer Methode zum Transfer selbiger erforderlich. Als Grundlage hierfür diente die Arbeit von An (1985), die zur Optimierung der vorgestellten Versuche angepasst und modifiziert wurde.

##### 3.1.1 Klonierung von Vektoren zur GFP-Überexpression in Pflanzenzellen

Um die Methode nach An (1985) an die bevorstehenden Versuche anpassen zu können, war ein Kontrollsystem zur Überprüfung erfolgter Transfektionen erforderlich. Zu diesem Zweck sollte die CDS für das GFP, zunächst unter Kontrolle des konstitutiven doppelten 35S-Promotors, in den binären Vektor pPZPnpt integriert werden. Das GFP wurde als Marker gewählt, da es relativ einfach zu detektieren, unabhängig von Substrat bzw. Cofaktoren, und meist ungiftig für den Wirtsorganismus ist (Zimmer, 2002). Das resultierende Konstrukt sollte in den *A. tumefaciens* Stamm *LBA4404* transferiert und mit diesem im Anschluss die Versuche zur Optimierung der Transfektionsmethode durchgeführt werden. *LBA4404* wurde aufgrund seiner Effizienz bei der Transfektion von *BY-2* Zellen gewählt (Geelen und Inzé, 2001). Eine Klonierungsstrategie mit entsprechenden Primern wurde entwickelt. Die Versuche zur Klonierung des Vektors und dessen Transfer in *LBA4404* fanden im Rahmen einer von mir betreuten Diplomarbeit (Staufenbiel, 2009) statt.

Die beiden Vektoren pPZPnpt und pCATgfp lagen zu Beginn der Arbeit in *E. coli* Bakterien des Stammes *DH5 $\alpha$*  vor. Beide Stämme wurden auf geeigneten LB-Selektionsplatten ausgestrichen und ÜN kultiviert. Zur Sicherheit wurden von jedem Stamm zwei der gewachsenen Kolonien separat in LB-Flüssigmedium mit entsprechenden Antibiotika überführt. Jeweils eine der ÜN-Kulturen wurde zur Plasmidisolierung eingesetzt. Nach Bestimmung der DNA-Konzentration der Isolate folgte ein Verdau mit dem Enzym FastDigest HindIII. Der Vektor pPZPnpt verfügt über eine HindIII-Erkennungssequenz in der MCS, pCATgfp wird 24bp *upstream* des 35S-Promotors und 15bp *downstream* des

35S-Terminators geschnitten. Die Restriktionsansätze wurden über ein Agarosegel aufgetrennt und die Zielfragmente daraus isoliert. Die beiden Fragmente wurden zur Ligation eingesetzt und im Anschluss in *E. coli* Bakterien des Stammes *DH5α* transferiert. Der Transformationsansatz wurde zur Selektion auf LB-Festmedium (100 mg/l Spectinomycin) ausplattiert und ÜN inkubiert. 20 Kolonien wurden ausgewählt und in LB-Flüssigmedium (100 mg/l Spectinomycin) überführt. Die resultierenden ÜN-Kulturen wurden zur Überprüfung, ob die GFP-Sequenz in pPZPnpt integriert wurde, als Template für eine Kolonie-PCR eingesetzt. Anschließend wurden die PCR-Ansätze gelelektrophoretisch aufgetrennt (Ergebnisse nicht gezeigt). Zwei Flüssigkulturen, deren Amplifikate Banden im erwarteten Größenbereich zeigten, wurden ausgewählt. Die Plasmide wurden isoliert und nach weiteren Analysen mittels PCR bzw. Sequenzierung relevanter Bereiche (Ergebnisse nicht gezeigt), auf *A. tumefaciens* *LBA4404* transferiert. Die Transformationsansätze wurden zur Selektion auf YEB-Festmedium (200 mg/l Streptomycin; 200 mg/l Spectinomycin; 50 mg/l Rifampicin) ausplattiert und für 3 d inkubiert. Zur Sicherheit wurden jeweils 2 Kolonien in YEB-Flüssigmedium (200 mg/l Streptomycin; 200 mg/l Spectinomycin; 15 mg/l Rifampicin) überführt. Die Aufnahme des rekombinanten Plasmids wurde durch eine Kolonie-PCR überprüft. Eine entsprechende Flüssigkultur wurde ausgewählt und als Dauerkultur bei -72°C gelagert. Diese wird im Weiteren als *LBA4404+pPZPnpt\_gfp* und das entsprechende Plasmid als *pPZPnpt\_gfp* bezeichnet. Eine schematische Darstellung des Plasmids ist Abbildung 3.1 zu entnehmen. Sämtliche Versuche zur Optimierung der Transfektionsmethode wurden mit der vorgestellten *A. tumefaciens* Kultur durchgeführt.

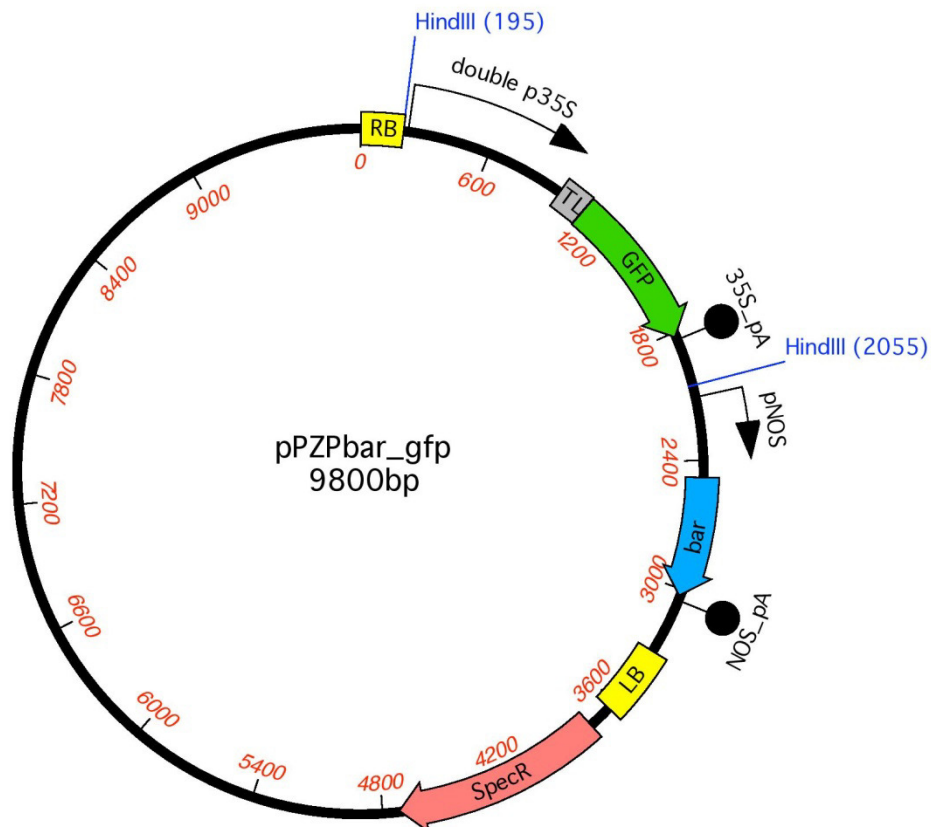


**Abbildung 3.1: Schematische Darstellung des Vektors pZPNpt\_gfp.**

Dargestellt ist der Vektor pZPNpt mit der integrierten GFP-CDS unter Kontrolle des doppelten 35S-Promotors. Außerdem ist zwischen den Bordersequenzen (RB und LB), zur Selektion transfizierter Pflanzenzellen, das Neomycin-Phosphotransferase-II-Gen (*nptII*) lokalisiert. Darüber hinaus verfügt der Vektor, zur Selektion in Prokaryoten, über ein Spectinomycin-Resistenzgen (*SpecR*).

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war die Co-Lokalisation von Proteinen des Cytoskeletts durch die Markierung mit unterschiedlichen Fluoreszenzproteinen. Die dafür benötigten Fusionskonstrukte sollten in aufeinanderfolgenden Transfektionen auf *BY-2* Zellen übertragen werden. Um doppeltransfizierte Zellen selektieren zu können wurde, neben dem *nptII-Gen*, ein zweites Resistenzgen benötigt, das während der zweiten Transfektion mit dem Fusionskonstrukt co-transferiert werden sollte. Hierfür wurde das *bar-Gen* gewählt, das Resistenz gegen PPT vermittelt. Auf dem Vektor pZPbar ist das entsprechende Gen zwischen den Bordersequenzen lokalisiert. Für spätere Versuche zur Selektion transfizierter *BY-2* Zellen über das *bar-Gen* sollte zunächst, wie bei pZPNpt, nur die CDS für das GFP unter Kontrolle des konstitutiven doppelten 35S-Promotors in pZPbar integriert werden.

Die Integration des GFP-Gens in den Vektor pPZPbar erfolgte analog zum Vorgehen bei seiner Integration in den Vektor pPZPnpt. Dies war möglich, da pPZPbar ebenfalls über eine HindIII-Erkennungssequenz in der MCS verfügt. Eine schematische Darstellung des Plasmids pPZPbar\_gfp ist Abbildung 3.2 zu entnehmen.



**Abbildung 3.2: Schematische Darstellung des Vektors pPZPbar\_gfp.**

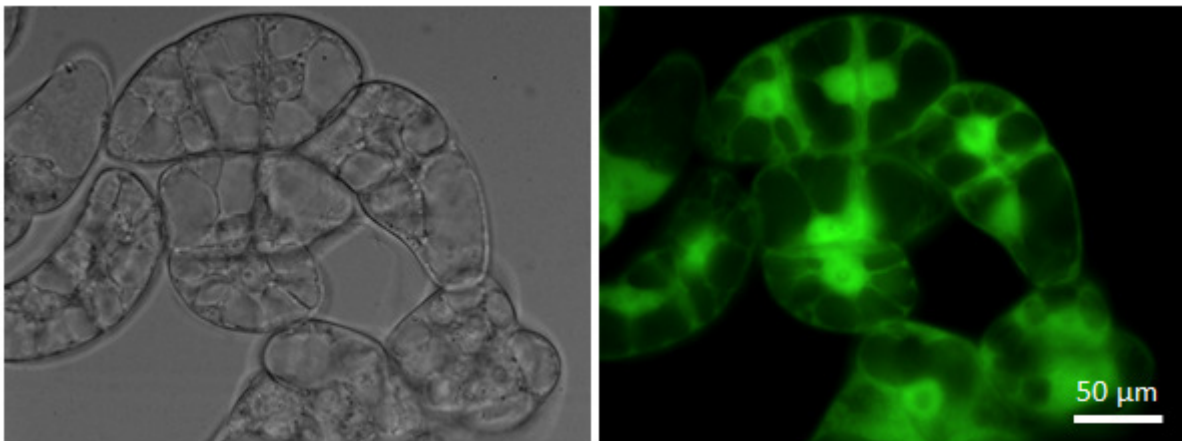
Dargestellt ist der Vektor pPZPbar mit der integrierten GFP-CDS unter Kontrolle des doppelten 35S-Promotors. Außerdem ist zwischen den Bordersequenzen (RB und LB), zur Selektion transfizierter Pflanzenzellen, das Bialaphos-Resistenzgen (*bar*) lokalisiert. Darüber hinaus verfügt der Vektor, zur Selektion in Prokaryoten, über ein Spectinomycin-Resistenzgen (*SpecR*).

Nach der Klonierung wurde der Vektor pPZPbar\_gfp aus *E. coli DH5α* isoliert und die korrekte Integration des GFP-Gens, in den Vektor pPZPbar, mittels PCR überprüft (Ergebnisse nicht gezeigt). Anschließend wurde er in *A. tumefaciens LBA4404* transferiert. Die resultierende Kultur wird im Weiteren als *LBA4404+pPZPbar\_gfp* bezeichnet.



### 3.1.2 Optimierung der Transfektion

Um höhere Transfektionsraten zu erreichen, sollte die Methode nach An (1985) modifiziert werden. Diese wurde bereits in der Vergangenheit an zahlreiche Fragestellungen angepasst (Rempel und Nelson, 1995; Yoshioka et al., 1996; Abdel-Banat et al., 2008). Auch in der Arbeitsgruppe wurden Versuche zur Verbesserung der Transfektionsbedingungen durchgeführt (Scheel, 2008; Staufenbiel, 2009). Die dabei gewonnenen Erkenntnisse und die anderer Arbeitsgruppen dienten als Grundlage für die Versuche zur Steigerung der Transfektionsrate. Die Auswirkung der veränderten Parameter auf die Transfektion wurde fluoreszenzmikroskopisch bestimmt, dabei diente die GFP-Fluoreszenz als Marker. Ein Beispiel hierfür ist Abbildung 3.3 zu entnehmen. Der Anteil an fluoreszierenden Zellen nach Co-Kultivierung diente als Maß für die Bestimmung der Transfektionsraten.



**Abbildung 3.3:** GFP-Fluoreszenz einer mittels *LBA4404+pPZPnpt\_gfp* transfizierten *BY-2* Zelllinie.

Links: Hellfeld-Aufnahme. Rechts: GFP-Fluoreszenz bei Anregung mit Blaulicht.

Das Protokoll nach An (1985) sieht vor, 4 ml einer *BY-2* Zellsuspension, 3 d nach Subkultivieren, in eine 100 mm Petrischale mit 100 µl einer frischen ÜN-Kultur von *A. tumefaciens* zu überführen und bei 28°C zu inkubieren. Nach 48 h Co-Kultivierung sollen die Zellen gewaschen und auf Selektionsplatten ausgestrichen werden.

Um die Effizienz der Methode zur *A. tumefaciens* vermittelten Transfektion von *BY-2* Zellen zu steigern, wurden die nachfolgenden Versuche, im Rahmen einer von mir betreuten Diplomarbeit (Eichler, 2009), durchgeführt.

### 3.1.2.1 Kultivierung von *A. tumefaciens*

Um die *A. tumefaciens* Stämme verfügbar zu halten, wurden sie bei Scheel (2008) und Staufenbiel (2009) im monatlichen Turnus auf frischem Festmedium subkultiviert, für 3 d bei 28°C inkubiert und anschließend bei 8°C gelagert. Zur Transfektion wurden hier einzelne Kolonien von diesen Platten in Flüssigmedium überführt und ÜN bei 28°C inkubiert. Zum Zeitpunkt der Transfektion waren die Bakterienstämme also bereits mehrfach auf Festmedium subkultiviert und die verwendeten Kolonien bis zu 4 Wochen auf Festmedium bei 8°C gelagert. Andere Arbeitsgruppen beschreiben das frische Animpfen der Übernachtkultur aus einer Dauerkultur (Sullivan, 1994) bzw. nach dreitägiger Anzucht auf Festmedium (Matsuoka, 2003).

Es sollte überprüft werden, ob die einer Transfektion vorausgehende Kultivierung der *A. tumefaciens* einen Einfluss auf den Transfektionserfolg hat. Deshalb wurden die Transfektionsraten von Co-Kulturen verglichen, bei denen die eingesetzten *A. tumefaciens* zuvor unterschiedlich kultiviert wurden. Für einen Ansatz wurden die Bakterien aus einer Dauerkultur auf Festmedium ausgestrichen und für 3 d bei 28°C inkubiert. Für einen zweiten Ansatz wurden die Bakterien auf die gleiche Weise behandelt und im Anschluss für 13 d bei 8°C gelagert. Für einen dritten Ansatz wurden sie, wie für den ersten beschrieben, kultiviert und anschließend für 7 d bei 8°C gelagert, gefolgt von einer Subkultivierung auf frischem Festmedium, das wiederum 3 d bei 28°C inkubiert wurde. Mit Kolonien von jeder der drei resultierenden Platten wurden ÜN-Kulturen angeimpft. Diese wurden anschließend mit BY-2 Zellsuspensionskulturen für 96 h co-kultiviert. Die fluoreszenzmikroskopische Auswertung der Co-Kulturen zeigte, dass die Lagerung der *A. tumefaciens* bei 8°C eine um 50% geringere Transfektionsrate nach sich zog. Die Subkultivierung hatte sogar eine um etwa 70% verringerte Transfektionsrate zur Folge.

### 3.1.2.2 *A. tumefaciens*-Konzentration bei der Co-Kultivierung

Im Protokoll nach An (1985) werden für die Co-Kultivierung 100 µl einer frischen ÜN-Kultur von *A. tumefaciens* verwendet, wobei eine Bestimmung der Konzentration nicht vorgesehen ist. Dagegen beschreibt Matsuoka (2003) die Konzentration von *A. tumefaciens* bei der Co-Kultivierung als wichtigen Faktor.

Um zu überprüfen, ob die Bakterienkonzentration einen Einfluss auf die Transfektionsrate hat, wurden unterschiedliche Volumina einer ÜN-Kultur von *A. tumefaciens* (0,125 ml; 0,25 ml; 0,5 ml; 1,0 ml; 2,0 ml; 4 ml) mit BY-2 Zellsuspensionskulturen für 96 h co-kultiviert. Bei der fluoreszenzmikroskopischen Auswertung war kein tendenzieller Unterschied der Transfektionsrate in den verschiedenen Ansätzen zu erkennen.

### 3.1.2.3 Zustand und Volumen der eingesetzten *BY-2* Zellkultur

Der Zustand der *BY-2* Zellkultur zum Zeitpunkt der Co-Kultivierung wird in vielen Veröffentlichungen als wichtiger Faktor angesehen. An (1985) beschreibt die höchste Transfektionsrate bei *BY-2* Zellen 3 - 4 d nach Überimpfen. Abweichend davon reichen die Angaben in anderen Veröffentlichungen vom Einsatz frisch überimpfter (Abdel-Banat et al., 2008) bis zur Verwendung 4 - 5 d alten *BY-2* Zellsuspensionskulturen (Rempel und Nelson, 1995). Staufenbiel (2009) verwendete für die Co-Kultivierung sowohl frisch als auch 3 d zuvor überimpfte *BY-2* Zellen.

Um zu überprüfen, ob der Zeitpunkt der Subkultivierung einen Einfluss auf die Transfektionsrate hat, wurden wie bei Staufenbiel (2009) sowohl frisch als auch 3 d zuvor überimpfte *BY-2* Zellsuspensionskulturen zur Transfektion eingesetzt. Nach 72-stündiger Co-Kultivierung erfolgte der fluoreszenzmikroskopische Vergleich der verschiedenen Ansätze, dabei konnte kein deutlicher Unterschied in der Transfektionsrate bestimmt werden.

Unter natürlichen Bedingungen können *A. tumefaciens* Pflanzen nur in verwundeten Bereichen infizieren. Am verletzten Gewebe werden unterschiedliche chemische Verbindungen wie Zucker und Phenole freigesetzt, die *Agrobacterium* chemotaktisch anlocken bzw. die *Vir*-Gene aktivieren (Winans, 1992; Ashby et al., 1988; Joubert et al., 2002; Campbell et al., 2000). Mechanischer Stress kann zu kleineren Läsionen an den Zellen führen, wodurch es zur Freisetzung dieser für die Transfektion essenziellen Verbindungen kommen kann. Sullivan (1994) schlägt diesbezüglich 20-faches Pipettieren mit einer 10 ml Pipette vor. Die dabei auf die Zellen wirkenden Scherkräfte sollen entsprechende Verletzungen zur Folge haben.

Um zu überprüfen, ob mechanisches Stressen der *BY-2* Zellen einen Einfluss auf die Transfektionsrate hat, wurden sie zunächst, wie bei Sullivan (1994) beschrieben, 20-fach pipettiert. Durch eine lichtmikroskopische Begutachtung war eine starke Schädigung der Zellen festzustellen, weshalb in der Folge die Pipettiervorgänge auf 10 reduziert wurden. Auf diese Weise behandelte sowie unpipettierte *BY-2* Zellsuspensionskulturen wurden mit *A. tumefaciens* für 96 h co-kultiviert. Durch die fluoreszenzmikroskopische Auswertung konnte etwa eine Verdopplung der Transfektionsrate bei den pipettierten *BY-2* Zellen festgestellt werden.

Eine der Co-Kultivierung vorausgehende Ultraschallbehandlung der *BY-2* Zellsuspensionskultur führte ebenfalls zu einer Steigerung der Transfektionsrate. Aus praktischen Gründen wurde die Pipettiermethode jedoch bevorzugt.

In verschiedenen Veröffentlichungen wird empfohlen, 4 ml einer *BY-2* Zellsuspension in einer 100 mm Petrischale für die Co-Kultivierung zu verwenden und diese während der Inkubation

bewegungsfrei zu lagern (An, 1985; David und Perrot-Rechenmann, 2001; Abdel-Banat et al., 2008). Dagegen konnte in der Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass durch Ansetzen der Co-Kultur in 100 ml Erlenmeyerkolben und Schütteln während der Inkubation gute Transfektionsergebnisse zu erzielen waren. Dabei verwendete Scheel (2008) 5 ml und Staufenbiel (2009) 25 ml einer *BY-2* Zellsuspension.

Um zu überprüfen, ob das eingesetzte Volumen der *BY-2* Zellsuspensionskultur einen Einfluss auf die Transfektionsrate hat, wurden parallel 25 ml bzw. 5 ml einer *BY-2* Zellsuspensionskultur mit *A. tumefaciens* für 96 h unter Schütteln co-kultiviert. Es wurde darauf geachtet, dass die Endkonzentrationen der eingesetzten *A. tumefaciens*-Kultur und des Acetosyringons in den beiden Co-Kulturen gleich waren. Bei der fluoreszenzmikroskopischen Auswertung konnte eine sehr starke Steigerung der Transfektionsrate (etwa 27-fach) bei der Co-Kultivierung mit 5 ml *BY-2* Zellsuspensionskultur beobachtet werden.

#### **3.1.2.4 Transfektionsdauer**

Auch bezüglich der Dauer der Co-Kultivierung variieren unterschiedliche Protokolle. Die Angaben reichen von 24 h (Abdel-Banat et al., 2008) über 48 h (An, 1985; David und Perrot-Rechenmann, 2001) bis 72 h (Rempel und Nelson, 1995; Granger und Cyr, 2000; Staufenbiel, 2009). Die Verlängerung der Co-Kultivierung sollte eine höhere Anzahl an Transfektionsereignissen zur Folge haben. Wird dabei allerdings eine zu lange Inkubationszeit gewählt, besteht die Gefahr eines Überwachens der *BY-2* Zellen durch *A. tumefaciens*, was sich wiederum negativ auf den Transfektionserfolg auswirken würde.

Um zu überprüfen, ob die Dauer der Co-Kultivierung einen Einfluss auf die Transfektionsrate hat, wurde diese in zehn parallel angesetzten Co-Kulturen nach 48, 72, 96 und 128 h bestimmt. Nach 48 h waren in einem, nach 72 h in drei der zehn Ansätze transfizierte *BY-2* Zellen nachweisbar. An den folgenden Tagen steigerte sich die Transfektionsrate kontinuierlich. Eine Inkubation von 96 h wurde als effizient erachtet, da hier hohe Transfektionsraten, ohne erkennbaren negativen Einfluss durch eine zu hohe *A. tumefaciens* Konzentration, erzielt werden konnten.

#### **3.1.2.5 Modifizierte Transfektionsmethode**

Unter Berücksichtigung der vorgestellten Ergebnisse wurde folgendes Protokoll für die stabile Transfektion von *BY-2* Zellsuspensionen angewandt.

Eine Dauerkultur von *A. tumefaciens* wurde auf YEB-Festmedium mit adäquaten Antibiotika ausgestrichen und für 3 d bei 28°C inkubiert. Eine Einzelkolonie wurde in 10 ml entsprechendes Flüssigmedium überführt und ÜN bei 28°C kultiviert. Am Folgetag wurden die *A. tumefaciens* durch Zentrifugieren (1800 g; RT; 6 min) pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und die Bakterien in 3 ml LS-Flüssigmedium durch Resuspendieren gewaschen. Es folgte ein erneutes pelletieren unter den beschriebenen Bedingungen sowie eine Resuspension in 5 ml LS-Flüssigmedium. 5 ml einer 3 d vor der Transfektion subkultivierten *BY-2* Zellsuspensionskultur wurden in einen 100 ml Erlenmeyerkolben überführt und 10fach auf und ab pipettiert. Es wurden 50 µl einer 10 mM Acetosyringon-Lösung hinzu pipettiert. Die so vorbereitete *BY-2* Zellsuspension wurde mit 200 µl der *A. tumefaciens*-Resuspension im Dunkeln auf einem Rotationsschüttler bei 100 rpm und 24°C für 4 d co-kultiviert.

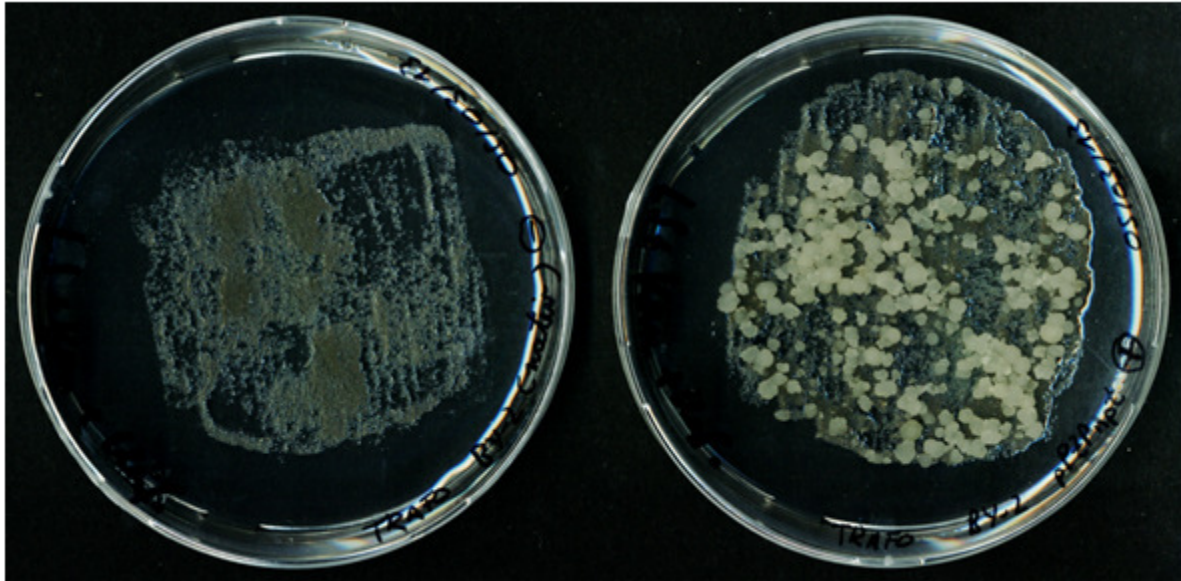
### 3.1.3 Selektion transfizierter *BY-2* Zellen

Auch bei der Selektion transfizierter Pflanzenzellen macht man sich Resistenzgene zu Nutze, die mit dem *Gene of Interest* (GOI) co-transferiert werden. In der vorliegenden Arbeit dienten hierzu das Neomycin-Phosphotransferase-Gen (*nptII*) sowie das Bialaphos-Resistenz-Gen (*bar*), die Resistenz gegenüber Kanamycin (Kan) bzw. Phosphinothricin (PPT) vermitteln. Verschiedene Selektionsmethoden wurden getestet (siehe auch Eichler, 2009), dabei stellte sich die Selektion auf Festmedium als am geeignetsten heraus. Die dazu verwendeten Antibiotikakonzentrationen in den Nährmedien wurden experimentell ermittelt. Für Kan wurde ein Wert von 12,5 mg/l, für PPT ein Wert von 3,0 mg/l bestimmt. Für die Versuche mit dem *nptII*-Gen wurde *A. tumefaciens* LBA4404+pPZPnpt\_gfp (siehe 3.1.1) eingesetzt. Für die Selektionsversuche über das *bar*-Gen wurde *A. tumefaciens* LBA4404+pPZPbar\_gfp (siehe 3.1.1) verwendet. Die Selektion über das *nptII*-Gen wurde als effizienter erachtet, da hierbei in der Regel mehr Kalli generierten, von denen ein höherer Anteil den gesuchten Phenotyp zeigte. Deshalb wurden in der Folge alle Konstrukte, die zunächst für singuläre Transfektionen dienen sollten, in den Vektor pPZPnpt integriert.

Um ein Überwachsen der *BY-2* Zellen durch *A. tumefaciens* zu verhindern, mussten die Bakterien nach der Co-Kultivierung aus den Ansätzen eliminiert werden. Cefotaxim ist ein  $\beta$ -Lactam-Antibiotikum mit Wirksamkeit gegen gramnegative Bakterien wie *A. tumefaciens*. Die Toxizität gegenüber Eukaryoten ist dagegen gering. Aus diesem Grund wird es häufig bei Transfektionsversuchen zur Eliminierung von *Agrobacterium* aus Zellkulturen verwendet (Mathias und Boyd, 1986). Yu et al. (2001) beschreiben eine deutliche Wirkungssteigerung durch Waschen der Co-Kultur vor Hinzugabe des Antibiotikums. Die Methode basiert auf differenzieller Sedimentation,

dabei lagern sich die *BY-2* Zellen schneller am Gefäßboden ab, und ein Großteil der *A. tumefaciens* kann mit dem Überstand abpipettiert werden. Das verworfene Medium wird durch frisches ersetzt und der Vorgang wiederholt, dadurch kommt es schrittweise zur Verringerung der Bakteriendichte in der Co-Kultur. Die verwendete Konzentration an Cefotaxim in den Nährmedien wurde experimentell ermittelt. Es ergab sich ein Wert von 450 mg/l. Die Steigerung der Effektivität durch das Waschen der Co-Kultur vor Zugabe des Antibiotikums konnte bestätigt werden. Folgendes Protokoll wurde zur Selektion transfizierter *BY-2* Zellen angewandt.

Das gesamte Volumen einer Co-Kultur wurde in ein steriles 15 ml Corex-Röhrchen überführt und mit gleichem Volumen frischen LS-Mediums verdünnt. Nach kurzem Schwenken wurde das Röhrchen einige Minuten aufrecht und bewegungsfrei gelagert. Nach Sedimentieren der Zellen wurde der Überstand abgenommen und durch frisches Medium ersetzt. Dieser Vorgang wurde 5mal wiederholt. 50 µl der Co-Kultur wurden 1:1 mit LS-Flüssigmedium verdünnt und auf LS-Festmedium mit adäquaten Antibiotika ausgestrichen. Die Kultivierung fand bei 24°C im Dunkeln statt. Nach 2 - 3 Wochen waren kleine Ansätze von Kalli beobachtbar, etwa 3 Wochen später waren sie auf eine zur Resuspension geeignete Größe angewachsen. Abbildung 3.4 zeigt exemplarisch Kalli auf LS-Festmedium, die aus einem Versuch, nach der beschriebenen Methode zur Selektion transfizierter *BY-2* Zellen, resultierten. Links im Bild wurde auf dem Selektionsmedium (12,5 mg/l Kanamycin und 450 mg/l Cefotaxim) eine Co-Kultur ausgestrichen, bei der der *A. tumefaciens* Stamm *LBA4404* (ohne binären Vektor) eingesetzt wurde. Dieser Ansatz diente als Negativkontrolle. Rechts wurde auf dem gleichen Medium eine Co-Kultur ausgestrichen, bei der der *A. tumefaciens* Stamm *LBA4404+pPZPnpt* eingesetzt wurde. Hier konnte selektiv Kalluswachstum beobachtet werden.



**Abbildung 3.4: Selektion transfizierter *BY-2* Zellen auf LS-Festmedium.**

Links: Zur Co-Kultivierung wurde der *A. tumefaciens* Stamm *LBA4404* (ohne binären Vektor) eingesetzt. Rechts: Zur Co-Kultivierung wurde der *A. tumefaciens* Stamm *LBA4404+pPZPnpt* eingesetzt. Die *BY-2* Zellen beider Co-Kulturen wurden mittels der beschriebenen Methode selektiert. Die Selektion erfolgte auf LS-Festmedium (12,5 mg/l Kanamycin und 450 mg/l Cefotaxim) über einen Zeitraum von 5 Wochen.

Zur weiteren Kultivierung und Resuspension in LS-Flüssigmedium wurde ein Kallus geteilt. Eine Hälfte wurde erneut auf LS-Festmedium, mit den entsprechenden Antibiotika, überimpft. Die Zugabe von Cefotaxim wurde noch während der beiden folgenden Überimpfzyklen beibehalten. Die andere Hälfte wurde in einer 6 cm Petrischale, in 3 ml LS-Flüssigmedium mit den entsprechenden Antibiotika, resuspendiert. Die Petrischale wurde mit Nescofilm verschlossen und im Dunkeln bei 24°C für 7 - 14 d bis zur gewünschten Zelldichte inkubiert. In der Folge konnte die Kultur, wie unter 2.2 beschrieben, überimpft werden. Auch hier wurde noch während der beiden folgenden Überimpfzyklen Cefotaxim eingesetzt.

### 3.2 Klonierung der Fusionskonstrukte und die Etablierung der transgenen *BY-2* Zelllinien

Zur Visualisierung des mikrotubulären Cytoskeletts in lebenden *BY-2* Zellen sollten die codierenden Sequenzen des  $\alpha$ - bzw.  $\gamma$ -Tubulins zunächst mit der des GFP fusioniert und in ein binäres Vektorsystem integriert werden. Zudem musste, um die Proteine in späteren Co-Lokalisationsstudien unterscheiden zu können, bei einem der beiden Fusionskonstrukte die GFP-Sequenz durch die eines anderen FP ersetzt werden. Durch eine *A. tumefaciens* vermittelte stabile Transfektion sollte die Expression der chimären Proteine in *BY-2* Zellen ermöglicht werden.

### 3.2.1 Überexpression von GFP-markiertem $\gamma$ -Tubulin in BY-2 Zellen

Die Position des FP-Tags innerhalb eines Fusionskonstruktes kann einen starken Einfluss auf die Funktion des Produktes bzw. die ganze Zelle, in der es exprimiert wird, haben. Um zu überprüfen, ob dies auch für die Expression eines chimären Proteins aus  $\gamma$ -Tubulin und GFP in lebenden BY-2 Zellen zutrifft, wurden zwei unterschiedliche Konstrukte hergestellt. In einen wurde die GFP-CDS an das 5'-im anderen an das 3'-Ende der  $\gamma$ -Tubulin-CDS angefügt. In beiden Fällen erfolgte die Fusion durch RF-Klonierung der CDS des  $\gamma$ -Tubulins in den Vektor pCATgfp. Als Linker wurde die Sequenz für die *TEV protease recognition site* zwischen die beiden Fusionspartner gebracht. Als regulatorische Sequenz diente der, in pCATgfp bereits vorhandene, 35S-Promotor. Nach dem Ausschneiden aus pCATgfp wurden die Konstrukte in pPZPnpt integriert. Die Versuche zur Klonierung der entsprechenden Vektoren und deren Transfer in *A. tumefaciens LBA4404* fanden im Rahmen von mir betreuter Diplomarbeiten statt (Taubmann, 2010; Klockner, 2011).

Zur Amplifikation der  $\gamma$ -Tubulin-cDNA wurde zunächst die RNA aus einer BY-2 Zellsuspensionskultur isoliert. Nach einer RT-PCR, bei der das RNA-Isolat als Template diente, wurde die  $\gamma$ -Tubulin-cDNA mit den Primern GT\_cDNA\_fw\_7 und GT\_cDNA\_rev\_1710, die im Bereich der 5'-UTR bzw. 3'-UTR an die cDNA binden, amplifiziert. Um eine ständige Verfügbarkeit der Sequenz zu gewährleisten, wurde das Amplifikat in den Subklonierungsvektor pJET1.2 eingebracht und auf *E. coli DH5 $\alpha$*  transferiert. Zur Überprüfung der korrekten Nukleotidsequenz wurde die  $\gamma$ -Tubulin-CDS in pJET1.2 sequenziert (Ergebnisse nicht gezeigt). Der Vektor wird nachfolgend als pJET1.2\_ $\gamma$ -Tub bezeichnet. Sämtliche zur Klonierung eingesetzten  $\gamma$ -Tubulin-cDNA-Amplifikate gehen auf diesen Vektor zurück.

Die Herstellung der Fusionskonstrukte erfolgte mittels RF-Klonierung. Hierfür wurde durch eine PCR ein lineares Amplifikat des Vektors pCATgfp generiert. Die Primer wurden dabei so gewählt, dass sich eine, für die Herstellung des entsprechenden Konstruktes, geeignete Insertionsstelle ergab. Um den GFP-Tag an das 3'-Ende der  $\gamma$ -Tubulin-CDS anfügen zu können, wurden die Primer GFP\_fw+TEV und pCATgfp\_rev\_912 eingesetzt. Der Forward-Primer GFP\_fw+TEV bindet mit seinem 3'-Ende an die ersten 20 Nukleotide der GFP-CDS. Sein 5'-Ende entspricht der Sequenz für die *TEV protease recognition site* und sollte als Überlappungsbereich für die spätere RF-Klonierung dienen. Der Reverse-Primer pCATgfp\_rev\_912 bindet an den Bereich des Vektors, der unmittelbar vor dem Startcodon der GFP-CDS liegt und schließt dieses mit ein. Die  $\gamma$ -Tubulin-CDS wurde unter Verwendung der Primer 35S+gTub\_fw und Fu-PC-rev+TEV amplifiziert. Der Forward-Primer 35S+gTub\_fw bindet mit seinem 3'-Ende an die ersten 22 Nukleotide der  $\gamma$ -Tubulin-CDS. Sein 5'-Ende ist komplementär zum 3'-Ende des linearisierten pCATgfp Vektors und sollte als Überlappungsbereich für die spätere RF-Klonierung dienen. Der Reverse-Primer Fu-PC-rev+TEV bindet an das 3'-Ende der  $\gamma$ -Tubulin-CDS. Sein 5'-Ende wurde so designt, dass im resultierenden



Amplifikat die *TEV protease recognition site* an die  $\gamma$ -Tubulin-CDS angefügt und das  $\gamma$ -Tubulin-Stopcodon, durch ihre ersten drei Nukleotide, überschrieben wird. So sollte auch der für die RF-Klonierung wichtige Überlappungsbereich, mit dem 5'-Ende des linearisierten pCATgfp Vektors, entstehen.

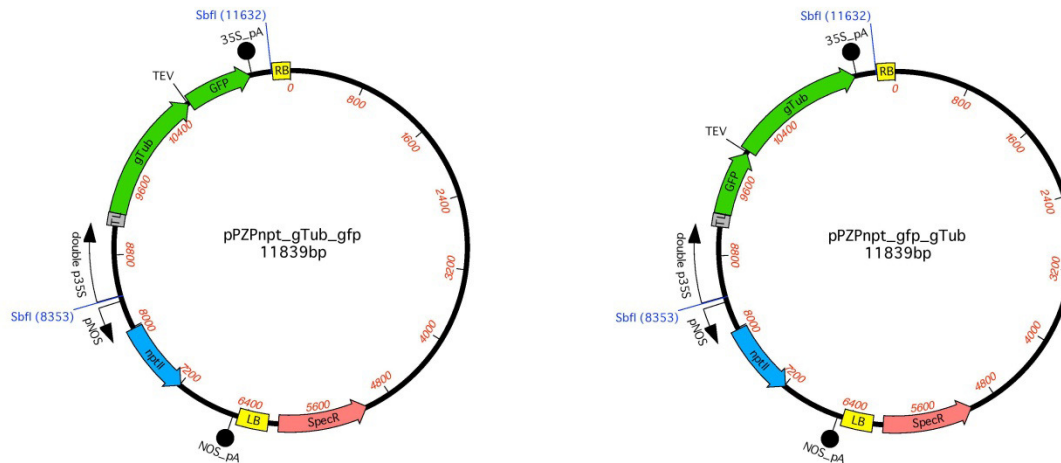
Nach Fusion der beiden Amplifikate wurde das Konstrukt in *E. coli DH5 $\alpha$*  transferiert. Die korrekte Integration der  $\gamma$ -Tubulin-CDS in den Vektor pCATgfp wurde in mehreren PCR-Ansätzen, unter Verwendung geeigneter Primer, überprüft (Ergebnisse nicht gezeigt). Der Vektor wird im Folgenden als pCAT $\gamma$ -Tub\_gfp bezeichnet.

Um den GFP-Tag an das 5'-Ende der  $\gamma$ -Tubulin-CDS anfügen zu können, wurde durch eine PCR, mit Hilfe der Primer pCATgfp\_Lin\_fw und CAT\_Lin\_rev+TEV, ein lineares Amplifikat des Vektors pCATgfp generiert. Der Forward-Primer pCATgfp\_Lin\_fw bindet an die 18 Nukleotide *downstream* des GFP-Stopcodons. Der Reverse-Primer CAT\_Lin\_rev+TEV bindet mit seinem 3'-Ende an die 21 Nukleotide *upstream* des GFP-Stopcodons. Sein 5'-Ende wurde so designt, dass im resultierenden Amplifikat die *TEV protease recognition site* an die GFP-CDS angefügt und das Stopcodon deletiert wird. Die Amplifikation der  $\gamma$ -Tubulin-CDS erfolgte unter Verwendung der Primer gTub\_ATG+TEV und gTub\_Stop+UEH. Der Forward-Primer gTub\_ATG+TEV bindet mit seinem 3'-Ende an die ersten 21 Nukleotide der  $\gamma$ -Tubulin-CDS. Sein 5'-Ende fügt im resultierenden Amplifikat die *TEV protease recognition site* unmittelbar vor dem Startcodon des  $\gamma$ -Tubulins an. Die Sequenz in diesem Bereich entspricht also der des 3'-Endes des linearisierten pCATgfp Vektors und sollte später als Überlappungsbereich für die RF-Klonierung dienen. Der Reverse-Primer gTub\_Stop+UEH bindet mit seinem 3'-Ende an die letzten 21 Nukleotide der  $\gamma$ -Tubulin-CDS. Sein 5'-Ende fügt dem Amplifikat einen Überhang an, dessen Sequenz der des 5'-Endes des linearisierten pCATgfp Vektors entspricht.

Nach Fusion der beiden Amplifikate wurde das Konstrukt in *E. coli DH5 $\alpha$*  transferiert. Die korrekte Integration der  $\gamma$ -Tubulin-CDS in den Vektor pCATgfp wurde durch mehrere PCR-Ansätze überprüft (Ergebnisse nicht gezeigt). Der Vektor wird im Folgenden als pCATgfp\_ $\gamma$ -Tub bezeichnet.

Der binäre Vektor pPZPnpt verfügt in der MCS, zwischen den Bordersequenzen, über eine Erkennungssequenz für die Restriktionsendonuklease SbfI. Diese befindet sich ebenfalls auf den Vektoren pCAT $\gamma$ -Tub\_gfp und pCATgfp\_ $\gamma$ -Tub, jeweils 13 bp *upstream* des doppelten 35S-Promotors und 3 bp *downstream* des 35S-Terminators. Durch einen Verdau mit FastDigest SbfI wurde pPZPnpt linearisiert und die beiden Konstrukte aus den Vektoren pCAT $\gamma$ -Tub\_gfp und pCATgfp\_ $\gamma$ -Tub ausgeschnitten. Durch eine Ligation wurden beide Konstrukte in den Vektor pPZPnpt integriert. Nach dem Transfer in *E. coli DH5 $\alpha$*  wurde die korrekte Integration in den Vektor durch mehrere PCR-Ansätze mit geeigneten Primern analysiert. Zusätzlich wurden relevante Bereiche der Vektoren

sequenziert (Ergebnisse nicht gezeigt). Die Vektoren werden im Folgenden als pPZNpt\_γ-Tub\_gfp bzw. pPZNpt\_gfp\_γ-Tub bezeichnet, eine schematische Darstellung ist Abbildung 3.5 zu entnehmen.



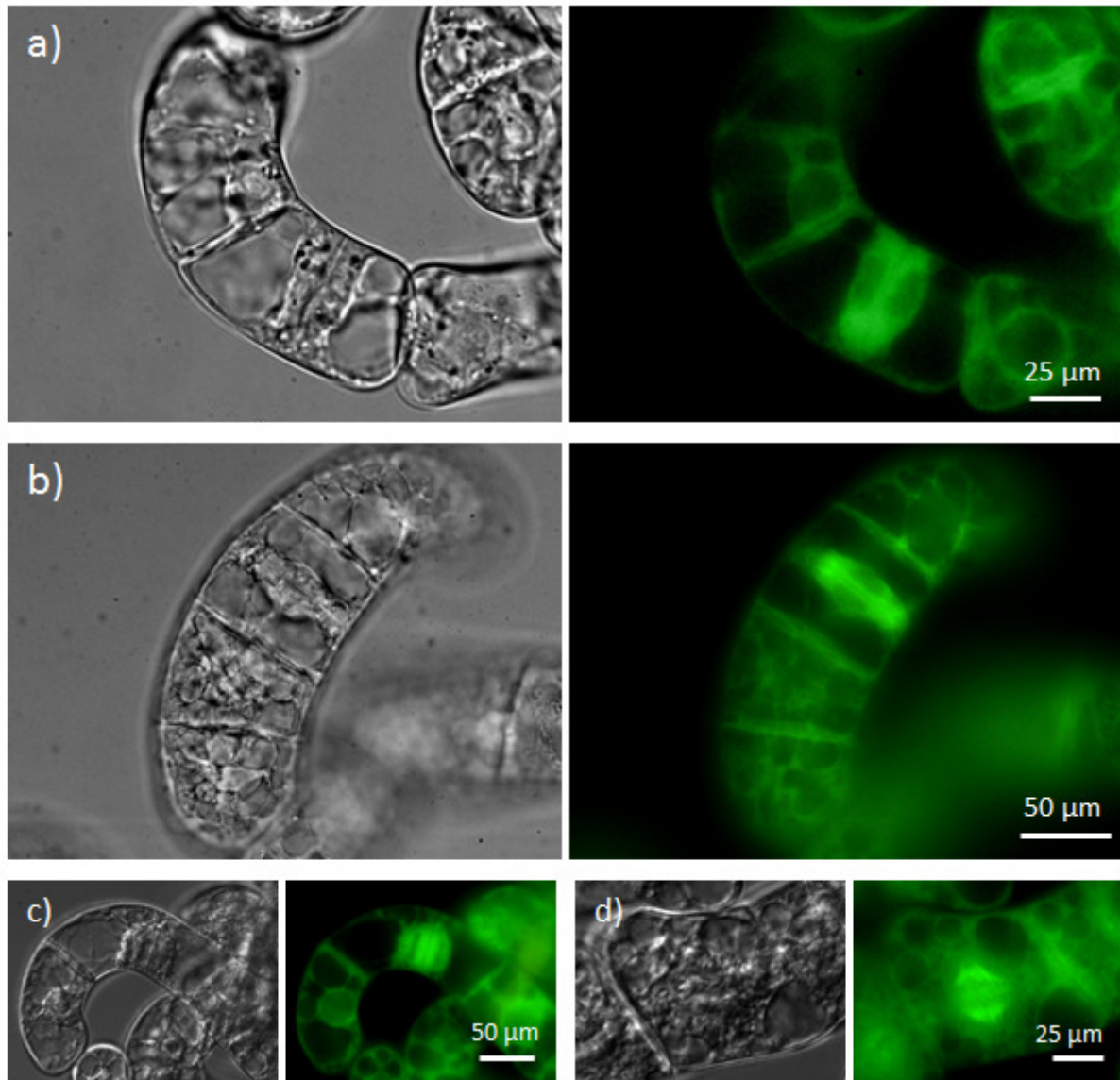
**Abbildung 3.5: Schematische Darstellung der Vektoren pPZNpt\_γ-Tub\_gfp und pPZNpt\_gfp\_γ-Tub.**

Dargestellt ist jeweils der Vektor pPZNpt mit der integrierten γ-Tubulin-CDS, die am 3'- respektive 5'-Ende um einen GFP-Tag erweitert wurde. Beide Konstrukte stehen unter Kontrolle des doppelten 35S-Promotors. Außerdem ist zwischen den Bordersequenzen (RB und LB), zur Selektion transfizierter Pflanzenzellen, das Neomycin-Phosphotransferase-II-Gen (nptII) lokalisiert. Darüber hinaus verfügen die Vektoren, zur Selektion in Prokaryoten, über ein Spectinomycin-Resistenzgen (SpecR).

Beide Vektoren wurden in *A. tumefaciens* LBA4404 transferiert. Die entsprechenden Bakterienstämme werden im Folgenden als LBA4404+pPZNpt\_γ-Tub\_gfp bzw. LBA4404+pPZNpt\_gfp\_γ-Tub bezeichnet.

Mittels der beschriebenen Methode zur *A. tumefaciens* vermittelten stabilen Transfektion wurden beide Konstrukte auf BY-2 Zellen übertragen. Die gewachsenen Kalli wurden mikroskopisch auf eine dem GFP zuzuordnende Fluoreszenz untersucht. Deutlich leuchtende Kalli wurden ausgewählt und für eine dauerhafte Erhaltung einzeln auf frisches LS-Festmedium mit adäquaten Antibiotika überführt. Für eine detaillierte fluoreszenzmikroskopische Analyse der transfizierten Zelllinien mussten diese zunächst noch in LS-Flüssigmedium resuspendiert werden. Um eine dauerhafte Verfügbarkeit zu gewährleisten, wurden die Resuspensionskulturen im wöchentlichen Turnus überimpft. Die entsprechenden Kulturen werden im Weiteren als BY-2 pPZNpt\_γ-Tub\_gfp bzw. BY-2 pPZNpt\_gfp\_γ-Tub bezeichnet.

Bei der fluoreszenzmikroskopischen Begutachtung konnte in beiden Zelllinien eine starke, dem GFP zuzuordnende Fluoreszenz nachgewiesen werden. Strukturen wie der Phragmoplast oder die mitotische Spindel, an deren Aufbau Mikrotubuli beteiligt sind (Goddard et al. 1994), waren deutlich gefärbt. Die Abbildung 3.6 zeigt entsprechende Beispiele. Diese Beobachtungen decken sich mit Ergebnissen, die durch Immunfluoreszenzfärbungen, unter Verwendung eines gegen  $\gamma$ -Tubulin gerichteten Antikörpers, an fixierten und somit toten Zellen generiert wurden (Liu et al., 1993; Joshi und Palevitz, 1996). Da in beiden Zelllinien definierte Strukturen fluoreszenzmikroskopisch identifiziert werden konnten, aber das Wachstumsverhalten als auch die Intensität der Fluoreszenz bei *BY-2* pPZPnpt\_ $\gamma$ -Tub\_gfp homogener war, wurde diese in den weiteren Versuchen eingesetzt. Zur Veranschaulichung wurden in Abbildung 3.6a und 3.6b Aufnahmen von Phragmoplasten der entsprechenden Zelllinien vergleichend gegenübergestellt. Teilabbildung 3.6c zeigt eine weitere Aufnahme eines Phragmoplasten der Zelllinie *BY-2* pPZPnpt\_ $\gamma$ -Tub\_gfp. Der Bereich, in dem die neue Zellplatte aufgebaut wird, ist als deutlicher Spalt zu erkennen. In Abbildung 3.6d ist das mikroskopische Bild einer mitotischen Spindel derselben Zelllinie gezeigt. Die im Vergleich zu einer tierischen Spindel für Pflanzen typische breitere Form (Goddard et al. 1994) ist deutlich zu erkennen. Aufgrund einer starken Hintergrundfluoreszenz war die Auflösung feinerer Strukturen zu diesem Zeitpunkt nicht möglich.



**Abbildung 3.6:** Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der Zelllinien *BY-2 pPZPnpt\_γ-Tub\_gfp* und *BY-2 pPZPnpt\_gfp\_γ-Tub*.

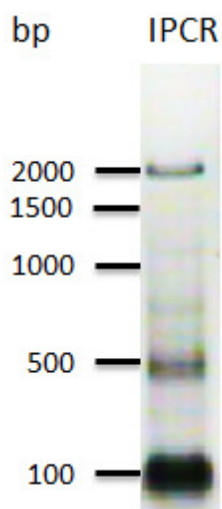
Teilabbildungen a) und b) dienen dem Vergleich der beiden Zelllinien; c) und d) zeigen weitere Detailaufnahmen von Teilungsstadien der Zelllinie *BY-2 pPZPnpt\_γ-Tub\_gfp*. Links: Hellfeld-Aufnahmen [bei c) und d) in differentiellm Interferenzkontrast (DIC)]. Rechts: GFP-Fluoreszenz bei Anregung mit Blaulicht. **a)** Phragmoplast einer Zelle der Linie *BY-2 pPZPnpt\_gfp\_γ-Tub*. **b)** Phragmoplast einer Zelle der Linie *BY-2 pPZPnpt\_γ-Tub\_gfp*. **c)** Phragmoplast und **d)** mitotische Spindel in Zellen der Linie *BY-2 pPZPnpt\_γ-Tub\_gfp*.

### 3.2.2 Sequenzierung des endogenen $\gamma$ -Tubulin-Promotors aus *BY-2*

Die konstitutive Überexpression eines FP-markierten Proteins durch den viralen 35S-Promotor kann dazu führen, dass sich überschüssige Fusionsprodukte unspezifisch im Cytoplasma verteilen. Dabei besteht die Gefahr, dass die tatsächlichen Lokalisationsmuster des Zielproteins überdeckt werden (Wadenpohl und Bramkamp, 2010). Deshalb wurde die Sequenzierung des  $\gamma$ -Tubulin-Promotors aus *N. tabacum BY-2* angestrebt. Die Verwendung des endogenen Promotors könnte im Vergleich zum

35S-Promotor eine schwächere Expressionsrate zur Folge haben und so zu einer verbesserten Signalaufklärung führen. Außerdem wäre in späteren Untersuchungen nicht nur die räumliche Verteilung des Proteins, sondern auch ein entwicklungsabhängiges, zeitliches Expressionsmuster darstellbar.

Die IPCR ist eine geeignete Methode zur Aufklärung von unbekanntem Bereichen einer DNA, die in unmittelbarer Nachbarschaft zu einer bekannten Sequenz liegen (Ochman et al., 1988). Deshalb wurde sie zur Bestimmung der unbekannt Promotorsequenz des  $\gamma$ -Tubulin-Gens aus *N. tabacum* BY-2 angewandt. Dazu musste zunächst die genomische DNA einer BY-2 Zellsuspensionskultur isoliert werden. Anhand des bereits bekannten 5'-Bereichs der genomischen  $\gamma$ -Tubulin-Sequenz (Wolf, 2008) wurde XhoI als geeignete Schnittstelle für die Restriktion der DNA identifiziert. Sie ist 1706 bp *downstream* des Anfangs der 5'-UTR lokalisiert. Bei der darauf folgenden Ligation zur Zirkularisierung der Restriktionsfragmente wurden 50 ng der verdauten DNA eingesetzt. Zur Steigerung der Effizienz wurde die Dauer der Ligation auf 150 min verlängert. Beim ersten Durchlauf, der im Anschluss durchgeführten *nested*-PCR, diente die zirkularisierte DNA als Template und Nt\_fw\_1336 sowie Nt\_rev\_461 als Primer. Es wurde eine Zyklenzahl von 37 und eine Elongationszeit von 5 min gewählt. Das resultierende Amplifikat diente im zweiten Teil der *nested*-PCR als Template. Als Primer wurden gTub\_fw\_265 und BY2\_g\_tub\_fw1\_inv eingesetzt. Auch hier wurden 37 Zyklen und eine Elongationszeit von 5 min gewählt. Das Amplifikat wurde gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die Abbildung 3.7 zeigt die Dokumentation des resultierenden Gels.



**Abbildung 3.7: Gelelektrophoretische Auftrennung der Amplifikate aus der IPCR.**

Gezeigt ist das Resultat aus dem zweiten Teil der *nested*-PCR. Das Bild wurde invertiert und in Helligkeit und Kontrast angepasst.

Es waren fünf Banden von unterschiedlicher Schärfe und Intensität zu erkennen, wobei die unterste ( $\leq 100$  bp) wahrscheinlich auf Primer-Dimere zurückzuführen war, die typischer Weise in diesem Größenbereich auftreten. Von den anderen vier Banden lag die deutlichste im Bereich von etwa 2000 bp. Diese wurde aus dem Gel isoliert. Das aufgereinigte Fragment wurde mit den gleichen Primern sequenziert, die auch für die Amplifikation im zweiten Teil der *nested*-PCR verwendet wurden. Durch ein Alignment mit den bereits bekannten Bereichen der genomischen  $\gamma$ -Tubulin-Sequenz (Wolf, 2008) konnte gezeigt werden, dass das sequenzierte Amplifikat *upstream* der 5'-UTR lag und an seinem 3'-Ende mit dieser Region überlappte. Deshalb wurde es vollständig, durch Primer-Walking, sequenziert. Die resultierende Sequenz ist dem Anhang (7.2.1) zu entnehmen.

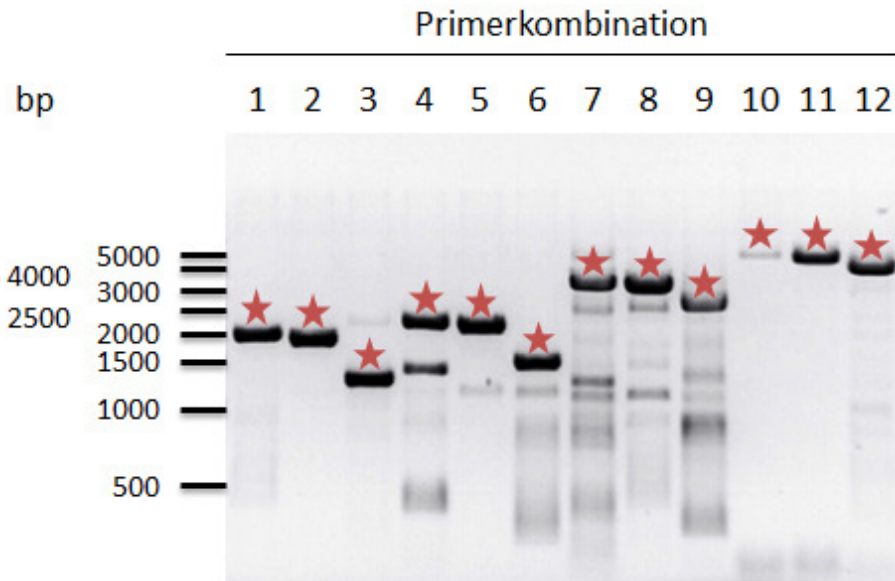
Nach der vollständigen Sequenzierung des Amplifikates wurde seine Lage im Genom, relativ zum codierenden Bereich des  $\gamma$ -Tubulin-Gens, mittels PCR weiter verifiziert. Dazu wurden drei Primer, die innerhalb der Sequenz des putativen  $\gamma$ -Tubulin-Promotors binden, mit vier Primern, die innerhalb des codierenden Bereichs der  $\gamma$ -Tubulin-Sequenz binden, permutierend eingesetzt. Die Primer sowie die verwendeten Kombinationen und die zu erwartenden Amplifikatgrößen sind Tabelle 3.1 zu entnehmen. Als Template diente die genomische DNA einer *BY-2* Zellsuspensionskultur.

**Tabelle 3.1: Verwendete Primer zur Verifizierung der Lage des putativen  $\gamma$ -Tubulin-Promotors im Genom.**

Aufgeführt sind die bei der PCR verwendeten Primerkombinationen sowie die jeweils zu erwartenden Amplifikatgrößen.

Primerkombination	Forward Primer (binden im Bereich des putativen $\gamma$ -Tubulin-Promotors)	Reverse Primer (binden im codierenden Bereich der $\gamma$ -Tubulin-Sequenz)	Zu erwartende Größe des Amplifikates
1	Promo_fw_57	GT_1898_rev	1898 bp
2	Promo_fw_106	GT_1898_rev	1793 bp
3	Prom_fw_I	GT_1898_rev	1222 bp
4	Promo_fw_57	GT_2140_rev	2084 bp
5	Promo_fw_106	GT_2140_rev	1979 bp
6	Prom_fw_I	GT_2140_rev	1408 bp
7	Promo_fw_57	265_inv	3362 bp
8	Promo_fw_106	265_inv	3257 bp
9	Prom_fw_I	265_inv	2686 bp
10	Promo_fw_57	Anti_Intron 4	4749 bp
11	Promo_fw_106	Anti_Intron 4	4644 bp
12	Prom_fw_I	Anti_Intron 4	4073 bp

Die resultierenden Amplifikate wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt. Abbildung 3.8 zeigt die Dokumentation des entsprechenden Gels.



**Abbildung 3.8: Gelelektrophoretische Auftrennung der Amplifikate aus der PCR zur Verifizierung der Lage des putativen  $\gamma$ -Tubulin-Promotors, relativ zum codierenden Bereich des  $\gamma$ -Tubulin-Gens.**

Als Template diente die genomische DNA einer *BY-2* Zellsuspensionskultur. Die verwendeten Primerkombinationen sowie die zu erwartenden Amplifikatgrößen sind Tabelle 3.1 zu entnehmen. Banden im erwarteten Größenbereich wurden mit einem Stern markiert. Das Bild wurde invertiert und in Helligkeit und Kontrast angepasst.

In jeder der Spuren mit den PCR-Produkten war eine bis mehrere Banden zu erkennen. Die jeweils am stärksten ausgeprägte lag in allen Fällen im erwarteten Größenbereich (vergleiche Tabelle 3.1). Dies war ein deutliches Indiz für die Lokalisation des putativen  $\gamma$ -Tubulin-Promotors *upstream* des codierenden Bereichs des  $\gamma$ -Tubulin-Gens.

### 3.2.3 Bestimmung der genomischen $\gamma$ -Tubulin-Vollängensequenz

Zur Erweiterung der Möglichkeiten in nachfolgenden Versuchen sollte die bereits im Laufe der Diplomarbeit (Wolf, 2008) begonnene Bestimmung der genomischen  $\gamma$ -Tubulin-Vollängensequenz abgeschlossen werden. Dies erfolgte mittels Primer-Walking. Die resultierende Sequenz ist dem Anhang (7.2.2) zu entnehmen.

### 3.2.4 Expression von GFP unter Verwendung des endogenen $\gamma$ -Tubulin-Promotors

Zunächst sollte durch ein einfaches Konstrukt die Funktionalität des putativen  $\gamma$ -Tubulin-Promotors (wird zur Vereinfachung im Folgenden als  $\gamma$ -Tubulin-Promotor bezeichnet) überprüft werden. Dazu wurde eine GFP-CDS mit der entsprechenden DNA-Sequenz fusioniert und durch *A. tumefaciens* vermittelte Transfektion auf *BY-2* Zellen übertragen.

Die Fusion erfolgte durch die abgewandelte Methode der RF-Klonierung, bei der Amplifikate des  $\gamma$ -Tubulin-Promotors und der GFP-CDS eingesetzt wurden.

Der  $\gamma$ -Tubulin-Promotor wurde mittels *nested*-PCR amplifiziert. Als Template diente ein DNA-Isolat aus einer *BY-2* Zellsuspensionskultur. Im ersten Lauf der *nested*-PCR wurde Prom\_fw\_57 als Forward-Primer verwendet. Er bindet im Bereich des 5'-Endes an die Sequenz des  $\gamma$ -Tubulin-Promotors. GT\_1898\_rev wurde als Reverse-Primer eingesetzt und bindet 140 bp *downstream* des Startcodons an die genomische Sequenz des  $\gamma$ -Tubulins. Beim zweiten Lauf der *nested*-PCR diente Prom\_fw\_106 als Forward-Primer. Er bindet 106 bp *downstream* des 5'-Endes an das erste Amplifikat. Prom\_rev\_1760 wurde als Reverse-Primer verwendet. Er bindet 138 bp *upstream* des 3'-Endes an das erste Amplifikat und beginnt mit den Basen A und T des  $\gamma$ -Tubulin-Startcodons. Durch die Wahl der Primer sollte eine Sequenz amplifiziert werden, die sowohl den Promotor als auch die 5'-UTR des  $\gamma$ -Tubulin-Gens umfasst. Die erwartete Produktlänge lag bei 1655 bp. In einer gelelektrophoretischen Auftrennung konnte eine deutliche Bande im entsprechenden Größenbereich nachgewiesen werden (Ergebnis nicht gezeigt).

Die GFP-CDS inklusive des 35S-Terminators wurde ebenfalls durch eine *nested*-PCR amplifiziert. Als Template diente der Vektor pCATgfp. Im ersten Lauf wurde GFP-Amp-fw-I als Forward-Primer eingesetzt. Er bindet 1019 bp *upstream* des GFP-Startcodons an den Vektor. GFP-Amp-rev-2298 wurde als Reverse-Primer verwendet. Er bindet 453 bp *downstream* des 35S-Terminators an pCATgfp. Im zweiten Lauf wurde GFP-nA-fw-910 als Forward-Primer eingesetzt. Er bindet mit seinem 3'-Ende an die ersten 20 Nukleotide der GFP-CDS beginnend mit dem Startcodon. Sein 5'-Ende fügt eine zum 3'-Ende des Promotor Amplifikates komplementäre Sequenz an. GFP-nA-rev-2140 wurde als Reverse-Primer verwendet. Er bindet 295 bp *downstream* des 35S-Terminators an pCATgfp. Die erwartete Produktlänge lag bei 1248 bp. In einer gelelektrophoretischen Auftrennung konnte eine deutliche Bande im entsprechenden Größenbereich nachgewiesen werden (Ergebnis nicht gezeigt).

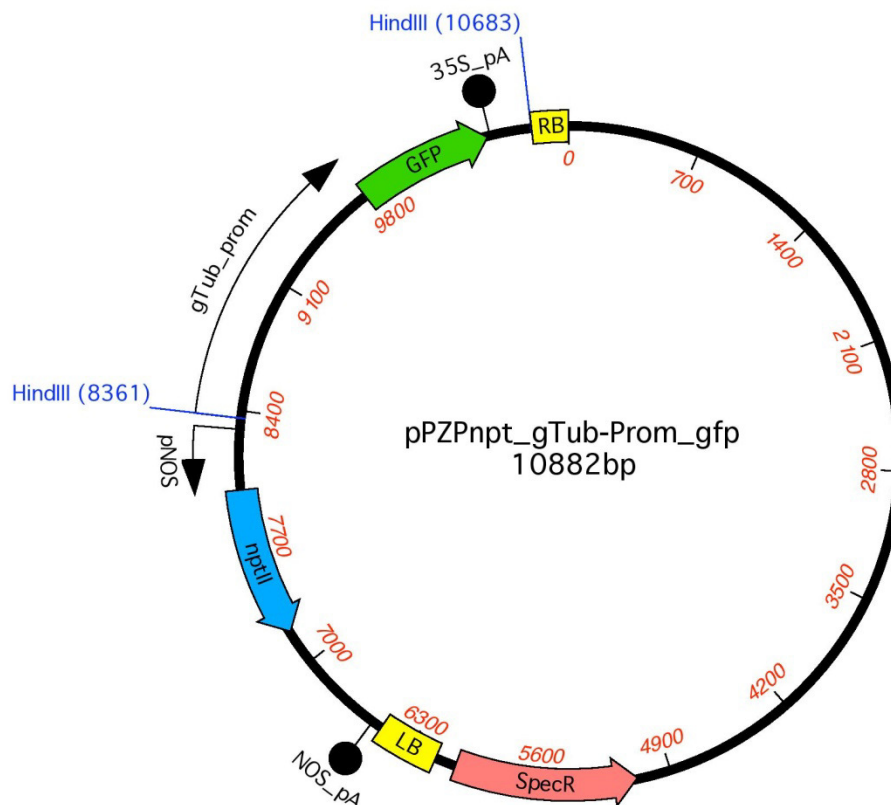
Die aus den beiden *nested*-PCR resultierenden Amplifikate wurden fusioniert. Dabei sollte ein Konstrukt aus der GFP-CDS unter Kontrolle des  $\gamma$ -Tubulin-Promotors und des 35S-Terminators entstehen. Die erwartete Produktlänge betrug 2884 bp. Durch eine gelelektrophoretischen Auftrennung konnte eine deutliche Bande im entsprechenden Größenbereich nachgewiesen werden (Ergebnis nicht gezeigt).

Für eine spätere Integration des Konstruktes in den Vektor pPZPnpt war das Einbringen einer Erkennungssequenz für die Restriktionsendonuklease HindIII an dessen 5'-Ende erforderlich. Am 3'-Ende, unmittelbar an den 35S-Terminator anschließend, lag bereits eine entsprechende Schnittstelle vor. Die Erkennungssequenz sollte während einer PCR durch den Mutationsprimer



nA\_Fu\_PG\_fw\_376 eingefügt werden. Er bindet 271 bp *downstream* des 5'-Endes an das Fusionsprodukt und wurde als Forward-Primer verwendet. Als Reverse-Primer diente GFP-Amp-rev-I, der 137 bp *downstream* des 35S-Terminators an das Fusionsprodukt bindet. Um eine dauerhafte Verfügbarkeit zu gewährleisten, wurde das Konstrukt im Anschluss an die Amplifikation in pGEM-TEasy subkloniert.

Zur Integration in pZPNpt wurde das Fusionskonstrukt mittels der Restriktionsendonuklease FastDigest HindIII aus pGEM-TEasy ausgeschnitten. Eine entsprechende Erkennungssequenz ist ebenfalls in der MCS von pZPNpt lokalisiert und wurde zur Linearisierung des Vektors verwendet. Die beiden Restriktionsfragmente wurden ligiert. Nach dem Transfer in *E. coli DH5α* wurde die korrekte Integration des Konstruktes in den Vektor mittels PCR und Sequenzierung relevanter Bereiche überprüft (Ergebnisse nicht gezeigt). Der Vektor wird im Folgenden als pZPNpt\_γ-Tub-Prom\_gfp bezeichnet, eine schematische Darstellung ist Abbildung 3.9 zu entnehmen. Die Klonierung fand im Rahmen einer von mir betreuten Diplomarbeit statt (Eichler, 2009).



**Abbildung 3.9: Schematische Darstellung des Vektors pPZPnpt\_γ-Tub-Prom\_gfp.**

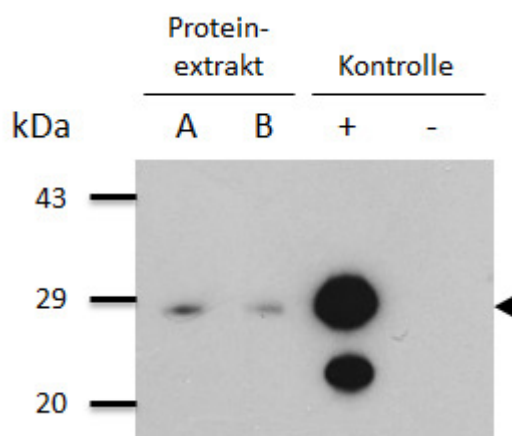
Dargestellt ist der Vektor pPZPnpt mit der integrierten GFP-CDS unter Kontrolle des  $\gamma$ -Tubulin-Promotors. Außerdem ist zwischen den Bordersequenzen (RB und LB), zur Selektion transfizierter Pflanzenzellen, das Neomycin-Phosphotransferase-II-Gen (nptII) lokalisiert. Darüber hinaus verfügt der Vektor, zur Selektion in Prokaryoten, über ein Spectinomycin-Resistenzgen (SpecR).

Der Vektor wurde in *A. tumefaciens* LBA4404 transferiert. Der entsprechende Bakterienstamm wird im Folgenden als LBA4404+pPZPnpt\_γ-Tub-Prom\_gfp bezeichnet.

Mittels der beschriebenen Methode zur *A. tumefaciens* vermittelten stabilen Transfektion wurde das Konstrukt auf BY-2 Zellen übertragen. Die gewachsenen Kalli wurden mikroskopisch auf eine dem GFP zuzuordnende Fluoreszenz untersucht. Es konnten keine deutlich leuchtenden Kalli beobachtet werden. Um detailliertere fluoreszenzmikroskopische Analysen an den Zellen durchführen zu können, war die Herstellung von Resuspensionskulturen erforderlich. Deshalb wurden vitale Kalli ausgewählt und für eine dauerhafte Erhaltung einzeln auf frisches LS-Festmedium mit adäquaten Antibiotika überführt. In der Folge wurden sie in LS-Flüssigmedium resuspendiert. Um eine dauerhafte Verfügbarkeit zu gewährleisten, wurden die Resuspensionskulturen im wöchentlichen

Turnus überimpft. Die entsprechenden Kulturen werden im Weiteren als *BY-2* pPZPnpt\_γ-Tub-Prom\_gfp bezeichnet.

Auch bei der fluoreszenzmikroskopischen Begutachtung der Resuspensionskulturen konnte keine eindeutig dem GFP zuzuordnende Fluoreszenz nachgewiesen werden. Geht man davon aus, dass der γ-Tubulin-Promotor ein relativ schwacher Promotor ist und zieht man zudem in Betracht, dass GFP ohne einen Fusionspartner frei im Cytosol flotiert, ist anzunehmen, dass die Konzentration des homogen über die Zelle verteilten GFP zu gering für einen Nachweis mit der vorgestellten Methode war. Deshalb sollte die Transgenexpression in Zelllinien, die mit *LBA4404*+pPZPnpt\_γ-Tub-Prom\_gfp transfiziert wurden, durch einen immunochemischen Proteinnachweis überprüft werden. Exemplarisch werden die Ergebnisse der Linien *BY-2* pPZPnpt\_γ-Tub-Prom\_gfp A2 und *BY-2* pPZPnpt\_γ-Tub-Prom\_gfp B14/3 vorgestellt. Als Positivkontrolle diente der Proteinextrakt von *BY-2* pPZPnpt\_gfp, als Negativkontrolle der von nativen *BY-2* Zellen. Aufgrund der starken GFP-Überexpression durch den 35S-Promotor wurden nur 1,5 µg Gesamtprotein der Positivkontrolle aufgetragen. Die Proteinextrakte wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt. Nach erfolgtem Western-Blot wurde das GFP mit Hilfe des primären Antikörpers „Anti-GFP“ und des sekundären Antikörpers „Mouse IgG, HRP-linked whole Antibody“ detektiert. Das Ergebnis ist Abbildung 3.10 zu entnehmen.



**Abbildung 3.10:** GFP-Expression in den Zelllinien *BY-2* pPZPnpt\_γ-Tub-Prom\_gfp A2 und *BY-2* pPZPnpt\_γ-Tub-Prom\_gfp B14/3.

Immunochemischer Proteinnachweis unter Verwendung des primären Antikörpers „Anti-GFP“. Von den beiden Kulturen *BY-2* pPZPnpt\_γ-Tub-Prom\_gfp A2 (Proteinextrakt A) und *BY-2* pPZPnpt\_γ-Tub-Prom\_gfp B14/3 (Proteinextrakt B) sowie von der nativen *BY-2* Kultur (Negativkontrolle; Kontrolle -) wurden jeweils 15 µg Gesamtprotein aufgetragen. Von der Kultur *BY-2* pPZPnpt\_gfp (Positivkontrolle; Kontrolle +) wurden 1,5 µg Gesamtprotein aufgetragen. Das zu erwartende Molekulargewicht von GFP beträgt 26,77 kDa (Markierung rechts).

Das zu erwartende Molekulargewicht von GFP beträgt 26,77 kDa. In den beiden Spuren der Proteinextrakte von *BY-2* pPZPnpt\_γ-Tub-Prom\_gfp A2 und *BY-2* pPZPnpt\_γ-Tub-Prom\_gfp B14/3

waren schwache Signale auf entsprechender Höhe etwas unterhalb der 29 kDa Bande des Proteinmarkers zu erkennen. Die Positivkontrolle zeigte ein äußerst starkes Signal auf gleicher Höhe. Ein zweites, etwas oberhalb der 20 kDa Bande liegendes Signal, war am wahrscheinlichsten auf Degradationsprodukte zurückzuführen. In der Spur mit der Negativkontrolle waren keine Banden sichtbar.

Durch die vorgestellten Versuche konnte gezeigt werden, dass die Aktivität des endogenen  $\gamma$ -Tubulin-Promotors, im Vergleich zum 35S-Promotor, sehr gering war. Fluoreszenzmikroskopisch war das freie GFP in den *BY-2* pPZPnpt\_ $\gamma$ -Tub-Prom\_gfp Zellen nicht nachweisbar. Dies ließ vermuten, dass die bei der Expression der chimären Proteine aufgetretene Hintergrundfluoreszenz durch Verwendung des endogenen  $\gamma$ -Tubulin-Promotors reduziert werden konnte. Trotz der geringen Expressionsrate wurde angenommen, dass ein durch diesen Promotor reguliertes, chimäres Protein aus GFP und  $\gamma$ -Tubulin aufgrund seiner fokalen Anordnung in Strukturen des Cytoskeletts fluoreszenzmikroskopisch nachweisbar war. Dies sollte in weiteren Versuchen überprüft werden.

### **3.2.5 Expression von GFP-markiertem $\gamma$ -Tubulin unter Verwendung des endogenen Promotors**

Für eine durch den endogenen Promotor regulierte Expression von GFP-markiertem  $\gamma$ -Tubulin musste zunächst ein entsprechendes Konstrukt erstellt und durch *A. tumefaciens* vermittelte Transfektion auf *BY-2* Zellen übertragen werden.

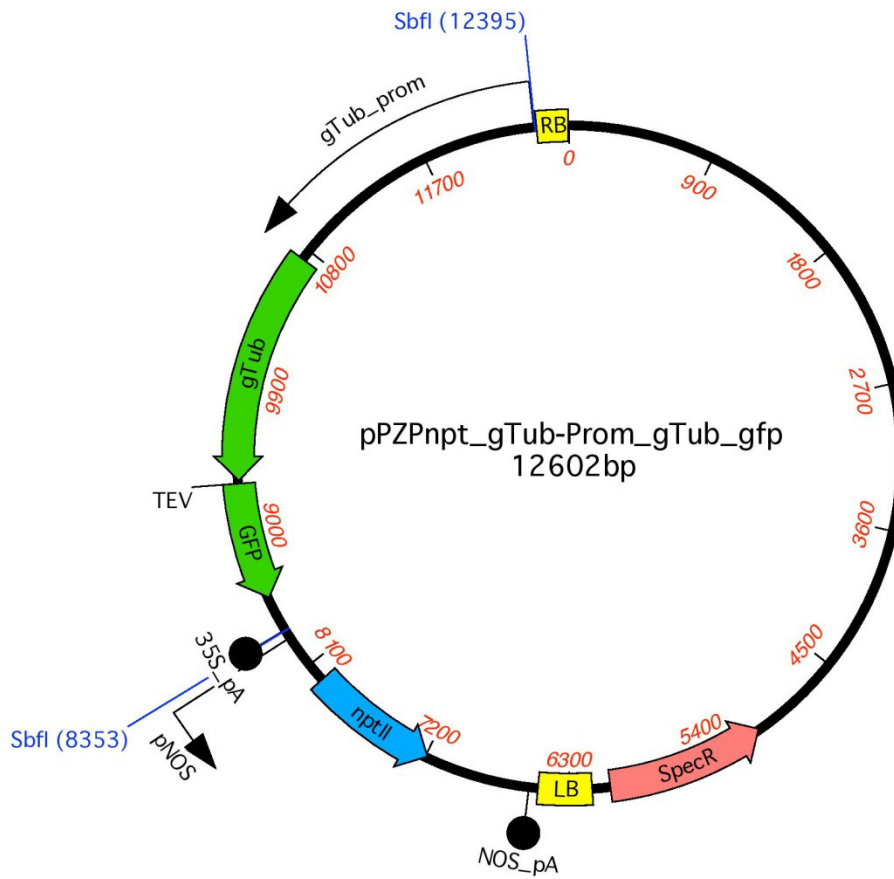
Die Herstellung des Fusionskonstruktes wurde als RF-Klonierung ausgeführt. Hierfür wurde durch eine PCR ein lineares Amplifikat des Vektors pCAT $\gamma$ -Tub\_gfp (siehe 3.2.1) generiert. Dabei wurden die Primer so gewählt, dass das Amplifikat den gesamten Vektor, exklusive des 35S-Promotors, umfasste. pCAT-35S+gT\_fw diente als Forward-Primer und pCAT-35S+gT\_rev als Reverse-Primer. pCAT-35S+gT\_fw bindet 32 bp *downstream* des  $\gamma$ -Tubulin-Startcodons. pCAT-35S+gT\_rev bindet 2652 bp *downstream* des 35S-Terminators. Die erwartete Produktlänge betrug 5000 bp. Durch eine gelelektrophoretischen Auftrennung konnte eine deutliche Bande im entsprechenden Größenbereich nachgewiesen werden (Ergebnis nicht gezeigt).

Der  $\gamma$ -Tubulin-Promotor wurde mittels *nested*-PCR amplifiziert. Als Template diente ein DNA-Isolat aus einer *BY-2* Zellsuspensionskultur. Der erste Lauf der *nested*-PCR wurde wie unter 3.2.4 beschrieben durchgeführt. Beim zweiten Lauf der *nested*-PCR wurde PROM\_CAT als Forward-Primer und Prom\_rev\_1825 als Reverse-Primer eingesetzt. PROM\_CAT bindet mit seinem 3'-Ende 106 bp *downstream* des 5'-Endes an das erste Amplifikat. Sein 5'-Ende fügt eine zum 3'-Ende des

linearisierten Vektors pCAT $\gamma$ -Tub\_gfp komplementäre Sequenz an. Zudem wurde der Primer so designt, dass im resultierenden Amplifikat, zwischen diesen beiden Bereichen, eine Erkennungssequenz für die Restriktionsendonuklease SbfI eingefügt wird. Prom\_rev\_1825 bindet 74 bp *upstream* des 3'-Endes des ersten Amplifikates und somit 67 bp *downstream* des  $\gamma$ -Tubulin-Startcodons. Durch diese Positionierung sollte der für die spätere RF-Klonierung essenzielle Überlappungsbereich entstehen. Durch die Wahl der Primer sollte eine Sequenz amplifiziert werden, die sowohl den Promotor als auch die 5'-UTR des  $\gamma$ -Tubulin-Gens umfasst. Die erwartete Produktlänge lag bei 1745 bp. In einer gelelektrophoretischen Auftrennung konnte eine deutliche Bande im entsprechenden Größenbereich nachgewiesen werden (Ergebnis nicht gezeigt).

Nach Integration des  $\gamma$ -Tubulin-Promotors in den Vektor wurde das resultierende Plasmid in *E. coli DH5 $\alpha$*  transferiert. Die korrekte Integration wurde durch mehrere PCR-Ansätze, unter Verwendung geeigneter Primer, überprüft (Ergebnisse nicht gezeigt). Der Vektor wird im Folgenden als pCAT $\gamma$ -Tub-Prom\_ $\gamma$ -Tub\_gfp bezeichnet.

Zur Integration in pPZPnpt wurde das Fusionskonstrukt mittels der Restriktionsendonuklease FastDigest SbfI aus pCAT $\gamma$ -Tub-Prom\_ $\gamma$ -Tub\_gfp ausgeschnitten. Eine entsprechende Erkennungssequenz ist ebenfalls in der MCS von pPZPnpt lokalisiert und wurde zur Linearisierung des Vektors verwendet. Die beiden Restriktionsfragmente wurden ligiert. Nach dem Transfer in *E. coli DH5 $\alpha$*  wurde die korrekte Integration des Konstruktes in den Vektor, mittels PCR und Sequenzierung relevanter Bereiche, überprüft (Ergebnisse nicht gezeigt). Der Vektor wird im Folgenden als pPZPnpt\_ $\gamma$ -Tub-Prom\_ $\gamma$ -Tub\_gfp bezeichnet, eine schematische Darstellung ist Abbildung 3.11 zu entnehmen.



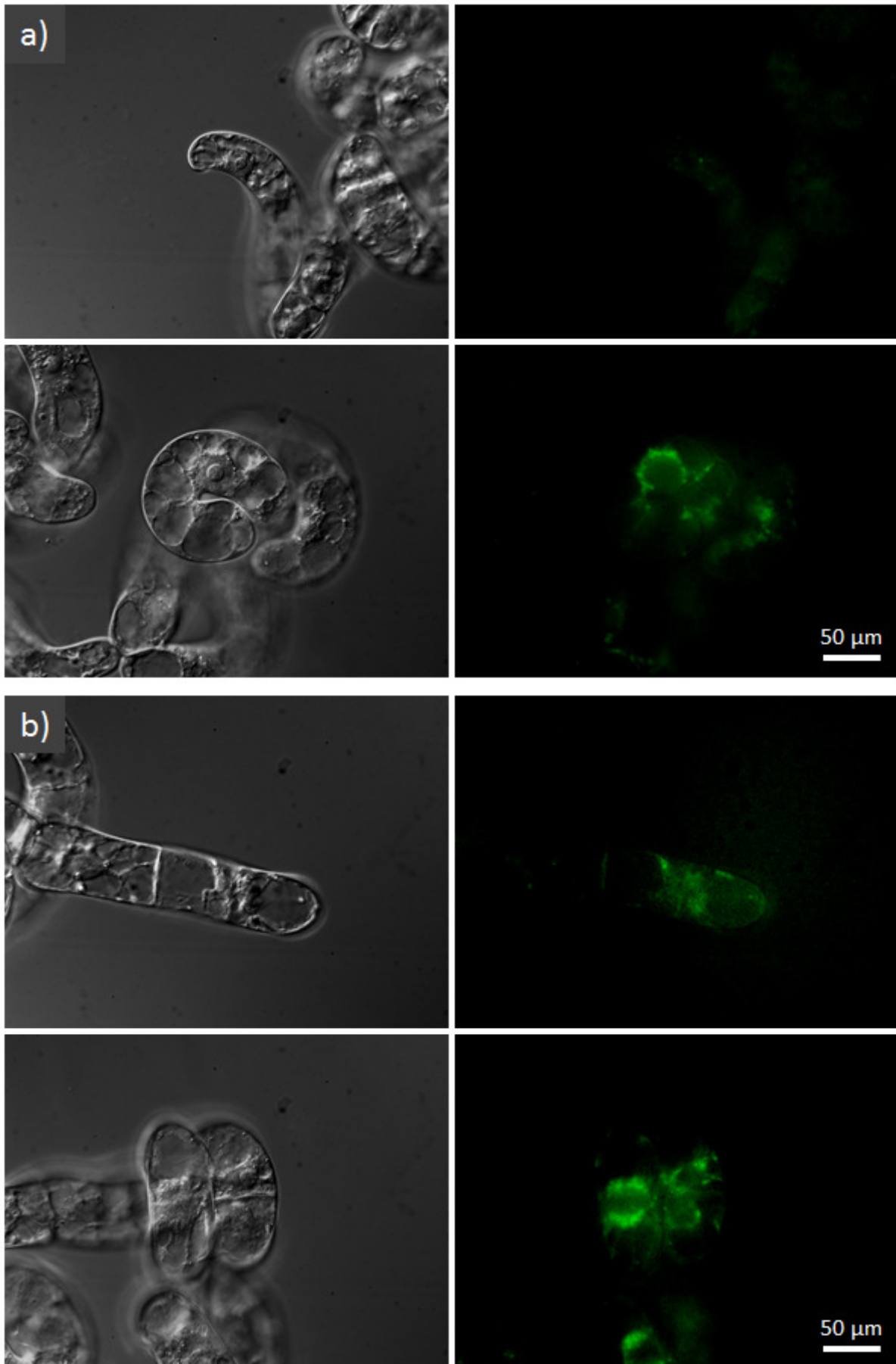
**Abbildung 3.11: Schematische Darstellung des Vektors pPZPnpt\_γ-Tub-Prom\_γ-Tub\_gfp.**

Dargestellt ist der Vektor pPZPnpt mit dem integrierten Fusionskonstrukt aus GFP und  $\gamma$ -Tubulin unter Kontrolle des  $\gamma$ -Tubulin-Promotors. Außerdem ist zwischen den Bordersequenzen (RB und LB), zur Selektion transfizierter Pflanzenzellen, das Neomycin-Phosphotransferase-II-Gen (nptII) lokalisiert. Darüber hinaus verfügt der Vektor, zur Selektion in Prokaryoten, über ein Spectinomycin-Resistenzgen (SpecR).

Der Vektor wurde in *A. tumefaciens* LBA4404 transferiert. Der entsprechende Bakterienstamm wird im Folgenden als LBA4404+pPZPnpt\_γ-Tub-Prom\_γ-Tub\_gfp bezeichnet.

Mittels der beschriebenen Methode zur *A. tumefaciens* vermittelten stabilen Transfektion wurde das Konstrukt auf BY-2 Zellen übertragen. Gewachsene Kalli wurden ausgewählt und für eine dauerhafte Erhaltung einzeln auf frisches LS-Festmedium mit adäquaten Antibiotika überführt. Für eine detaillierte fluoreszenzmikroskopische Analyse wurde eine der transfizierten Zelllinien in LS-Flüssigmedium resuspendiert. Um eine dauerhafte Verfügbarkeit zu gewährleisten, wurde die Resuspensionskultur im wöchentlichen Turnus überimpft. Die entsprechende Kultur wird im Weiteren als BY-2 pPZPnpt\_γ-Tub-Prom\_γ-Tub\_gfp bezeichnet.

Auch hier war bei der fluoreszenzmikroskopischen Begutachtung zunächst keine eindeutig dem GFP zuzuordnete Fluoreszenz nachweisbar. Im direkten Vergleich mit einer nativen *BY-2* Zellsuspensionskultur konnten jedoch bei längeren Belichtungszeiten von der Eigenfluoreszenz der Zellen unterscheidbare Signale beobachtet werden. Diese beschränkten sich jedoch auf Strukturen, die in den vorangegangenen Untersuchungen der Zelllinien *BY-2 pZPNpt\_γ-Tub\_gfp* und *BY-2 pZPNpt\_gfp\_γ-Tub* bereits beobachtet werden konnten. Durch die äußerst schwache Fluoreszenz war eine eindeutige Bestimmung der Strukturen sehr schwierig. Auch konnten keine feineren Strukturen des Cytoskeletts, wie etwa das cortikale Netzwerk, in den Zellen dokumentiert werden. Ergebnisse zu diesen Versuchen sind in Abbildung 3.12 dargestellt. Es wurden Aufnahmen der Zelllinien *BY-2* (nativ) und *BY-2 pZPNpt\_γ-Tub-Prom\_γ-Tub\_gfp* gegenübergestellt, die unter gleichen Bedingungen generiert wurden. Die Belichtungszeit der fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen wurde auf 4 s verlängert. Die *BY-2* Interphase-Zellen in Abbildung 3.12a (oben) zeigten eine sehr schwache und diffuse Eigenfluoreszenz. Im Vergleich dazu konnte in entsprechenden Zellen der Linie *BY-2 pZPNpt\_γ-Tub-Prom\_γ-Tub\_gfp* eine deutlichere Fluoreszenz, die besonders im Plasmasaum um den Zellkern lokalisiert war, detektiert werden (Abb. 3.12a; unten). Abbildung 3.12b zeigt Zellen im Teilungsstadium. Auch hier konnte in nativen *BY-2* Zellen eine schwächere, unspezifisch verteilte Eigenfluoreszenz beobachtet werden. Dagegen zeigten Zellen der Linie *BY-2 pZPNpt\_γ-Tub-Prom\_γ-Tub\_gfp* deutlich fluoreszierende Strukturen ober- und unterhalb der Teilungsebene (Abb. 3.12b; unten).

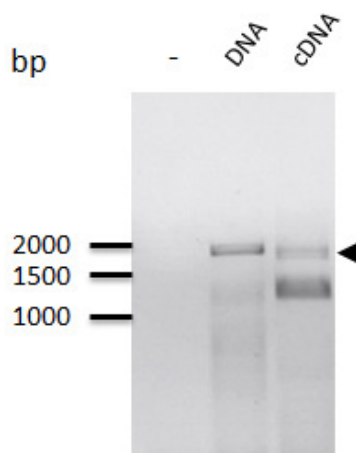




**Abbildung 3.12: Fluoreszenzmikroskopischer Vergleich der Zelllinien *BY-2* (nativ) und *BY-2* pPZPnpt\_γ-Tub-Prom\_γ-Tub\_gfp.**

Die Vergleichsbilder wurden parallel unter identischen Bedingungen und Einstellungen aufgenommen. Links: Hellfeld-Aufnahmen (DIC). Rechts: Fluoreszenz bei Anregung mit Blaulicht. **a)** Vergleich von Interphasezellen der Linien *BY-2* (nativ) (oben) und *BY-2* pPZPnpt\_γ-Tub-Prom\_γ-Tub\_gfp (unten). **b)** Vergleich von Zellen in der Teilungsphase der Linien *BY-2* (nativ) (oben) und *BY-2* pPZPnpt\_γ-Tub-Prom\_γ-Tub\_gfp (unten).

Die Transkription des Fusionskonstruktes in der Zelllinie *BY-2* pPZPnpt\_γ-Tub-Prom\_γ-Tub\_gfp wurde zusätzlich durch eine RNA-Isolation mit anschließender cDNA-Synthese und darauf folgender PCR-Analyse überprüft. Als Primer dienten gTub\_fw\_265 und GFP\_cDNA\_rev1. Sie binden an eine 1932 bp lange Sequenz innerhalb des Fusionskonstruktes. gTub\_fw\_265 bindet dabei an die γ-Tubulin-CDS, GFP\_cDNA\_rev1 an die des GFPs. Als Positivkontrolle diente ein PCR-Ansatz, bei dem ein DNA-Isolat der Zelllinie *BY-2* pPZPnpt\_γ-Tub-Prom\_γ-Tub\_gfp als Template eingesetzt wurde. Bei einer Negativkontrolle wurde *sddH<sub>2</sub>O* anstelle eines Templates verwendet. Durch eine gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte konnte im Ansatz mit der cDNA als Template, wie auch der Positivkontrolle, eine Bande im erwarteten Größenbereich detektiert werden (Abb. 3.13). Die etwas darunter liegende zusätzliche Bande war auf Fehlhybridisierungen der Primer zurückzuführen. In der Spur mit der Negativkontrolle waren keine Banden sichtbar.



**Abbildung 3.13: Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Ansätze zur Überprüfung der Transkription des Fusionskonstruktes in der Zelllinie *BY-2* pPZPnpt\_γ-Tub-Prom\_γ-Tub\_gfp.**

Als Primer dienten gTub\_fw\_265 und GFP\_cDNA\_rev1. Die zu erwartende Amplifikatgröße lag bei 1932 bp (Markierung rechts). Die erste Spur zeigt die Auftrennung der Negativkontrolle (-), bei der *sddH<sub>2</sub>O* anstelle eines Templates eingesetzt wurde. Die zweite Spur zeigt die Auftrennung der Positivkontrolle, bei der ein DNA-Isolat der Zelllinie *BY-2* pPZPnpt\_γ-Tub-Prom\_γ-Tub\_gfp als Template verwendet wurde. Die dritte Spur zeigt die Auftrennung des Ansatzes, bei dem die cDNA der entsprechenden Zelllinie als Template diente. Das Bild wurde invertiert.

Auch hier wurde, wie bei der Überexpression des GFP-markierten  $\gamma$ -Tubulins durch den 35S-Promotor, überprüft, ob die Position des GFP-Tags Auswirkungen auf die Fluoreszenzeigenschaften und somit die Detektion des chimären Proteins hat. Dazu wurde eine weitere Version des Konstruktes erstellt, bei der die GFP-Sequenz an das 5'-Ende der  $\gamma$ -Tubulin-CDS angefügt wurde. Nach dem Transfer auf *BY-2* Zellen erfolgte eine fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der resultierenden Zelllinien. Durch die veränderte Positionierung des Tags war jedoch keine wahrnehmbare Verbesserung der Fluoreszenzeigenschaften zu dokumentieren (Ergebnisse nicht gezeigt). Die entsprechenden Kulturen werden im Weiteren als *BY-2* pPZPnpt\_ $\gamma$ -Tub-Prom\_gfp\_ $\gamma$ -Tub bezeichnet.

### 3.2.6 Überexpression von GFP-markiertem $\alpha$ -Tubulin in *BY-2* Zellen

Für eine spätere Co-Lokalisation des  $\gamma$ -Tubulin-Proteins und der Mikrotubuli war ein weiteres Fusionskonstrukt erforderlich. Als Bestandteil der Heterodimere, aus denen ein Mikrotubulus aufgebaut ist, wurde das  $\alpha$ -Tubulin gewählt. Grundlage dieser Entscheidung war die Arbeit von Ueda et al. (1999), die ein chimäres Protein aus  $\alpha$ -Tubulin und einem N-terminalen GFP-Tag in *A. thaliana* erfolgreich überexprimierten. Sie favorisierten  $\alpha$ -Tubulin gegenüber  $\beta$ -Tubulin, da Weinstein und Solomon (1990) zeigten, dass Hefen eine Überexpression von  $\alpha$ -Tubulin tolerieren, eine entsprechende Überexpression von  $\beta$ -Tubuli jedoch letale Folgen hat. Ihre Begründung für einen N-terminale GFP-Tag basierte auf der Arbeit von Carminati und Stearns (1997). Sie zeigten, dass ein  $\alpha$ -Tubulin (*TUB3*) mit N-terminalem GFP-Tag Hefe *TUB3* Nullmutanten komplementiert. Ein entsprechendes Konstrukt mit C-terminalem Tag vermochte dies nicht. Des Weiteren ist anzumerken, dass bereits eine andere Arbeitsgruppe eine *BY-2* Zelllinie etablieren konnte, die ein  $\alpha$ -Tubulin überexprimiert, das am N-Terminus einen GFP-Tag trägt (Kumagai et al., 2001). Unter Berücksichtigung dieser Erkenntnisse sollte zunächst ein Fusionskonstrukt aus der *BY-2*  $\alpha$ -Tubulin-CDS (Kumagai, 2000; GenBank: AB052822.1) und der an ihr 5'-Ende angefügten GFP-Sequenz erstellt werden. Als regulatorische Sequenz sollte das 35S-Promotorsystem Verwendung finden. Da für eine Co-Lokalisation ein vom GFP unterscheidbares FP als Tag benötigt wurde, ist die Herstellung des erwähnten Konstruktes als Vorversuch zu bewerten. Es sollte zunächst überprüft werden, ob die Etablierung einer Zelllinie, die ein chimäres Protein aus GFP und  $\alpha$ -Tubulin exprimiert, in unseren Händen möglich war.

Zur Amplifikation der  $\alpha$ -Tubulin-cDNA wurde zunächst die RNA aus einer *BY-2* Zellsuspensionskultur isoliert. Nach einer RT-PCR, bei der das RNA-Isolat als Template diente, wurde die  $\alpha$ -Tubulin-cDNA mit den Primern aTub\_cDNA\_fw1 und aTub\_cDNA\_rev1 amplifiziert. Der Forward-Primer

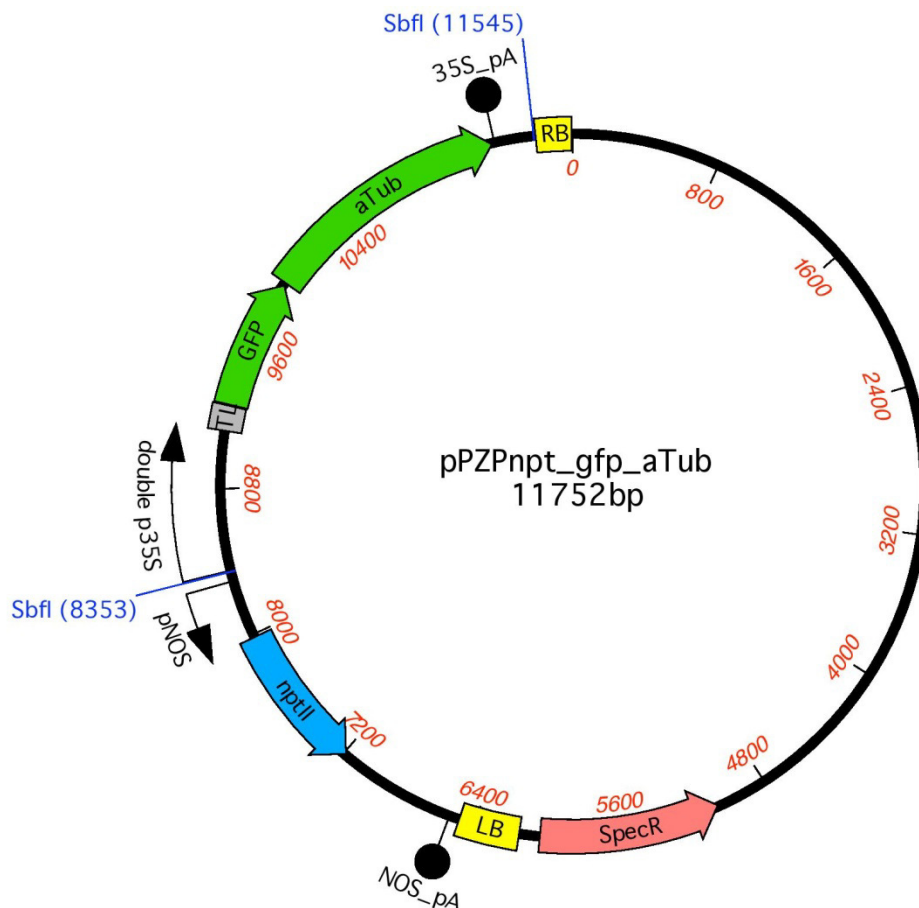
aTub\_cDNA\_fw1 bindet mit seinem 3'-Ende an die ersten 17 bp der  $\alpha$ -Tubulin-CDS, ausgehend vom Startcodon. Sein 5'-Ende verlängert das Amplifikat um 6 bp, die im späteren Konstrukt als Spacer zwischen den Fusionspartnern dienen sollten. Dieser Spacer entspricht, wie bei Ueda et al. (1999), der Erkennungssequenz für die Restriktionsendonuklease NaeI und führt im resultierenden chimären Protein, wie bei Kumagai et al. (2001), zu einem Ala-Gly-Linker. Der Reverse-Primer aTub\_cDNA\_rev1 bindet 51 bp *downstream* des Stopcodons an die 3'-UTR der  $\alpha$ -Tubulin-cDNA. Um eine dauerhafte Verfügbarkeit zu gewährleisten, wurde das Amplifikat in den Subklonierungsvektor pJET1.2 eingebracht und auf *E. coli DH5 $\alpha$*  transferiert. Zur Überprüfung der korrekten Nukleotidsequenz wurde die  $\alpha$ -Tubulin-CDS in pJET1.2 sequenziert. Da sich die Sequenz von der Referenz (Kumagai, 2000; GenBank: AB052822.1) unterschied, wurde der beschriebene Vektor in mehreren Versuchen mehrfach generiert und sequenziert. Die Ergebnisse zeigten in allen Fällen Substitutionen an Position 263 (G→A) und 1210 (C→T). Beide führen an entsprechender Stelle zu einer abweichenden Aminosäuresequenz, Arg→His bzw. Leu→Phe. Da Position und Art der Substitutionen immer gleich waren, wurde davon ausgegangen, dass die von Kumagai und uns verwendeten BY-2 Zelllinien genetisch variierten und dass es sich nicht um Punktmutationen aufgrund fehlerhafter Amplifikation handelte. Eine vergleichende Gegenüberstellung der beiden Sequenzen ist im Anhang (7.2.3) aufgeführt. Der Vektor wird nachfolgend als pJET1.2\_ $\alpha$ -Tub bezeichnet. Sämtliche zur Klonierung eingesetzten  $\alpha$ -Tubulin-cDNA-Amplifikate gehen auf diesen Vektor zurück.

Die Herstellung des Fusionskonstruktes wurde als RF-Klonierung ausgeführt. Dazu wurde durch eine PCR mit Hilfe der Primer pCATgfp\_Lin\_fw und pCATgfp\_Lin\_rev ein lineares Amplifikat des Vektors pCATgfp generiert. Der Forward-Primer pCATgfp\_Lin\_fw bindet an die 18 Nukleotide *downstream* des GFP-Stopcodons. Der Reverse-Primer pCATgfp\_Lin\_rev bindet an die 21 Nukleotide *upstream* des GFP-Stopcodons. Durch die Wahl der Primer sollte im linearisierten Vektor das Stopcodon deletiert werden. Die  $\alpha$ -Tubulin-CDS wurde mit Hilfe der Primer aTub+UEH\_fw1 und aTub+UEH\_rev1 amplifiziert. Der Forward-Primer aTub+UEH\_fw1 bindet mit 18 Nukleotiden seines 3'-Endes an das 5'-Ende der  $\alpha$ -Tubulin-CDS inklusive des 6 bp langen Spacers *upstream* des Startcodons. Sein 5'-Ende fügt dem Amplifikat einen 19 bp Überhang an, dessen Sequenz der des 3'-Endes des linearisierten pCATgfp Vektors entspricht. Dieser sollte später als Überlappungsbereich für die RF-Klonierung dienen. Der Reverse-Primer aTub+UEH\_rev1 bindet mit seinem 3'-Ende an die letzten 24 Nukleotide der  $\alpha$ -Tubulin-CDS. Sein 5'-Ende fügt dem Amplifikat einen 15 bp Überhang an, dessen Sequenz der des 5'-Endes des linearisierten pCATgfp Vektors entspricht.

Nach Integration der  $\alpha$ -Tubulin-CDS in den Vektor wurde das resultierende Plasmid in *E. coli DH5 $\alpha$*  transferiert. Die korrekte Integration wurde durch mehrere PCR-Ansätze, unter Verwendung

geeigneter Primer, überprüft (Ergebnisse nicht gezeigt). Der Vektor wird im Folgenden als pCATgfp\_α-Tub bezeichnet.

Zur Integration in pZPNpt wurde das Fusionskonstrukt mittels der Restriktionsendonuklease FastDigest SbfI aus pCATgfp\_α-Tub ausgeschnitten. Eine entsprechende Erkennungssequenz ist ebenfalls in der MCS von pZPNpt lokalisiert und wurde zur Linearisierung des Vektors verwendet. Die beiden Restriktionsfragmente wurden ligiert. Nach dem Transfer in *E. coli* DH5α wurde die korrekte Integration des Konstruktes in den Vektor, mittels PCR und Sequenzierung relevanter Bereiche, überprüft (Ergebnisse nicht gezeigt). Der Vektor wird im Folgenden als pZPNpt\_gfp\_α-Tub bezeichnet, eine schematische Darstellung ist Abbildung 3.14 zu entnehmen.



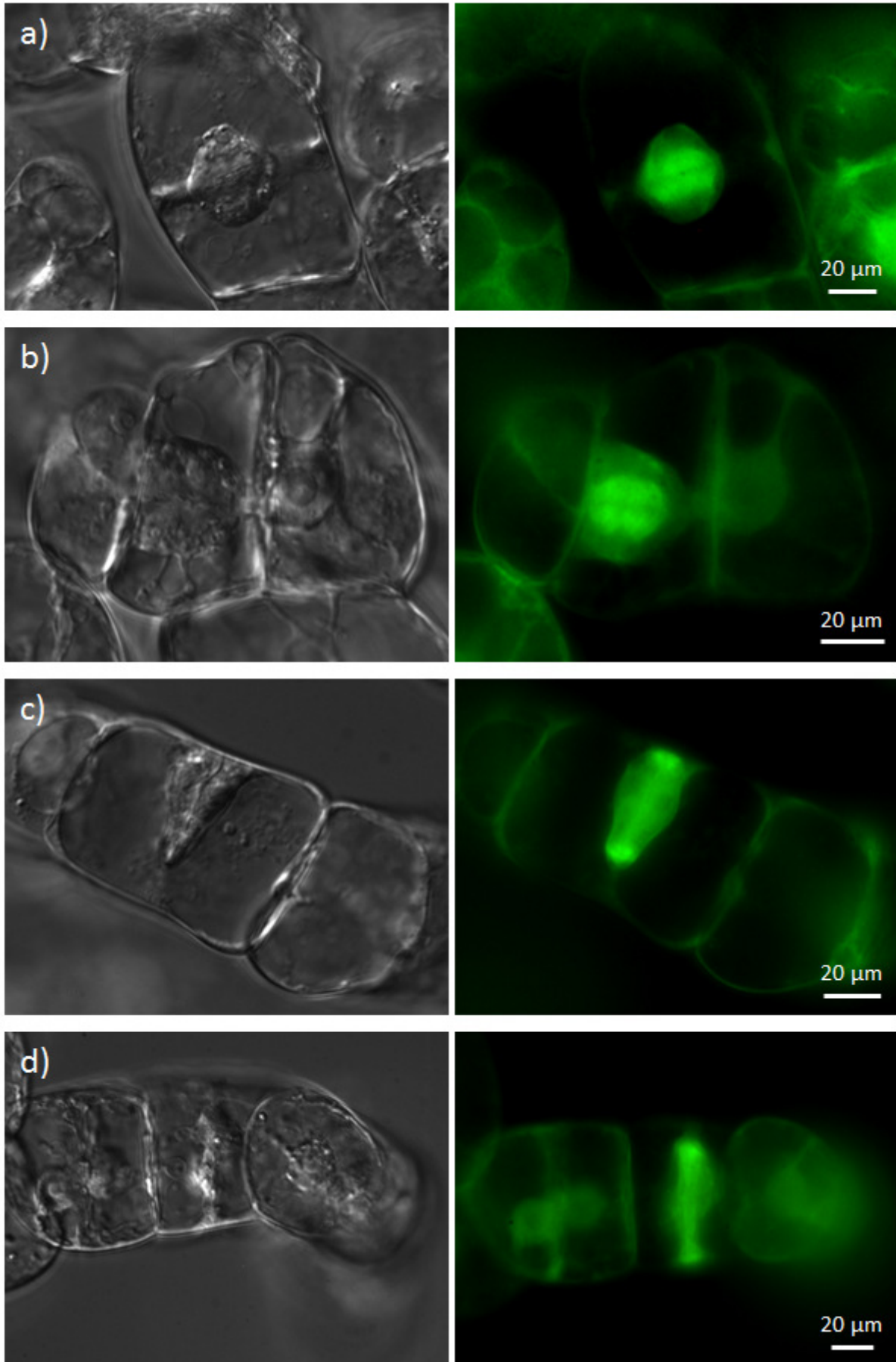
**Abbildung 3.14: Schematische Darstellung des Vektors pZPNpt\_gfp\_α-Tub.**

Dargestellt ist der Vektor pZPNpt mit dem integrierten Fusionskonstrukt aus GFP und α-Tubulin unter Kontrolle des doppelten 35S-Promotors. Außerdem ist zwischen den Bordersequenzen (RB und LB), zur Selektion transfizierter Pflanzenzellen, das Neomycin-Phosphotransferase-II-Gen (nptII) lokalisiert. Darüber hinaus verfügt der Vektor, zur Selektion in Prokaryoten, über ein Spectinomycin-Resistenzgen (SpecR).

Der Vektor wurde in *A. tumefaciens* LBA4404 transferiert. Der entsprechende Bakterienstamm wird im Folgenden als LBA4404+pPZPnpt\_gfp\_α-Tub bezeichnet.

Mittels der beschriebenen Methode zur *A. tumefaciens* vermittelten stabilen Transfektion wurde das Konstrukt auf BY-2 Zellen übertragen. Gewachsene Kalli wurden ausgewählt und für eine dauerhafte Erhaltung einzeln auf frisches LS-Festmedium mit adäquaten Antibiotika überführt. Für eine detaillierte fluoreszenzmikroskopische Analyse wurden mehrere der transfizierten Zelllinien in LS-Flüssigmedium resuspendiert. Nach ersten fluoreszenzmikroskopischen Auswertungen wurde eine Kultur ausgewählt. Um ihre dauerhafte Verfügbarkeit zu gewährleisten, wurde die Resuspensionskultur im wöchentlichen Turnus überimpft. Sie wird im Weiteren als BY-2 pPZPnpt\_gfp\_α-Tub bezeichnet.

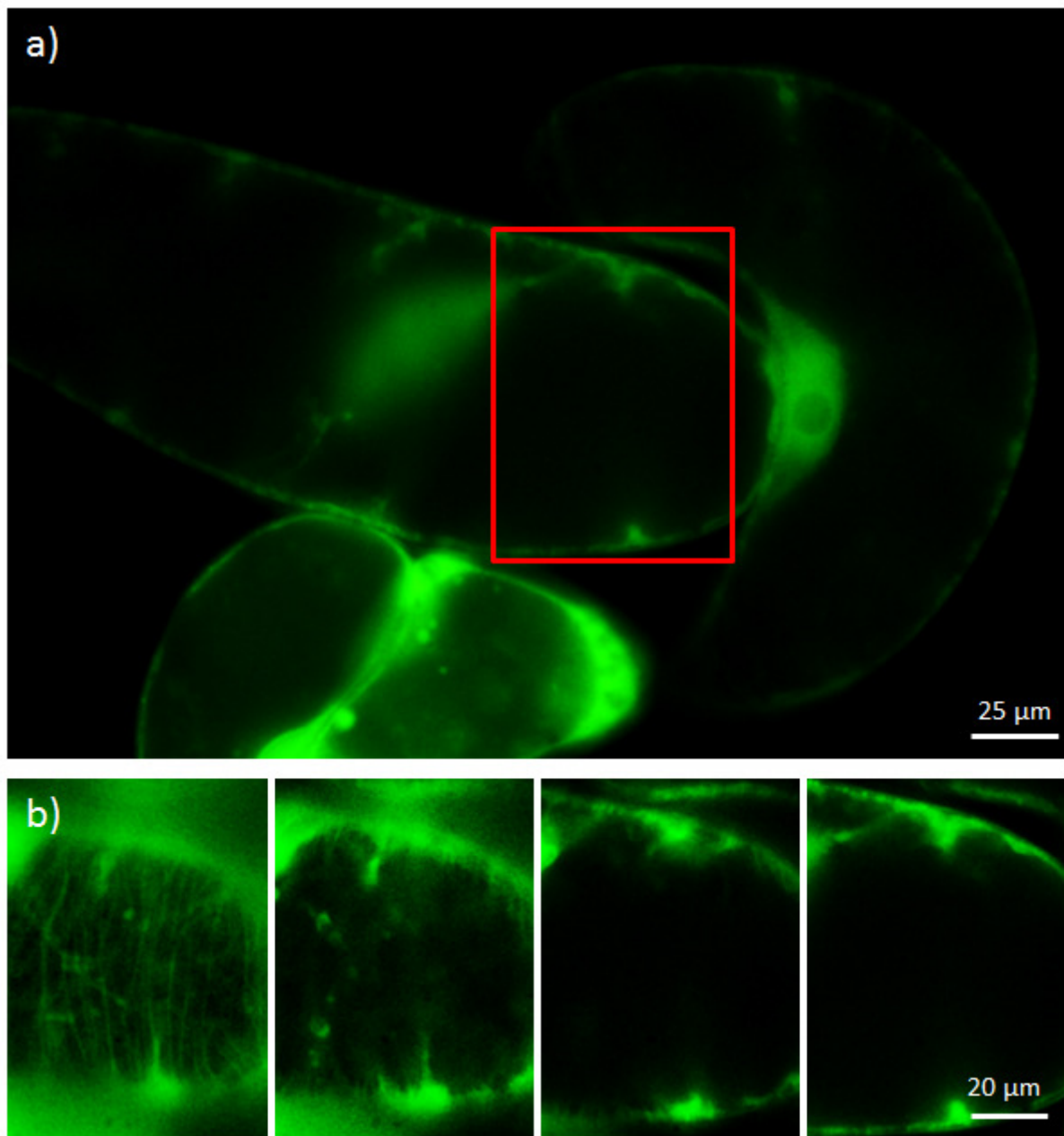
Bei der fluoreszenzmikroskopischen Begutachtung konnte eine sehr deutliche, dem GFP zuzuordnende Fluoreszenz nachgewiesen werden (Abb. 3.15). Strukturen des mikrotubulären Cytoskeletts waren deutlich gefärbt. Abbildung 3.15a und 3.15b zeigen mitotische Spindeln in einem frühen Stadium. In 3.15a sind neben der Spindel noch Überreste des in der Auflösung befindlichen Präprophasebandes, im Bereich der Plasmamembran, auf Höhe der Teilungsebene zu erkennen. Abbildung 3.15c und 3.15d zeigen Phragmoplasten, die in ihrer Entwicklung unterschiedlich weit fortgeschritten sind. Die sich zentrifugal ausbreitende, ringförmige Struktur ist in beiden Teilabbildungen als zwei hellere Flecken deutlich zu erkennen. Der Phragmoplast in 3.15c hat auf einer Seite bereits Kontakt zur Plasmamembran. Der Phragmoplast in 3.15d steht kurz vor Vollendung der neuen Zellplatte und somit seiner Auflösung.



**Abbildung 3.15: Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der Zelllinie *BY-2 pPZPnpt\_gfp\_α-Tub*.**

Darstellung mitotischer Spindeln und Phragmoplasten. Links: Hellfeld-Aufnahmen (DIC). Rechts: GFP-Fluoreszenz bei Anregung mit Blaulicht. **a + b)** mitotische Spindeln in Zellen der Linie *BY-2 pPZPnpt\_gfp\_α-Tub*. **c + d)** Phragmoplasten in Zellen der Linie *BY-2 pPZPnpt\_gfp\_α-Tub*.

Zudem konnte im Cortex elongierter Zellen ein feines Mikrotubuli-Netzwerk beobachtet werden (Abb. 3.16). Abbildung 3.16a zeigt Zellen der Linie *BY-2 pPZPnpt\_gfp\_α-Tub*, die Fokusebene lag nahe dem Zentrum der Zelle. Der gekennzeichnete Bereich entspricht dem in 3.16b gezeigten Ausschnitt. Hier ist eine Bildserie dargestellt, in deren Verlauf die Fokusebene vom Zellcortex (Abb. 3.16b; links) in Richtung Zentrum der Zelle (Abb. 3.16b; rechts) verschoben wurde. Es ist deutlich zu erkennen, dass das beschriebene Netzwerk auf den Cortex beschränkt war. Aufgrund der starken Hintergrundfluoreszenz war auch hier die Dokumentation, gerade des feinen Mikrotubuli-Netzwerkes, sehr schwierig.



**Abbildung 3.16:** Fluoreszenzmikroskopischer Nachweis cortikaler Mikrotubuli in elongierten Zellen der Linie *BY-2* pPZPnpt\_gfp\_α-Tub.

**a)** Aufnahme elongierter *BY-2* pPZPnpt\_gfp\_α-Tub Zellen. Die Fokusebene lag nahe dem Zentrum der Zellen. Der rote Rahmen kennzeichnet den in **b)** gezeigten Bereich. **b)** Im Verlauf der Bildserie wurde die Fokusebene vom Zellcortex (links) in Richtung Zentrum der Zelle (rechts) verschoben.

### 3.2.7 Überexpression von RFP in *BY-2* Zellen

Für eine Co-Lokalisation von  $\alpha$ - und  $\gamma$ -Tubulin war neben dem bereits für mehrere Fusionskonstrukte verwendeten GFP ein weiteres FP erforderlich. Die Wahl fiel auf TagRFP (Merzlyak et al., 2007), da es laut Herstellerangaben (Evrogen JSC, Moscow, Russia) eine sehr helle Fluoreszenz aufweist und für die Herstellung von Fusionsproteinen geeignet ist. Zudem wird eine Version angeboten, deren

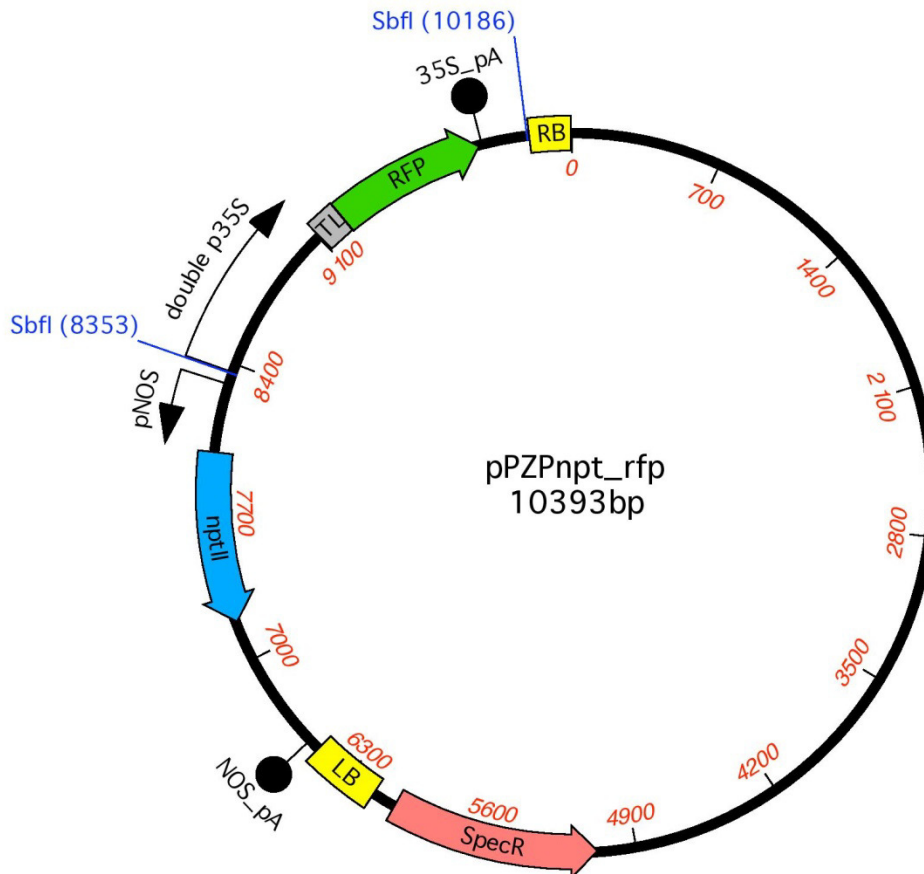


Sequenz an das *Codon Usage* von *Arabidopsis* angepasst wurde. Zunächst sollte in einem Versuch überprüft werden, ob die Überexpression von TagRFP in der zur Verfügung stehenden BY-2 Zelllinie möglich war. Da die RFP-CDS in dem vom Hersteller ausgelieferten Vektor *Gateway® TagRFP-AS-N entry clone* ohne Promotor vorlag, musste sie zunächst in den Vektor pCATgfp, bei dem die GFP-CDS deletiert werden sollte, integriert werden.

Die Integration sollte als RF-Klonierung ausgeführt werden. Dazu wurde durch eine PCR mit Hilfe der Primer pCATgfp\_Lin\_fw und pCATgfp\_rev\_912 ein lineares Amplifikat des Vektors pCATgfp generiert. Der Forward-Primer pCATgfp\_Lin\_fw bindet an die 18 Nukleotide *downstream* des GFP-Stopcodons. Der Reverse-Primer pCATgfp\_rev\_912 bindet an den Bereich des Vektors, der unmittelbar vor dem Startcodon der GFP-CDS liegt und schließt dieses mit ein. Das resultierende Amplifikat sollte dem linearisierten pCATgfp Vektor mit deletierter GFP-CDS entsprechen. Als Template für die Amplifikation der RFP-CDS diente der isolierte Vektor *Gateway® TagRFP-AS-N entry clone*. Der Forward-Primer RFP\_ATG+UEH\_fw bindet mit 21 Nukleotiden seines 3'-Endes an das 5'-Ende der RFP-CDS beginnend mit dem Startcodon. Sein 5'-Ende fügt dem Amplifikat einen 15 bp Überhang an, dessen Sequenz der des 3'-Endes des linearisierten pCATgfp Vektors entspricht. Dieser sollte später als Überlappungsbereich für die RF-Klonierung dienen. Der Reverse-Primer RFP\_STOP+UEH\_rev bindet mit seinem 3'-Ende an die letzten 21 Nukleotide der RFP-CDS inklusive des Stopcodons. Sein 5'-Ende fügt dem Amplifikat einen 16 bp Überhang an, dessen Sequenz der des 5'-Endes des linearisierten pCATgfp Vektors entspricht.

Nach Integration der RFP-CDS in den Vektor wurde das resultierende Plasmid in *E. coli DH5α* transferiert. Die korrekte Integration wurde mittels PCR und Sequenzierung relevanter Bereiche überprüft (Ergebnisse nicht gezeigt). Der Vektor wird im Folgenden als pCATrfp bezeichnet.

Zur Integration in pPZPnpt wurde das Konstrukt, bestehend aus RFP-CDS und 35S-Promotorsystem, mittels der Restriktionsendonuklease FastDigest SbfI aus pCATrfp ausgeschnitten. Eine entsprechende Erkennungssequenz ist ebenfalls in der MCS von pPZPnpt lokalisiert und wurde zur Linearisierung des Vektors verwendet. Die beiden Restriktionsfragmente wurden ligiert. Nach dem Transfer in *E. coli DH5α* wurde die korrekte Integration des Konstruktes in den Vektor, mittels PCR und Sequenzierung relevanter Bereiche, überprüft (Ergebnisse nicht gezeigt). Der Vektor wird im Folgenden als pPZPnpt\_rfp bezeichnet, eine schematische Darstellung ist Abbildung 3.17 zu entnehmen.



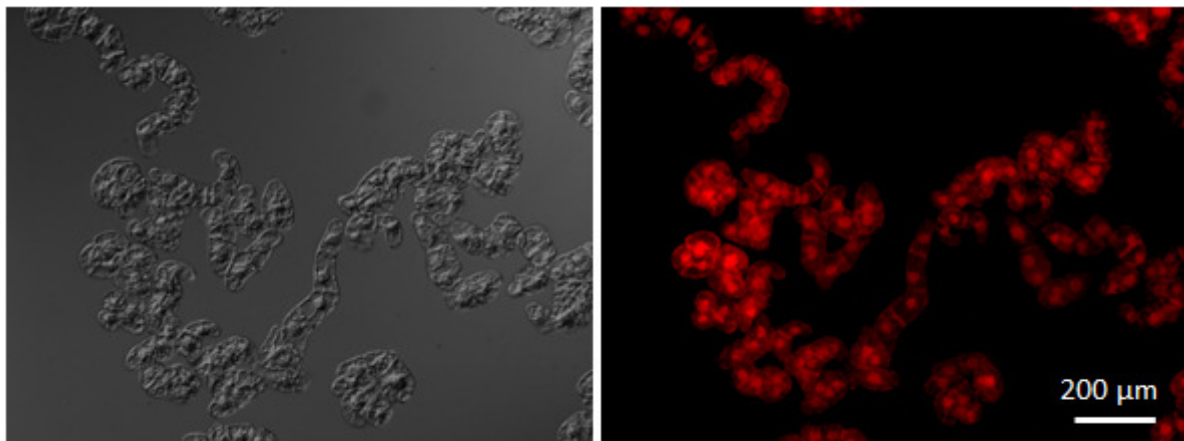
**Abbildung 3.17: Schematische Darstellung des Vektors pPZPnpt\_rfp.**

Dargestellt ist der Vektor pPZPnpt mit der integrierten RFP-CDS unter Kontrolle des doppelten 35S-Promotors. Außerdem ist zwischen den Bordersequenzen (RB und LB), zur Selektion transfizierter Pflanzenzellen, das Neomycin-Phosphotransferase-II-Gen (nptII) lokalisiert. Darüber hinaus verfügt der Vektor, zur Selektion in Prokaryoten, über ein Spectinomycin-Resistenzgen (SpecR).

Der Vektor wurde in *A. tumefaciens* LBA4404 transferiert. Der entsprechende Bakterienstamm wird im Folgenden als LBA4404+pPZPnpt\_rfp bezeichnet.

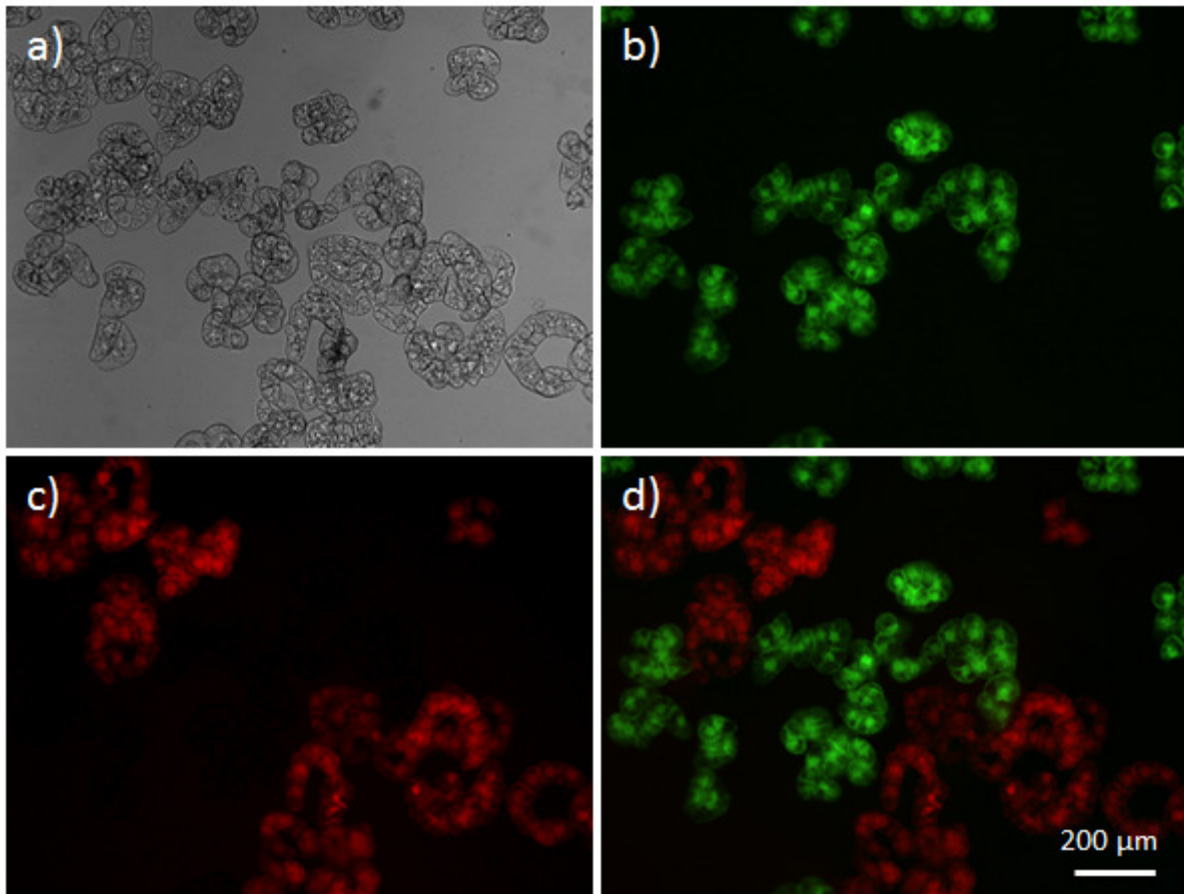
Mittels der beschriebenen Methode zur *A. tumefaciens* vermittelten stabilen Transfektion wurde das Konstrukt auf BY-2 Zellen übertragen. Gewachsene Kalli wurden ausgewählt und für eine dauerhafte Erhaltung einzeln auf frisches LS-Festmedium mit adäquaten Antibiotika überführt. Für eine detaillierte fluoreszenzmikroskopische Analyse wurden mehrere der transfizierten Zelllinien in LS-Flüssigmedium resuspendiert. Nach ersten fluoreszenzmikroskopischen Auswertungen wurde eine Kultur ausgewählt. Um ihre dauerhafte Verfügbarkeit zu gewährleisten, wurde die Resuspensionskultur im wöchentlichen Turnus überimpft. Sie wird im Weiteren als BY-2 pPZPnpt\_rfp bezeichnet.

Bei der fluoreszenzmikroskopischen Begutachtung konnte eine sehr deutliche, dem RFP zuzuordnende Fluoreszenz nachgewiesen werden. Diese war, wie bei freiem GFP, ubiquitär über das Cytosol verteilt. Abbildung 3.18 zeigt ein entsprechendes Beispiel. Um zu überprüfen, ob eine parallele Darstellung beider Fluoreszenzen auf einem Objektträger möglich war, wurde die Zellsuspensionskultur *BY-2* pPZPnpt\_rfp und eine mittels *LBA4404*+pPZPnpt\_gfp transfizierte Kultur, im Weiteren als *BY-2* pPZPnpt\_gfp bezeichnet, 1:1 gemischt und fluoreszenzmikroskopisch begutachtet. Dabei wurde die Wellenlänge des Anregungslichtes, den Anforderungen des jeweiligen FP entsprechend, durch Verwendung unterschiedlicher Filter verändert. Durch diesen Versuch konnte eine parallele Darstellung beider Fluoreszenzen gezeigt werden, die Ergebnisse sind Abbildung 3.19 zu entnehmen.



**Abbildung 3.18: Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der Zelllinie *BY-2* pPZPnpt\_rfp.**

Ubiquitär über das Cytosol verteilte RFP-Fluoreszenz. Links: Hellfeld-Aufnahme (DIC). Rechts: RFP-Fluoreszenz bei Anregung mit Grünlicht.



**Abbildung 3.19:** Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung einer Mischkultur der Zelllinien *BY-2 pPZPnpt\_gfp* und *BY-2 pPZPnpt\_rfp*.

Parallele Darstellung der RFP- und GFP-Fluoreszenz. **a)** Hellfeld-Aufnahme der Mischkultur. **b)** GFP-Fluoreszenz bei Anregung mit Blaulicht. **c)** RFP-Fluoreszenz bei Anregung mit Grünlicht. **d)** Überlagerung der Teilabbildungen **b)** und **c)**, beide Fluoreszenzen waren deutlich wahrnehmbar.

### 3.2.8 Expression von RFP-markiertem $\alpha$ -Tubulin in *BY-2* Zellen

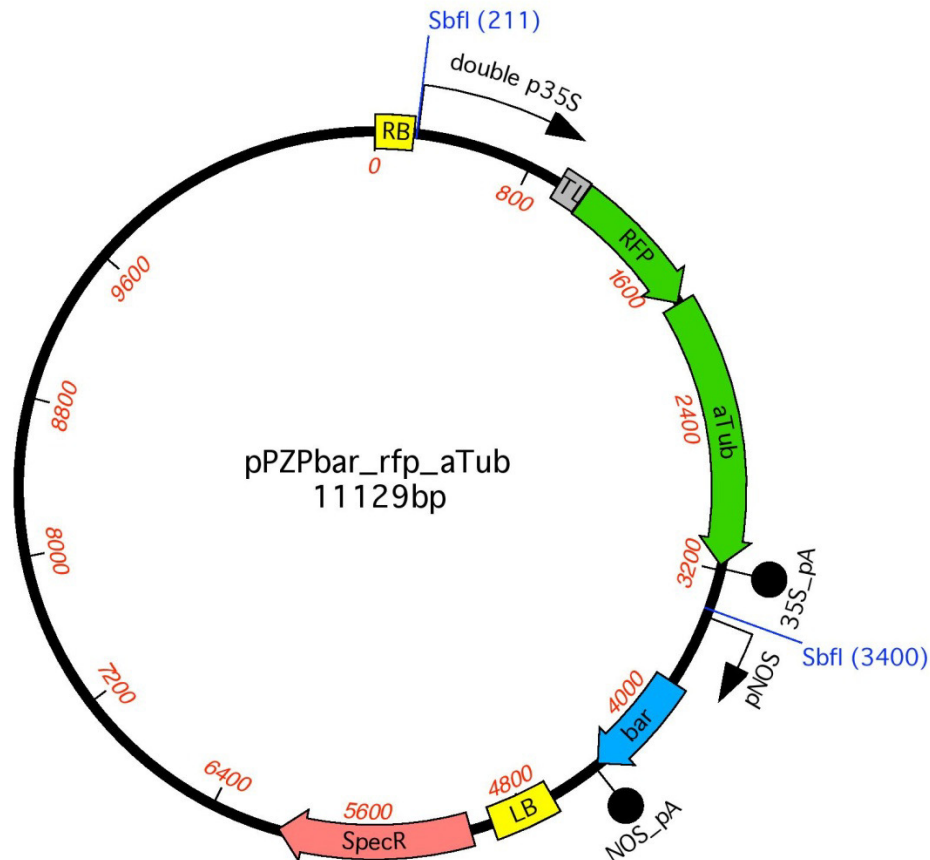
Für Co-Lokalisationsstudien sollte die RFP- mit der  $\alpha$ -Tubulin-CDS fusioniert und durch *A. tumefaciens* vermittelte Transfektion auf die Zelllinie *BY-2 pPZPnpt\_γ-Tub\_gfp* übertragen werden. Da die Zelllinie durch die erste Transfektion bereits über ein *nptII-Gen* verfügte, musste das Konstrukt, um doppeltransfizierte Zellen selektieren zu können, in den binären Vektor pPZPbar integriert werden. Hier ist das *bar-Gen*, das Resistenz gegen PPT vermittelt, zwischen den Bordersequenzen lokalisiert.

Die Herstellung des Fusionskonstruktes wurde als RF-Klonierung ausgeführt. Dazu wurde durch eine PCR mit Hilfe der Primer pCATgfp\_Lin\_fw und pCATrfp\_Lin\_rev ein lineares Amplifikat des Vektors pCATrfp generiert. Der Forward-Primer pCATgfp\_Lin\_fw bindet an die 18 Nukleotide *downstream* des RFP-Stopcodons. Der Reverse-Primer pCATrfp\_Lin\_rev bindet an die 21 Nukleotide *upstream* des RFP-Stopcodons. Durch die Wahl der Primer sollte im linearisierten Vektor das Stopcodon deletiert werden. Die  $\alpha$ -Tubulin-CDS wurde mit Hilfe der Primer aTub+RFP\_UH\_fw und aTub+UEH\_rev1

amplifiziert. Der Forward-Primer aTub+RFP\_UH\_fw bindet mit 18 Nukleotiden seines 3'-Endes an das 5'-Ende der  $\alpha$ -Tubulin-CDS inklusive des 6 bp langen Spacers *upstream* des Startcodons. Sein 5'-Ende fügt dem Amplifikat einen 18 bp Überhang an, dessen Sequenz der des 3'-Endes des linearisierten pCATrfp Vektors entspricht. Dieser sollte später als Überlappungsbereich für die RF-Klonierung dienen. Der Reverse-Primer aTub+UEH\_rev1 bindet mit seinem 3'-Ende an die letzten 24 Nukleotide der  $\alpha$ -Tubulin-CDS. Sein 5'-Ende fügt dem Amplifikat einen 15 bp Überhang an, dessen Sequenz der des 5'-Endes des linearisierten pCATrfp Vektors entspricht.

Nach Integration der  $\alpha$ -Tubulin-CDS in den Vektor wurde das resultierende Plasmid in *E. coli DH5 $\alpha$*  transferiert. Die korrekte Integration der  $\alpha$ -Tubulin-CDS in den Vektor wurde mittels PCR und Sequenzierung relevanter Bereiche überprüft (Ergebnisse nicht gezeigt). Der Vektor wird im Folgenden als pCATrfp\_ $\alpha$ -Tub bezeichnet.

Zur Integration in pPZPbar wurde das Fusionskonstrukt mittels der Restriktionsendonuklease FastDigest SbfI aus pCATrfp\_ $\alpha$ -Tub ausgeschnitten. Eine entsprechende Erkennungssequenz ist ebenfalls in der MCS von pPZPbar lokalisiert und wurde zur Linearisierung des Vektors verwendet. Die beiden Restriktionsfragmente wurden ligiert. Nach dem Transfer in *E. coli DH5 $\alpha$*  wurde die korrekte Integration des Konstruktes in den Vektor, mittels PCR und Sequenzierung relevanter Bereiche, überprüft (Ergebnisse nicht gezeigt). Der Vektor wird im Folgenden als pPZPbar\_rfp\_ $\alpha$ -Tub bezeichnet, eine schematische Darstellung ist Abbildung 3.20 zu entnehmen.



**Abbildung 3.20: Schematische Darstellung des Vektors pPZPbar\_rfp\_α-Tub.**

Dargestellt ist der Vektor pPZPbar mit dem integrierten Fusionskonstrukt aus RFP und α-Tubulin unter Kontrolle des doppelten 35S-Promotors. Außerdem ist zwischen den Bordersequenzen (RB und LB), zur Selektion transfizierter Pflanzenzellen, das Bialaphos-Resistenzgen (bar) lokalisiert. Darüber hinaus verfügt der Vektor, zur Selektion in Prokaryoten, über ein Spectinomycin-Resistenzgen (SpecR).

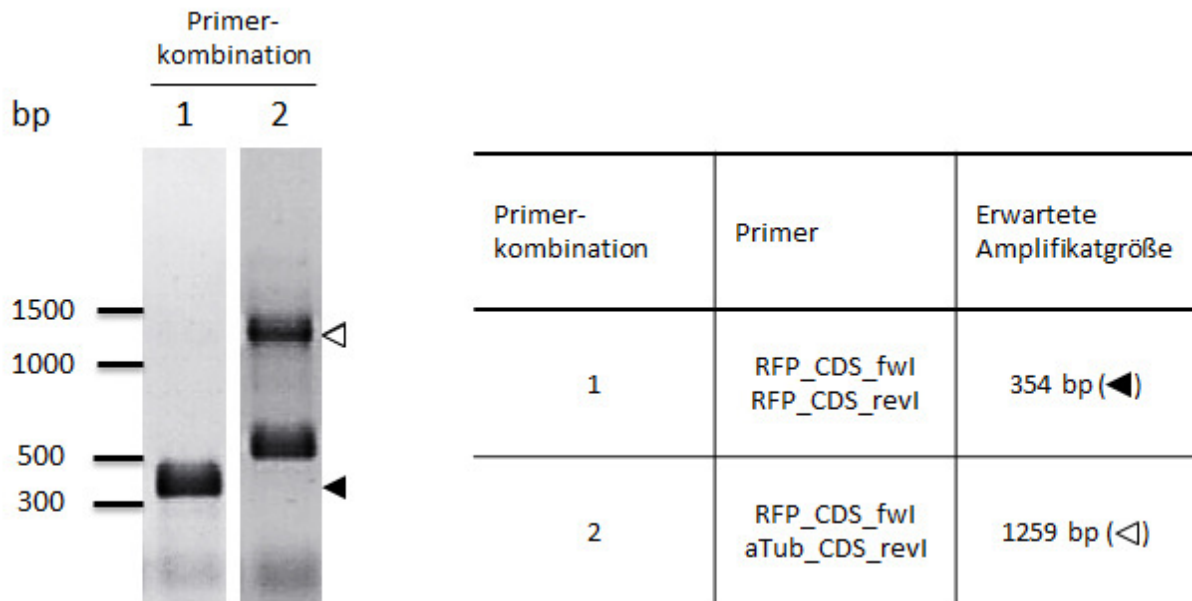
Der Vektor wurde in *A. tumefaciens* LBA4404 transferiert. Der entsprechende Bakterienstamm wird im Folgenden als LBA4404+pPZPbar\_rfp\_α-Tub bezeichnet.

Um zu überprüfen, ob durch das Konstrukt eine Überexpression von RFP-markiertem α-Tubulin möglich war, wurde es durch die beschriebene Methode zur *A. tumefaciens* vermittelten stabilen Transfektion zunächst auf native BY-2 Zellen übertragen. Gewachsene Kalli wurden ausgewählt und für eine dauerhafte Erhaltung einzeln auf frisches LS-Festmedium mit adäquaten Antibiotika überführt. Für eine detaillierte fluoreszenzmikroskopische Analyse wurden mehrere der transfizierten Zelllinien in LS-Flüssigmedium resuspendiert. Um ihre dauerhafte Verfügbarkeit zu gewährleisten, wurden die Resuspensionskulturen im wöchentlichen Turnus überimpft. Sie werden im Weiteren als BY-2 pPZPbar\_rfp\_α-Tub bezeichnet.

Bei der fluoreszenzmikroskopischen Begutachtung konnte in keiner der Resuspensionskulturen eine dem RFP zuzuordnende Fluoreszenz nachgewiesen werden. Der Versuch, das Konstrukt in *BY-2* Zellen zu transferieren, wurde mehrfach wiederholt. Bei parallel durchgeführten Transfektionsversuchen der Zellkulturen *BY-2* pPZPnpt\_γ-Tub\_gfp und *BY-2* pPZPnpt\_gfp\_γ-Tub mit *LBA4404*+pPZPbar\_rfp\_α-Tub war ebenfalls Kalluswachstum zu beobachten. Der Nachweis einer RFP-Fluoreszenz konnte aber auch hier nicht erbracht werden.

Die Überexpression eines chimären Proteins aus GFP und α-Tubulin in *BY-2* Zellen konnte bereits in vorangegangenen Versuchen gezeigt werden. Dabei wurde der binäre Vektor pPZPnpt verwendet. Um einen Einfluss des verwendeten Vektors auf den Transfektionserfolg ausschließen zu können, wurde das Fusionskonstrukt rfp\_α-Tubulin, wie für pPZPbar\_rfp\_α-Tub beschrieben, auch in pPZPnpt integriert. Die beschriebenen Transfektionsversuche wurden mit dem neu generierten Vektor pPZPnpt\_rfp\_α-Tub wiederholt. Auch hier konnte in keiner der transfizierten *BY-2* Zelllinien RFP-Fluoreszenz nachgewiesen werden.

Da in den mit *LBA4404*+pPZPbar\_rfp\_α-Tub transfizierten *BY-2* Zelllinien keine RFP-Fluoreszenz detektiert werden konnte, wurde die DNA mehrerer Zellsuspensionskulturen isoliert und mittels PCR analysiert. Exemplarisch werden hier die Ergebnisse für eine der untersuchten Kulturen vorgestellt. Zunächst wurde der Transfer des Fusionskonstruktes in die *BY-2* Zellen durch zwei unterschiedliche PCR-Ansätze überprüft. Im ersten Ansatz dienten RFP\_CDS\_fwl als Forward- und RFP\_CDS\_rev1 als Reverse-Primer. Sie binden an eine 354 bp lange Sequenz innerhalb der RFP-CDS. Bei einer gelelektrophoretischen Auftrennung konnte eine Bande im erwarteten Größenbereich detektiert werden (Abb. 3.21; Primerkombination 1). Im zweiten Ansatz dienten RFP\_CDS\_fwl als Forward- und aTub\_CDS\_rev1 als Reverse-Primer. Sie binden an eine 1259 bp lange Sequenz innerhalb des Fusionskonstruktes. RFP\_CDS\_fwl bindet an die RFP-Sequenz, aTub\_CDS\_rev1 an die α-Tubulin-CDS. Bei einer gelelektrophoretischen Auftrennung konnte eine Bande im erwarteten Größenbereich detektiert werden (Abb. 3.21; Primerkombination 2). Die auf Höhe der 500 bp Bande des DNA-Markers lokalisierte zusätzliche Bande war auf Fehlhybridisierungen der Primer zurückzuführen.

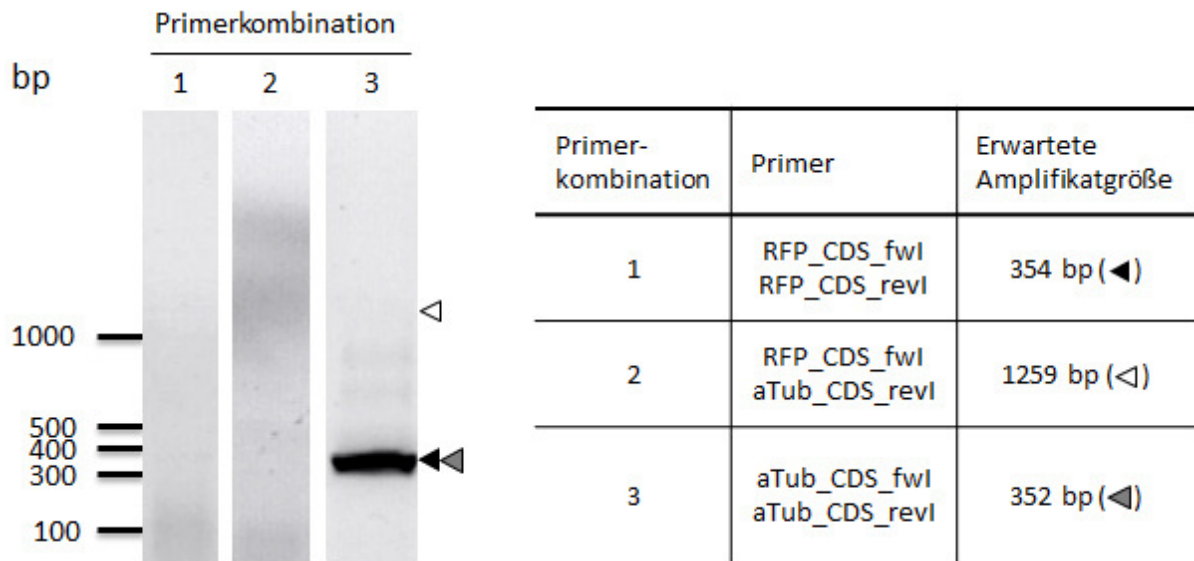


**Abbildung 3.21: Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Ansätze zur Verifizierung einer erfolgten Transfektion bei BY-2 pPZPbar\_rfp\_α-Tub.**

Als Template diente die DNA der entsprechenden Zelllinie. Die verwendeten Primerkombinationen und zu erwartenden Amplifikatgrößen sind nebenstehender Tabelle zu entnehmen.

Die Transkription des Fusionskonstruktes in der Zelllinie BY-2 pPZPbar\_rfp\_α-Tub sollte durch eine RNA-Isolation mit anschließender cDNA-Synthese und darauf folgender PCR-Analyse überprüft werden. Auch hier wurden in zwei verschiedenen Ansätzen die beiden oben vorgestellten Primerpaare eingesetzt. Bei gelelektrophoretischer Auftrennung beider Ansätze konnten keine Banden im erwarteten Größenbereich detektiert werden (Abb. 3.22; Primerkombination 1 und 2). Die Integrität der als Template verwendeten cDNA wurde durch eine weitere PCR überprüft. Hierfür wurden die Primer aTub\_CDS\_fw1 und aTub\_CDS\_rev1 verwendet. Beide binden innerhalb der α-Tubulin-CDS und generieren ein 352 bp langes Amplifikat. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung konnte eine Bande im erwarteten Größenbereich detektiert werden (Abb. 3.22; Primerkombination 3).





**Abbildung 3.22:** Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Ansätze zur Überprüfung der Transkription des Fusionskonstruktes in *BY-2 pZPbar\_rfp\_α-Tub*.

Als Template diente die cDNA der entsprechenden Zelllinie. Die verwendeten Primerkombinationen und zu erwartenden Amplifikatgrößen sind nebenstehender Tabelle zu entnehmen.

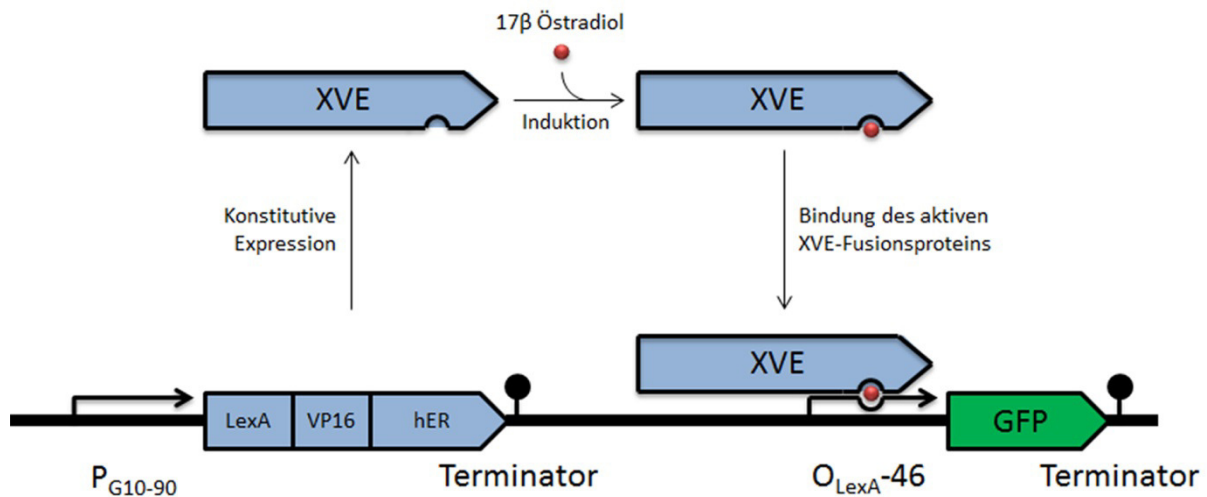
### 3.3 Versuche zur Reduzierung der Hintergrundfluoreszenz

In den Zelllinien *BY-2 pZPnpt\_γ-Tub\_gfp*, *BY-2 pZPnpt\_gfp\_γ-Tub* und *BY-2 pZPnpt\_gfp\_α-Tub* konnten Strukturen des Cytoskeletts fluoreszenzmikroskopisch beobachtet werden. In allen drei Fällen war die Dokumentation aufgrund einer starken Hintergrundfluoreszenz durch frei im Cytosol flotierende Fusionsproteine erschwert. Vor allem bei der Dokumentation des sehr feinen Netzwerks kortikaler Mikrotubuli, in der Zelllinie *BY-2 pZPnpt\_gfp\_α-Tub*, wurde dies deutlich. Zur Reduzierung der Hintergrundfluoreszenz und Verbesserung der Auflösung wurden die nachfolgenden Versuche durchgeführt.

#### 3.3.1 Verwendung eines induzierbaren Promotorsystems

Im Gegensatz zu konstitutiven Promotoren ist die Aktivität eines induzierbaren Promotors durch Zugabe eines Inducers regulierbar (Zuo und Chua, 2000; Gatz und Lenk, 1998). So wird beispielsweise das durch Zuo et al. (2000) entwickelte XVE-Promotorsystem durch Östradiol aktiviert. Das System besteht im Wesentlichen aus zwei Transkriptionseinheiten. Die erste ist das XVE-Fusionsgen unter Kontrolle des starken konstitutiven G 10-90-Promotors. Bei XVE handelt es sich um einen Transkriptionsaktivator. Das chimäre Protein besteht aus der DNA-Bindedomäne des bakteriellen LexA-Repressors, der Transaktivierungsdomäne VP16 und der regulatorischen Region des Östrogen-Rezeptors ER. Der Transkriptionsaktivator wird durch Binden des Inducers 17β-Östradiol aktiv. Der

Komplex bindet an den OLexA-46-Promotor der zweiten Transkriptionseinheit, aktiviert wiederum diesen und ermöglicht so die Transkription des unter seiner Kontrolle stehenden Zielgens (Zuo et al., 2000). In Abbildung 3.23 ist das Promotorsystem schematisch dargestellt.



**Abbildung 3.23: Schematische Darstellung des XVE-Promotorsystems.**

Dargestellt ist eine  $17\beta$ -Östradiol induzierte GFP-Expression. Verändert nach Zuo (2000) bzw. Ostertag (2012).

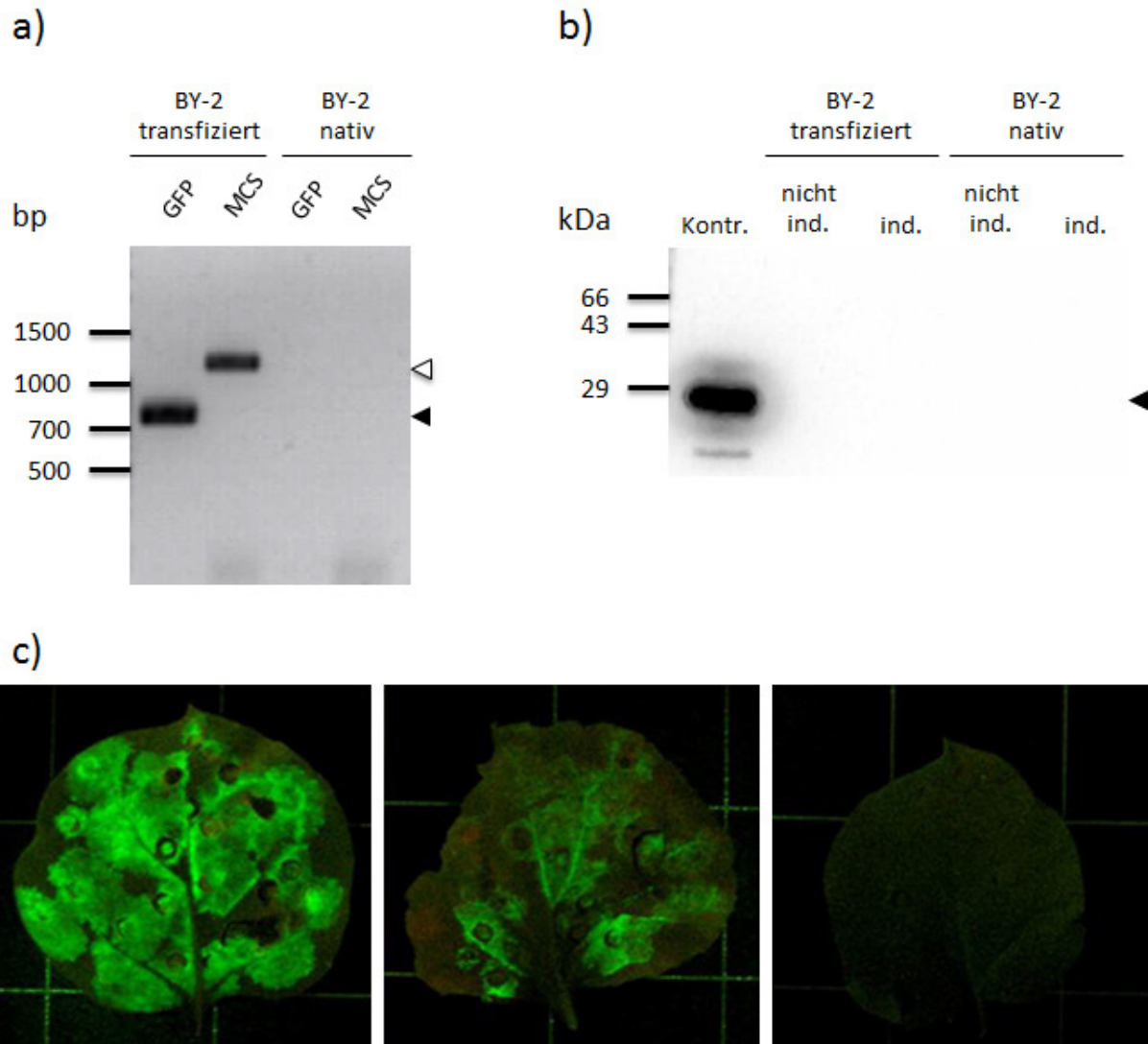
Zuo et al. (2000) zeigten bereits, dass das XVE-Promotorsystem auf unterschiedliche Inducerkonzentrationen unterschiedlich stark anspricht. Ab 8 nM Östradiol im Medium konnten sie eine Transkription des Zielgens nachweisen. Bei 0,2  $\mu$ M war eine zum 35S-Promotor vergleichbare Transkriptionsrate erreicht, Konzentrationen über 5  $\mu$ M konnten keine weitere Steigerung bewirken. Des Weiteren zeigten sie, dass bei einer Inducerkonzentration von 2  $\mu$ M bereits 30 min nach Induktion eine Transkription detektiert werden konnte. Nach 6 - 12 h war eine zum 35S-Promotor vergleichbare Transkriptionsrate erreicht, und nach 24 h war sie etwa 8mal höher. Daraus wurde geschlossen, dass die Expression eines Transgens, durch eine geeignete Östradiolkonzentration und Inkubationszeit, auf ein gewünschtes Level eingestellt werden kann.

Um zu überprüfen, ob bei Verwenden eines induzierbaren Promotorsystems, durch eine fein abgestimmte Induktion, die Hintergrundfluoreszenz reduziert und so eine Verbesserung der Dokumentierbarkeit erzielt werden kann, wurden Transfektionsversuche mit den *A. tumefaciens* Kulturen LBA4404 pMDC7\_GFP und C58C1 pMDC7\_GFP durchgeführt. Der Vektor pMDC7\_GFP verfügt über eine GFP-cDNA unter Kontrolle des XVE-Promotorsystems. Die Kulturen wurden durch Herrn Ostertag zur Verfügung gestellt. Er konnte damit im Laufe seiner Doktorarbeit Blätter von *Nicotiana benthamiana* erfolgreich transient transfizieren (Ostertag, 2012). Die vorgestellten Versuche wurden im Rahmen einer von mir betreuten Examensarbeit durchgeführt (Winter, 2012).

Mittels der beschriebenen Methode zur *A. tumefaciens* vermittelten stabilen Transfektion sollte das Konstrukt auf *BY-2* Zellen übertragen werden. Trotz vielfacher Wiederholungen des Versuchs konnte keine Zelllinie mit induzierbarer GFP-Expression etabliert werden. Nur in einem Versuch mit dem Stamm *C58C1* pMDC7\_GFP kam es zur Bildung eines einzelnen Kallus. Dieser wurde in LS-Flüssigmedium resuspendiert. Die resultierende Resuspensionskultur wird im Weiteren als *BY-2* pMDC7\_GFP bezeichnet. Die Integration der XVE-GFP-Sequenz in das Genom der *BY-2* Zellen wurde mittels PCR überprüft. Ein DNA-Isolat aus *BY-2* pMDC7\_GFP diente als Template. Es wurden zwei unterschiedliche Primerkombinationen eingesetzt. Bei GFP\_fw\_XhoI und GFP\_rev\_SpeI handelt es sich um GFP-spezifische Primer, die erwartete Produktgröße lag bei 744 bp. pMDC7\_fw\_MCS und pMDC7\_rev\_MCS flankieren die GFP-Sequenz, hier lag die zu erwartende Produktgröße bei 1107 bp. Parallel wurden jeweils Negativkontrollen, bei denen ein DNA-Isolat aus nativen *BY-2* Zellen als Template diente, angesetzt. In einer gelelektrophoretischen Auftrennung (Abb. 3.24a) konnte in den Ansätzen mit dem DNA-Isolat aus *BY-2* pMDC7\_GFP Amplifikate auf erwarteter Höhe nachgewiesen werden. In den Bahnen mit den Negativkontrollen waren keine Banden nachweisbar.

Anschließend wurden mit der Kultur *BY-2* pMDC7\_GFP Versuche zur Induktion der GFP-Expression mit unterschiedlichen 17 $\beta$ -Östradiol-Konzentrationen und Inkubationszeiten durchgeführt. Die Expression des GFP-Gens konnte in keinem der Ansätze fluoreszenzmikroskopisch nachgewiesen werden (Ergebnisse nicht gezeigt). Auch mittels immunochemischem Proteinnachweis, unter Verwendung des primären Antikörpers „Anti-GFP“ und des sekundären Antikörpers „Mouse IgG, HRP-linked whole Antibody“, war keine Expression nachweisbar (Abb. 3.24b). Die Proteinextraktion erfolgte in diesem Fall nach einer Inkubation mit 10  $\mu$ M 17 $\beta$ -Östradiol. Als Negativkontrolle diente ein Proteinextrakt der gleichen Kultur, ohne vorangegangene Induktion, sowie Extrakte aus auf gleiche Weise induzierten und nicht induzierten nativen *BY-2* Zellen. Als Positivkontrolle wurde ein Proteinextrakt aus *BY-2* pPZPnpt\_gfp verwendet. Das Molekulargewicht von GFP beträgt 26,77 kDa. Nur im Falle der Positivkontrolle war eine Bande sichtbar, das Signal konnte etwas unterhalb der 29 kDa Bande des Markers detektiert werden. Im Gegensatz dazu konnte in parallel durchgeführten transienten Transfektionen von *N. benthamiana* Blättern (nach Ostertag, 2012), mit den *A. tumefaciens* Kulturen *LBA4404* pMDC7\_GFP und *C58C1* pMDC7\_GFP, eine GFP-Expression induziert werden (Abb. 3.24c). Die Versuchspflanzen mit den infiltrierten Blättern wurden mit etwa 50 ml Hoagland-Nährmedium, das 5  $\mu$ M 17 $\beta$ -Östradiol enthielt, gegossen und für 4 d in einem Klimaraum inkubiert. Die Dokumentation der GFP-Fluoreszenz erfolgte über eine Digitalkamera unter Verwendung geeigneter Filter (Schott OG 530 und Schott VG 5). Das Anregungslicht wurde durch eine Schott-Glasfaserleuchte mit Blaufilter generiert. In Abbildung 3.24c ist deutlich zu erkennen, dass die fluoreszierenden Bereiche des Blattes, bei Infiltration mit *C58C1* pMDC7\_GFP, größer waren und intensiver leuchteten als bei Infiltration mit *LBA4404* pMDC7\_GFP. Hier ist anzumerken, dass die

Blätter gleichzeitig mit dem *A. tumefaciens* Stamm C58C1-p19 (durch Dr. M. Ostertag zur Verfügung gestellt) infiltriert wurden. Der binäre Vektor des Stammes trägt das Gen für das p19-Protein, dabei handelt es sich um einen *post-transcriptional gene silencing* (PTGS)-Suppressor. Die gleichzeitige Infiltration führt zu einer Verbesserung der Expressionsrate (mündliche Mitteilung Dr. M. Ostertag), deshalb ist ein direkter Vergleich zu den Versuchen einer stabilen Transfektion von *BY-2* Zellen nicht statthaft. Durch diesen Versuch sollte lediglich die Funktion und Qualität der eingesetzten *A. tumefaciens* Stämme überprüft werden. Als Negativkontrolle diente ein Blatt, das nur mit dem *A. tumefaciens* Stamm C58C1-p19 infiltriert wurde. Hier konnte keine Fluoreszenz beobachtet werden.



**Abbildung 3.24: Transfektionsversuche mit dem induzierbaren XVE-Promotorsystem.**

**a)** Gelelektrophoretische Auftrennung unterschiedlicher Amplifikate zur Verifizierung einer erfolgten Transfektion. Die erste Spur zeigt die Auftrennung der PCR-Produkte mit dem DNA-Isolat aus *BY-2* pMDC7\_GFP als Template und GFP\_fw\_XhoI und GFP\_rev\_SpeI als Primer (*BY-2* transfiziert GFP). Die zu erwartende Amplifikatgröße lag bei 744 bp (schwarze Markierung rechts). Die zweite Spur zeigt die Auftrennung der PCR-Produkte, mit pMDC7\_fw\_MCS und pMDC7\_rev\_MCS als Primer (*BY-2* transfiziert MCS). Die zu erwartende Amplifikatgröße lag bei 1107 bp (weiße Markierung rechts). Die dritte und vierte Spur zeigen die entsprechenden Negativkontrollen, mit einem DNA-Isolat aus nativen *BY-2* Zellen als Template (*BY-2* nativ GFP bzw. *BY-2* nativ MCS). Das Bild wurde invertiert. **b)** Immunochemischer Proteinnachweis unter Verwendung des primären Antikörpers „Anti-GFP“. Aufgetragen wurden Gesamtproteinextrakte aus folgenden Kulturen: *BY-2* pZPnpt\_gfp (Positivkontrolle; Kontr.); *BY-2* pMDC7\_GFP ohne vorangegangene Induktion (*BY-2* transfiziert nicht ind.); *BY-2* pMDC7\_GFP mit vorangegangener Induktion (*BY-2* transfiziert ind.); *BY-2* (nativ) ohne vorangegangene Induktion (*BY-2* nativ nicht ind.); *BY-2* (nativ) mit vorangegangener Induktion (*BY-2* nativ ind.). Das zu erwartende Molekulargewicht von GFP beträgt 26,77 kDa (Markierung rechts). Das Bild wurde invertiert. **c)** Überprüfung der verwendeten *A. tumefaciens* Kulturen. Blätter von *N. benthamiana* wurden, wie bei Ostertag (2012) beschrieben, transient transfiziert. Dabei wurden folgende *A. tumefaciens* Stämme eingesetzt: links *C58C1* pMDC7\_GFP/*C58C1*-p19, mitte *LBA4404* pMDC7\_GFP/*C58C1*-p19, rechts *C58C1*-p19 (Negativkontrolle). Im Gegensatz zu den stabil transfizierten *BY-2* Zellen war hier eine induzierbare GFP-Expression nachweisbar.

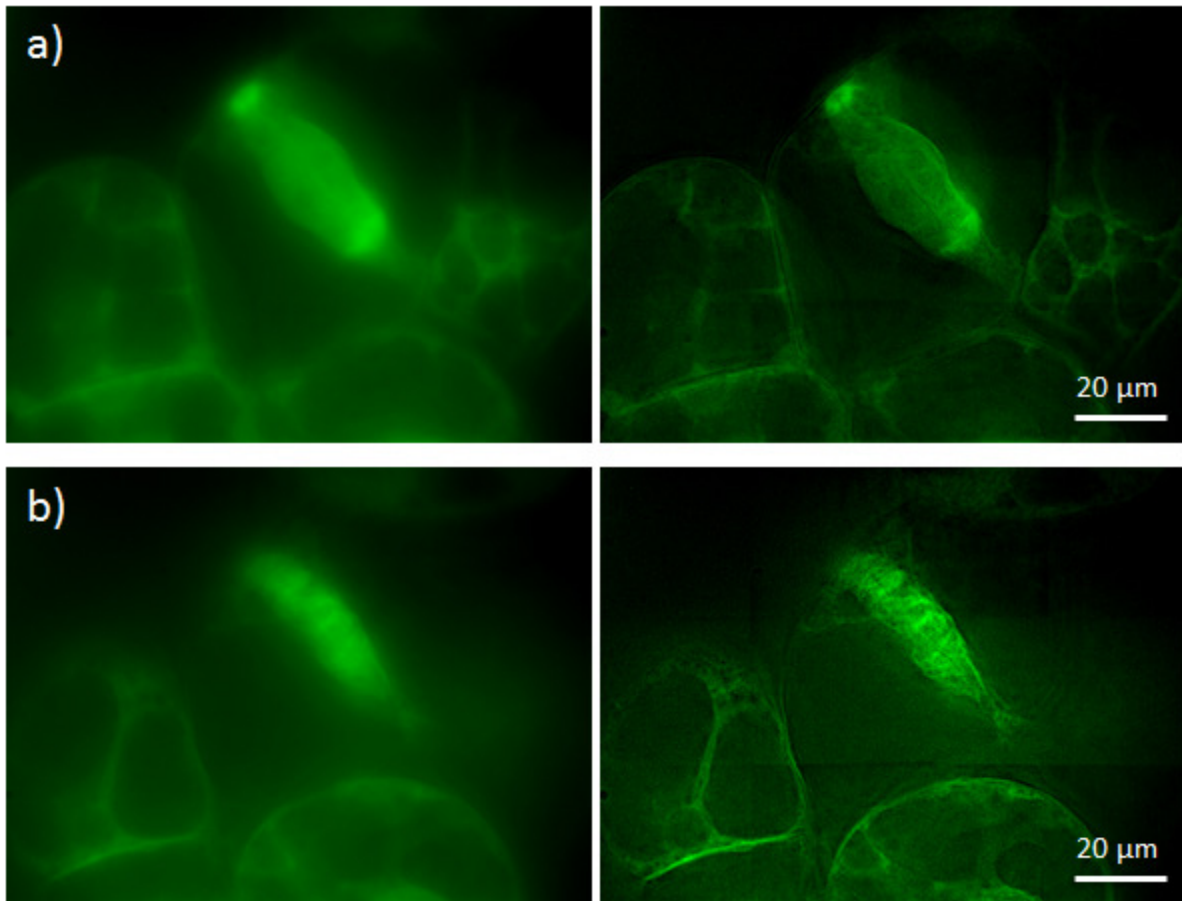
Das Fusionskonstrukt aus der GFP- und der  $\alpha$ -Tubulin-CDS wurde ebenfalls in das XVE-Promotorsystem des pMDC7 Vektors integriert. Aufgrund der vorgestellten Ergebnisse wurde allerdings von weiteren Versuchen mit der entsprechenden *A. tumefaciens* Kultur abgesehen.

### 3.3.2 Dekonvolutionsmikroskopie

Das bisher verwendete Mikroskopsystem diente zur groben Analyse der transgenen Zelllinien. Um eine bessere Auflösung der feinen Cytoskelettstrukturen, insbesondere des kortikalen Mikrotubulinetzwerkes, zu erreichen, sollten abschließend Untersuchungen mit einem alternativen mikroskopischen Verfahren durchgeführt werden. Die Dekonvolution ist eine Möglichkeit, systembedingte Unschärfe und Rauschen bei der Fluoreszenzmikroskopie zu verringern. Es handelt sich um eine digitale Bildbearbeitungstechnik zur Verbesserung des Kontrastes und der Auflösung (Davidson, 2008). Dabei werden Bildsequenzen eines Objektes entlang der Z-Achse, unter regelmäßiger Verschiebung der Fokusebene durch einen schrittmotorgesteuerten Kreuztisch, aufgenommen (Z-Stapel). Mit Hilfe mathematischer Algorithmen werden Signale, deren Ursprünge außerhalb der Fokusebene liegen (z.B. Streulicht), aus den digitalen Bildern eliminiert (Greb, 2013).

Die dekonvolutionsmikroskopischen Aufnahmen wurden in Zusammenarbeit mit der AG Wolfrum (Universität Mainz, Institut für Zoologie) bzw. der AG Kirkpatrick (Universitätsmedizin Mainz, Institut für Pathologie) durchgeführt. Untersucht wurden die Zelllinien *BY-2 pPZPnpt\_gfp\_ $\alpha$ -Tub* und *BY-2 pPZPnpt\_ $\gamma$ -Tub\_gfp*.

Auch hier konnten in der Zelllinie *BY-2 pPZPnpt\_gfp\_ $\alpha$ -Tub* Strukturen, an deren Aufbau Mikrotubuli beteiligt sind, dokumentiert werden. Als Beispiel zeigt Abbildung 3.25 die Aufnahme eines Phragmoplasten. Zum Vergleich wurden die Abbildungen vor und nach Anwendung des Dekonvolutionsalgorithmus gegenübergestellt. 3.25a zeigt den ringförmigen Phragmoplasten im Schnitt, die Fokusebene lag im Zentrum der Zelle, in 3.25b wurde auf seine Peripherie fokussiert. Der Bereich des Phragmoplasten, in dem die neue Zellplatte aufgebaut wird, war nach der Dekonvolution deutlicher als Spalt zu erkennen (Abb. 3.25a; rechts). Die Aufsicht zeigte aufgrund der hohen Dichte an Mikrotubuli eine sehr helle GFP-Fluoreszenz, hier waren nach der Dekonvolution faserförmige Strukturen zu erkennen (Abb. 3.25b; rechts). Im Allgemeinen wurde durch die Dekonvolution eine deutliche Abnahme der Hintergrundfluoreszenz erzielt.



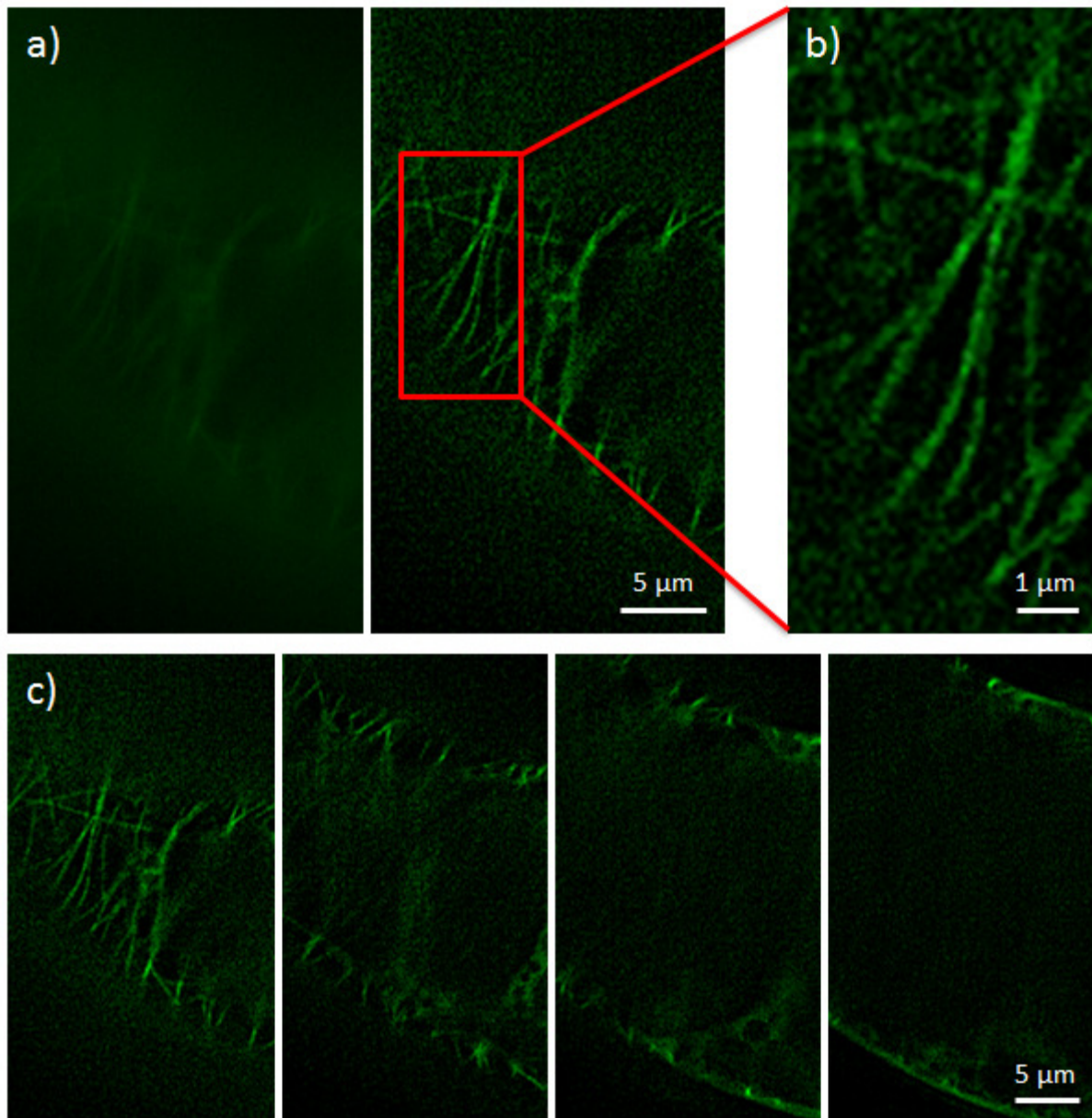
**Abbildung 3.25: Dekonvolutionsmikroskopische Aufnahmen der Zelllinie BY-2 pPZPnpt\_gfp\_α-Tub.**

Es wurden Aufnahmen vor (links) und nach (rechts) Anwendung des Dekonvolutionsalgorithmus gegenübergestellt. **a)** Aufnahme einer sich teilenden Zelle. Die Fokusebene lag im Zentrum des Phragmoplasten. **b)** Aufnahme derselben Zelle. Die Fokusebene lag in der Peripherie des Phragmoplasten.

Beim Mikroskopieren elongierter BY-2 pPZPnpt\_gfp\_α-Tub Zellen konnte eine Darstellung des kortikalen Mikrotubuli-Netzwerkes, durch Anwenden der Dekonvolution, deutlich verbessert werden. Auch hier wurden zum Vergleich Aufnahmen vor und nach Anwendung des Dekonvolutionsalgorithmus gegenübergestellt (Abb. 3.26a). Eine deutlich reduzierte Hintergrundfluoreszenz und verbesserte Auflösung der Mikrotubuli führten zu einer schärferen Darstellung der aufgenommenen Strukturen (Abb. 3.26a; rechts). Detaillierte Aufnahmen des Mikrotubuli-Netzwerkes wurden ermöglicht. So zeigt Abbildung 3.26b feine Y-förmige Verzweigungen, wie sie in zahlreichen Publikationen (z.B. Murata et al., 2005; Chan et al., 2009; Wasteneys und Ambrose, 2009) bereits beschrieben wurden. Durch die sequenzielle Analyse der einzelnen Bilder eines Z-Stapels war es außerdem möglich, die lokale Ausbreitung der untersuchten Strukturen in unterschiedlichen Regionen einer Zelle zu bestimmen. 3.26c zeigt exemplarisch eine Serie von 4 Bildern aus einem 138 Aufnahmen umfassenden Z-Stapel. Im Verlauf der Bildserie wurde die Fokusebene vom Zellcortex (Abb. 3.26c; links) in Richtung Zentrum der Zelle verschoben



(Abb. 3.26c; rechts). Hier ist deutlich zu erkennen, dass das beschriebene Netzwerk auf den Cortex beschränkt war.



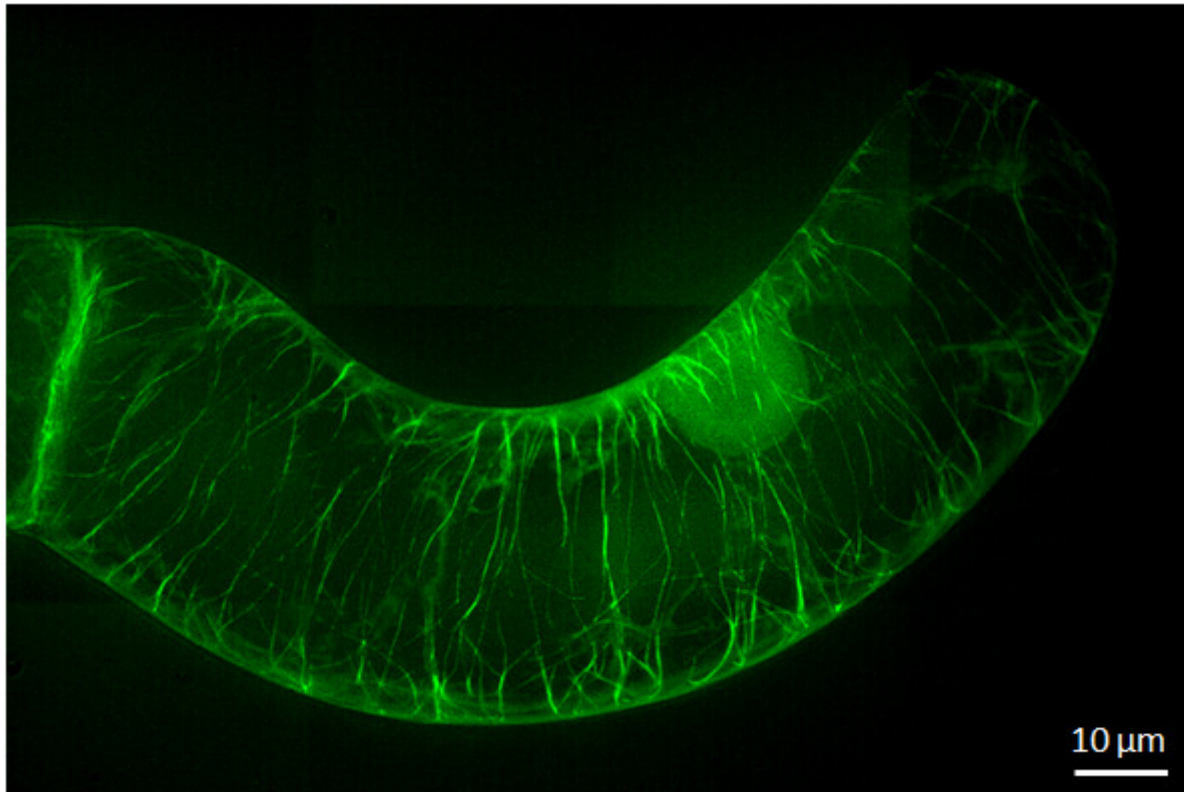
**Abbildung 3.26: Dekonvolutionsmikroskopische Aufnahmen des kortikalen Mikrotubuli-Netzwerkes einer elongierten Zelle der Zelllinie BY-2 pPZPnpt\_gfp\_α-Tub.**

**a)** Aufnahme vor (links) und nach (rechts) Anwendung des Dekonvolutionsalgorithmus. **b)** Detail Y-förmig verzweigter kortikaler Mikrotubuli. **c)** Aufnahmeserie unter Verschiebung der Fokusebene von der Peripherie in Richtung Zentrum der Zelle. Dargestellt sind 4 Sequenzen aus einem 138 Bilder umfassenden Z-Stapel.

Durch Projektion aller Aufnahmen eines Z-Stapels auf eine Ebene wurde eine dreidimensionale Darstellung ermöglicht (Abb. 3.27), die vor allem eine detaillierte Analyse der Orientierung der Mikrotubuli innerhalb des Cortex erlaubte. Die für sich longitudinal ausdehnende Zellen typische,



transversale Orientierung war deutlich zu erkennen (Paredes et al., 2006; Cyr, 2005; Wasteneys, 2002), aber auch Gabelungen und Verzweigungen waren deutlich zu beobachten. Hier soll wieder vor allem auf Y-förmigen Verzweigungen hingewiesen werden, bei denen scheinbar von einem dickeren Mikrotubuli-Bündel dünnere Fasern divergieren. Ein entsprechendes Beispiel wurde bereits in Abbildung 3.26b hervorgehoben.

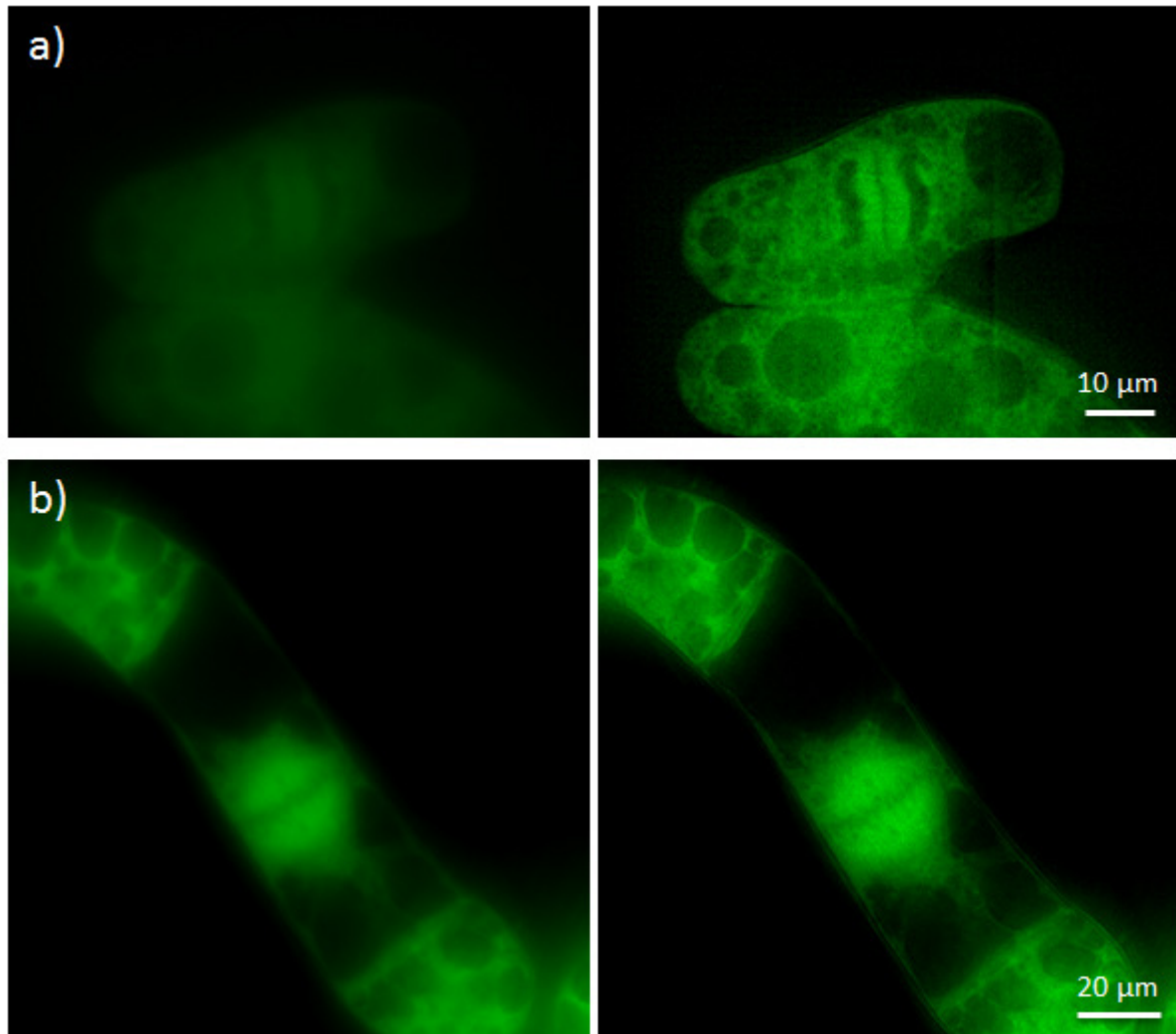


**Abbildung 3.27: Dreidimensionale Darstellung des cortikalen Mikrotubuli-Netzwerkes.**

Die Abbildung zeigt eine elongierte Zelle der Zelllinie *BY-2 pZPnpt\_gfp\_α-Tub*. Die Fokusebene wurde in 138 Schritten von der Peripherie in das Zentrum verschoben. Die 138 Aufnahmen der Zelle wurden nach Anwenden des Dekonvolutionsalgorithmus auf eine Ebene projiziert.

Beim Mikroskopieren der Zelllinie *BY-2 pZPnpt\_γ-Tub\_gfp* konnten ebenfalls Strukturen des Cytoskelettes, mit Hilfe der GFP-Fluoreszenz, identifiziert werden. Auch hier war eine Verbesserung der Aufnahmen, durch Anwenden der Dekonvolutionsfunktion, zu erzielen. Als Beispiel zeigt Abbildung 3.28 die Aufnahmen eines Phragmoplasten und einer mitotischen Spindel. Die Aufnahmen vor und nach Anwenden des Dekonvolutionsalgorithmus wurden gegenübergestellt. In Abbildung 3.28a lag die Fokusebene im Zentrum des Phragmoplasten. Der Bereich, in dem die neue Zellplatte aufgebaut wird, war nach der Dekonvolution deutlich als Spalt zu erkennen. Abbildung 3.28b zeigt eine mitotische Spindel, die Fokusebene lag im Zentrum der Zelle. Vor der Dekonvolution erschien

die Aufnahme verschwommen. Nach Anwendung des Algorithmus war die Abbildung schärfer, der faserige Charakter der Spindel war zu erkennen.



**Abbildung 3.28: Dekonvolutionsmikroskopische Aufnahmen der Zelllinie *BY-2 pPZPnpt\_γ-Tub\_gfp*.**

Es wurden Aufnahmen vor (links) und nach (rechts) Anwendung des Dekonvolutionsalgorithmus gegenübergestellt. **a)** Aufnahme eines Phragmoplasten, die Fokusebene lag im Zentrum der Zelle. **b)** Aufnahme einer mitotischen Spindel, die Fokusebene lag im Zentrum der Zelle.

Es sollte überprüft werden, ob im Cortex elongierter *BY-2 pPZPnpt\_γ-Tub\_gfp* Zellen fluoreszenzmikroskopisch GFP-markiertes  $\gamma$ -Tubulin nachzuweisen war. Bei der Untersuchung entsprechender Zellen war weder durch klassische Fluoreszenzmikroskopie noch durch Dekonvolutionsmikroskopie GFP-Fluoreszenz im kortikalen Mikrotubuli-Netzwerk zu detektieren (Ergebnisse nicht gezeigt).

## 4 Diskussion

### 4.1 Etablierung einer Methode zur Agrobakterien vermittelten stabilen Transfektion von *BY-2* Zellen

Vorrangiges Ziel der vorliegenden Arbeit war es, transgene Zellkulturen herzustellen, die FP-markierte Proteine des Cytoskeletts exprimieren. Dafür musste zunächst eine effiziente Transfektionsmethode entwickelt werden. In der AG gelang es zwar bereits *BY-2* Zellen stabil zu transfizieren (Scheel, 2008; Staufenbiel, 2009), die dabei verwendeten Protokolle waren jedoch noch nicht zuverlässig genug für die bevorstehenden Versuche und sollten deshalb weiter optimiert werden. Dabei wurde eine semiquantitative Ermittlung der Transfektionsraten als ausreichend erachtet.

Prinzipiell handelt es sich bei der vorgestellten Methode um eine Abwandlung der Methode nach An (1985). Dabei wurden Variablen, die in den Arbeiten von Scheel (2008) und Staufenbiel (2009) auftraten, experimentell überprüft und vereinheitlicht. Zudem wurden weitere Modifikationen auf Grundlage der Erkenntnisse anderer Arbeitsgruppen überprüft, gegebenenfalls angepasst und übernommen.

Die Art der Kultivierung der Agrobakterien wurde als eine der wesentlichen Ursachen für eine insuffiziente Transfektion identifiziert. Scheel (2008) und Staufenbiel (2009) berichteten, dass sie die *A. tumefaciens* Kulturen zur Erhaltung mehrfach auf Festmedium subkultivierten und für längere Perioden bei 8°C lagerten. Sullivan (1994) dagegen beschreibt die Verwendung einer *A. tumefaciens* Kultur, die frisch aus einer Dauerkultur angeimpft wurde. Bei Verwendung einer entsprechend frischen Kultur konnten gute Transfektionserfolge erzielt werden. Weiter konnte gezeigt werden, dass eine einmalige Subkultivierung mit anschließender Lagerung, bzw. bereits eine kurzfristige Lagerung von wenigen Tagen, eine deutlich schlechtere Transfektionsrate zur Folge hatte. Diese Auswirkungen sind wahrscheinlich auf Alterungsprozesse zurückzuführen, die in der vorliegenden Arbeit nicht näher bestimmt werden konnten.

Die Angaben bezüglich der eingesetzten Menge (bzw. Konzentration) an Agrobakterien variiert in unterschiedlichen Arbeiten (z.B. An, 1985; Sullivan, 1994; Yoshioka et al., 1996; Matsuoka, 2003; Nocarova und Fischer, 2009; Staufenbiel, 2009). Um einen möglichen Einfluss der Konzentration an Agrobakterien auf den Transfektionserfolg zu überprüfen, wurden parallel mehrere Co-Kulturen mit unterschiedlichen Volumina einer Agrobakterien-Suspension angesetzt. Da im überprüften Bereich

kein Unterschied in der Transfektionsrate festgestellt werden konnte, wurde bei weiteren Versuchen das von An (1985) vorgeschlagene Volumen eingesetzt.

In der Literatur gibt es unterschiedliche Angaben bezüglich des Alters der *BY-2* Zellkultur zum Zeitpunkt der Co-Kultivierung. So wird bei Abdel-Banat et al. (2008) der Einsatz frisch überimpfter *BY-2* Zellen empfohlen. Dagegen beschreibt An (1985) die höchste Transfektionsrate bei *BY-2* Zellen 3 d nach dem Subkultivieren während der exponentiellen Wachstumsphase. Auch in unserer AG wurde die Zeit des exponentiellen Wachstums der *BY-2* Zellen auf 3 - 4 d nach dem Subkultivieren bestimmt (Sippel, 2002). Zur Überprüfung, ob das Alter der eingesetzten *BY-2* Zellen Auswirkungen auf den Transfektionserfolg hat, wurden, wie bei Staufenbiel (2009), sowohl am selben Tag als auch 3 d zuvor subkultivierte *BY-2* Kulturen für Transfektionsversuche eingesetzt. In den beiden Ansätzen war kein deutlicher Unterschied in der Transfektionsrate feststellbar. In der Folge wurden aus praktischen Gründen 3 d alte Zellen verwendet, da sich herausstellte, wie später noch diskutiert wird, dass die nachfolgende Co-Kultivierung über 4 d am effizientesten war. So waren die Zellen zum Zeitpunkt der Selektion 7 d alt und befanden sich im standardisierten wöchentlichen Überimpfraster. Sowohl An (1985) als auch Rempel und Nelson (1995) bestimmten die höchste Transfektionsrate bei Tabakzellen, die sich in der Phase des höchsten exponentiellen Wachstums befanden. Beide gehen davon aus, dass die schnelle Teilungsrate in dieser Phase essenziell für eine effiziente Transfektion ist. An (1985) konnte keinen direkten Zusammenhang zwischen der Phase des höchsten exponentiellen Wachstums der *BY-2* Zellen und der Induktion der *Vir-Gene* bei *A. tumefaciens* feststellen. Rempel und Nelson (1995) dagegen beschreiben die schnelle Teilungsrate als wichtigen Faktor sowohl für die Induktion der *Vir-Gene* als auch für die Transfektion. In beiden Arbeiten wurde, im Gegensatz zur vorliegenden, kein Acetosyringon während der Transfektionsversuche eingesetzt. Heute ist jedoch bekannt, dass die phenolische Substanz einer der Stoffe ist, die *A. tumefaciens* chemotaktisch zu verletzten Pflanzengewebe locken (Ashby et al., 1988; Shaw et al., 1988; Shaw, 1991) und für die Aktivierung der *Vir-Gene* verantwortlich sind (Delmotte et al., 1991; Song et al., 1991; Winans, 1991). Sollte also ein Zusammenhang zwischen der schnellen Teilungsrate der *BY-2* Zellen und der Aktivierung der *Vir-Gene* bei *A. tumefaciens* bestehen, könnte dieser Effekt in unseren Versuchen durch die Acetosyringon vermittelte Präinduktion der *Vir-Gene* überdeckt worden sein. Hier sei anzumerken, dass Rempel und Nelson (1995) keine Verbesserung der Transfektionsrate durch Zugabe von Acetosyringon feststellen konnten. Dagegen wird sie in dem hier vorgestellten System als unerlässlich erachtet (siehe auch Eichler, 2009).

Unter natürlichen Bedingungen infiziert *A. tumefaciens* Pflanzen nur in verwundeten Bereichen (Stachel et al., 1985; Lee et al., 1995). Um zu überprüfen, ob mechanischer Stress so ausgeübt werden kann, dass es zu kleinen Läsionen aber nicht zum vollständigen Absterben der Zellkultur

kommt, wurden die *BY-2* Zellkulturen zunächst, wie bei Sullivan (1994) beschrieben, vor der Co-Kultivierung mehrfach pipettiert. Der Effekt beruht dabei auf den Scherkräften, die durch diese Behandlung auf die Zellen einwirken. Eine lichtmikroskopische Begutachtung offenbarte allerdings eine starke Schädigung nahezu aller Zellen der Kultur. Aus diesem Grund wurde die Anzahl der Pipettiervorgänge reduziert. Nach der Co-Kultivierung konnte, im Vergleich mit Ansätzen unpipettierter *BY-2* Zellen, eine Verdopplung der Transfektionsrate bestimmt werden. Obgleich eine kurze Ultraschallbehandlung der *BY-2* Zellen vor der Co-Kultivierung ebenfalls zu einer verbesserten Transfektionsrate führte, wurde die Pipettiermethode aus praktischen Gründen bevorzugt.

Auch beim Schütteln der Co-Kultur während der Inkubation kommt es, durch Reibung der *BY-2* Zellen am Gefäßboden, zur Ausübung von mechanischem Stress. Wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte, spielt dabei das verwendete Gesamtvolumen eine wesentliche Rolle. Durch den Einsatz eines geringeren Volumens waren bedeutend höhere Transfektionsraten zu erreichen. Dies ist wahrscheinlich darin begründet, dass in den vorgestellten Versuchen nur das Volumen der Co-Kultur, nicht aber die potentielle Reibungsfläche, also der Boden des Erlenmeyerkolbens, reduziert wurde. Es wird angenommen, dass infolgedessen verstärkt Reibung und damit Stress auf jede einzelne Zelle einwirkte.

Es konnte gezeigt werden, dass durch mechanisches Stressen der *BY-2* Zellen eine deutliche Steigerung der Transfektionsrate erzielt werden konnte. Die Auswirkungen sind offenbar auf die durch kleinere Verletzungen bedingte Ausschüttung von Phenolderivaten und Zucker zurückzuführen. Auch unter natürlichen Bedingungen wird *A. tumefaciens* durch die entsprechenden Stoffe chemotaktisch angezogen (Loake et al., 1988; Shaw et al., 1988; Shaw, 1991), und die *Vir-Gene* werden aktiviert (Bolton, 1986; Winans, 1991; Lee et al., 1995; McCullen und Binns, 2006). Da die *Vir-Gene* der Bakterien durch Zugabe von Acetosyringon in unseren Versuchen präinduziert wurden, spielt hier vermutlich die Chemotaxis eine größere Rolle. Bei der positiven Chemotaxis orientieren sich Bakterien an einem Gradienten hin zur Quelle des Lockstoffes (Munk, 2008; Stewart und Dahlquist, 1987), im Falle von *A. tumefaciens* also in Richtung eines verwundeten Pflanzengewebes (Shaw et al., 1988; Shaw, 1991). Da sich das zugegebene Acetosyringon aber theoretisch gleichmäßig über die gesamte Co-Kultur verteilt, entstehen entsprechende Gradienten nicht. Hierin liegt vermutlich auch einer der Gründe für die im Allgemeinen schlechteren Transfektionsraten bei Staufenbiel (2009). Sie arbeitete stets mit einem Co-Kulturvolumen von 25 ml und übte auch sonst keinen weiteren mechanischen Stress auf die *BY-2* Zellen aus. Auch sie setzte Acetosyringon zur Präinduktion der *Vir-Gene* ein. So waren diese zwar aktiv, aber der für eine effiziente Transfektion notwendige Gradient des chemotaktischen Reizes fehlte weitestgehend.

Der deutlich stärkere Effekt bei Verringerung des Co-Kulturvolumens gegenüber der Pipettiermethode ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass der Stress im Falle des verringerten Volumens über den gesamten Zeitraum der Co-Kultivierung ausgeübt wird und nicht nur auf die ursprünglich zur Co-Kultivierung eingesetzten Zellen. Dennoch ist anzumerken, dass durch eine Kombination beider Methoden die besten Ergebnisse erzielt werden konnten.

Als letzter Punkt wurde die Dauer der Co-Kultivierung angepasst. Hierzu wurde die Transfektionsrate in 10 parallel und unter gleichen Bedingungen angesetzten Co-Kulturen nach unterschiedlichen Inkubationszeiten bestimmt. Die Dauer der Co-Kultivierung wird bei An (1985) mit 48 h angegeben. Nach Ablauf der entsprechenden Zeit konnten in nur einer Kultur transgene Zellen beobachtet werden, nach 72 h bereits in drei. An den folgenden Tagen steigerte sich der Anteil an Kulturen, in denen transfizierte Zellen nachweisbar waren kontinuierlich. Eine Inkubationszeit von 96 h wurde als effizient erachtet. Hier wurden deutlich höhere Transfektionsraten als bei 48 stündiger Inkubation erreicht, gleichzeitig konnte noch kein schädliches Überwachsen der *BY-2* Zellen durch *A. tumefaciens* festgestellt werden. Der Nachweis, dass durch Verlängerung der Co-Kultivierung eine Steigerung der Transfektionsrate zu erzielen ist, wurde erbracht.

Unter Berücksichtigung der durch die vorgestellten Versuche gesammelten Erkenntnisse gelang eine Weiterentwicklung der bei Scheel (2008) und Staufenbiel (2009) beschriebenen Transfektionsmethode. In Versuchen mit einem einfachen Konstrukt aus der GFP-CDS und dem 35S-Promotorsystem waren stets transfizierte Zellen nachweisbar. Damit war das erarbeitete Protokoll wesentlich zuverlässiger als seine Vorgänger.

#### **4.2 Selektion transfizierter *BY-2* Zellen**

Auch bei der Selektion transfizierter *BY-2* Zellen wurden unterschiedliche Verfahren getestet (siehe auch Eichler, 2009). Im Laufe der vorliegenden Arbeit stellte sich heraus, dass die Selektion auf Festmedium bei der Herstellung stabil transfizierter Zelllinien am zuverlässigsten war. Diese Vorgehensweise wird auch in zahlreichen Veröffentlichungen beschrieben (An, 1985; Abdel-Banat et al., 2008; Nocarova und Fischer, 2009). Die dabei eingesetzten Antibiotikakonzentrationen wurden experimentell ermittelt. Die Bestimmung der optimalen Konzentration für eine Selektion mit Kanamycin ergab einen Wert von 12,5 mg/l. Dieser Wert weicht teilweise erheblich von den Angaben anderer Arbeitsgruppe ab, wo eingesetzte Konzentrationen von 50 mg/l (z.B. Nocarova und Fischer, 2009) bis 200 mg/l (Abdel-Banat et al., 2008) zu finden sind. In der vorliegenden Arbeit konnte bei Verwendung höherer Konzentrationen, die über 12,5 mg/l lagen, keine effizientere Selektion festgestellt werden. Bereits ab 100 mg/l war der Selektionsdruck auch für potenziell transfizierte

Zellen offenbar zu groß. Die deutlichen Unterschiede zwischen den Literaturwerten und der optimierten Antibiotikakonzentration sind möglicherweise mit einer überdurchschnittlichen Sensibilität der verwendeten *BY-2* Zelllinie gegenüber Kanamycin zu erklären (siehe auch Eichler, 2009). Im Gegensatz dazu konnte bei der Selektion mittels PPT die auch bei Mußmann et al. (2006) angegebene Konzentration von 3 mg/l bestätigt werden. Es ist allerdings anzumerken, dass in der genannten Publikation an Blattextplantaten von *Petunia hybrida* gearbeitet wurde. Aufgrund der Feststellung, dass die Selektion mittels Kanamycin effizienter war, wurden in der Folge alle Konstrukte, die zunächst für singuläre Transfektionen dienen sollten, in den Vektor pPZPnt integriert.

Nach erfolgter Transfektion sollte *A. tumefaciens* aus den Co-Kulturen eliminiert werden. Dies wurde ebenfalls durch den Einsatz eines Antibiotikums bewerkstelligt. Das zu den  $\beta$ -Lactam-Antibiotika zählende Cefotaxim wurde aufgrund seiner Wirkung gegen gramnegative Bakterien, bei gleichzeitig geringer Wirkung gegen Eukaryoten, ausgewählt. Auch hier wurde die verwendete Konzentration experimentell ermittelt (siehe auch Eichler, 2009). Es konnte gezeigt werden, dass das bei Yu et al. (2001) beschriebene Waschen der Co-Kultur eine effektivere Abtötung der Bakterien gewährleistete, was letztendlich auf die Verringerung der Bakterienkonzentration, vor Zugabe des Antibiotikums, zurückzuführen war. Des Weiteren wurde im Verlauf dieser Arbeit festgestellt, dass im Gegensatz zu den Angaben von Yu et al. (2001) eine höhere Konzentration des Antibiotikums von 450 mg/l, für mindestens noch zwei weitere Überimpfzyklen, wesentlich besser war.

Insgesamt gelang es somit, eine relativ zuverlässige Methode zur Transfektion und Selektion von *BY-2* Zellen zu etablieren. Dabei fiel auf, dass sich die gesammelten Erkenntnisse nicht immer mit Beobachtungen anderer Arbeitsgruppen deckten. So konnte An (1985) keine Verbesserung der Transfektionsrate durch mehrmaliges Pipettieren und somit mechanisches Stressen der *BY-2* Zellen feststellen. Dagegen wurden in der vorliegenden Arbeit gute Ergebnisse mit dieser Methode erzielt. Hier ist anzumerken, dass der Erfolg von Faktoren wie dem verwendeten Pipettentyp, der Pipettiergeschwindigkeit und der Anzahl der Wiederholungen abhängig war. Des Weiteren beschreiben Rempel und Nelsen (1995), die u. a. mit dem in dieser Arbeit überwiegend verwendeten *A. tumefaciens* Stamm LBA4404 arbeiteten, dass eine Präinduktion durch Acetosyringon keinen Einfluss auf die Transfektionsrate hat. Dagegen wird sie in dem hier vorgestellten System als unerlässlich erachtet. Außerdem soll noch einmal auf die großen Unterschiede bei der Selektion mittels Kanamycin hingewiesen werden. Die hier aufgeführten Beispiele lassen vermuten, dass sich die in verschiedenen Arbeitsgruppen kultivierten *BY-2* Zelllinien und *A. tumefaciens* Stämme, eventuell durch genetische Variation, teilweise unterscheiden. Deshalb wird an dieser Stelle angeraten, bestehende Protokolle stets an die verwendeten Kulturen anzupassen.

### 4.3 Visualisierung von Cytoskelettproteinen *in vivo*

Nachdem ein zuverlässiges System zur Transfektion und Selektion der *BY-2* Zellen entwickelt war, wurde mit den Versuchen zur Visualisierung von Cytoskelettproteinen *in vivo* begonnen. Während der Etablierung des Transfektionssystems konnte bereits bestätigt werden, dass die verwendete *BY-2* Zelllinie eine Überexpression des zur Verfügung stehenden GFP-Gens toleriert. Dabei konnten keine negativen Auswirkungen auf die Vitalität oder Entwicklung der Zellen festgestellt werden. Deshalb sollten zunächst Fusionskonstrukte mit besagtem GFP-Gen als Tag erstellt werden.

#### 4.3.1 Die Expression von GFP-markiertem $\gamma$ -Tubulin durch den 35S-Promotor

Zur Visualisierung von  $\gamma$ -Tubulin in lebenden *BY-2* Zellen sollte zunächst ein Fusionskonstrukt aus  $\gamma$ -Tubulin und GFP, unter Kontrolle des 35S-Promotors, kloniert und mittels der beschriebenen Transfektionsmethode in *BY-2* transferiert werden. Da befürchtet wurde, dass sich die Position des GFP-Tags, an einem der beiden  $\gamma$ -Tubulin-Enden, negativ auf die Funktion des chimären Proteins auswirken könnte, wurden zwei verschiedene Konstrukte kloniert. Dabei wurde die GFP-CDS an das 5'- bzw. 3'-Ende der  $\gamma$ -Tubulin-CDS angefügt.

In beiden resultierenden *BY-2* Zelllinien konnte eine dem GFP zuzuordnende Fluoreszenz nachgewiesen werden. Strukturen wie der Phragmoplast und die mitotische Spindel waren deutlich gefärbt. Das Wachstumsverhalten der Zelllinie *BY-2* pPZPnpt\_ $\gamma$ -Tub\_gfp (C-terminaler GFP-Tag) war mit dem einer nativen *BY-2* Kultur vergleichbar. Dagegen zeigte die Linie *BY-2* pPZPnpt\_gfp\_ $\gamma$ -Tub (N-terminaler GFP-Tag) ein etwas gehemmtes Wachstum. Wie Ostertag (2012) anhand seines  $\gamma$ -Tubulin-Strukturmodells zeigen konnte, ist im Bereich des C-Terminus der Aminosäureanteil mit Kontakt zur Proteinoberfläche erhöht. Aufgrund seiner, im Vergleich zum N-Terminus, exponierteren Lage sind bei einem C-terminalen Tag geringere sterische Einflüsse zu erwarten (Ostertag, 2012). Möglicherweise wirkte sich der N-terminale Tag negativ auf die korrekte Assemblierung des gTuRC aus und bewirkte so die schlechteren Wachstumseigenschaften. Deshalb wurde von weiteren Versuchen mit der Zelllinie *BY-2* pPZPnpt\_gfp\_ $\gamma$ -Tub abgesehen. Beide Linien wiesen eine starke Hintergrundfluoreszenz auf, was die Dokumentation feiner Strukturen erschwerte.

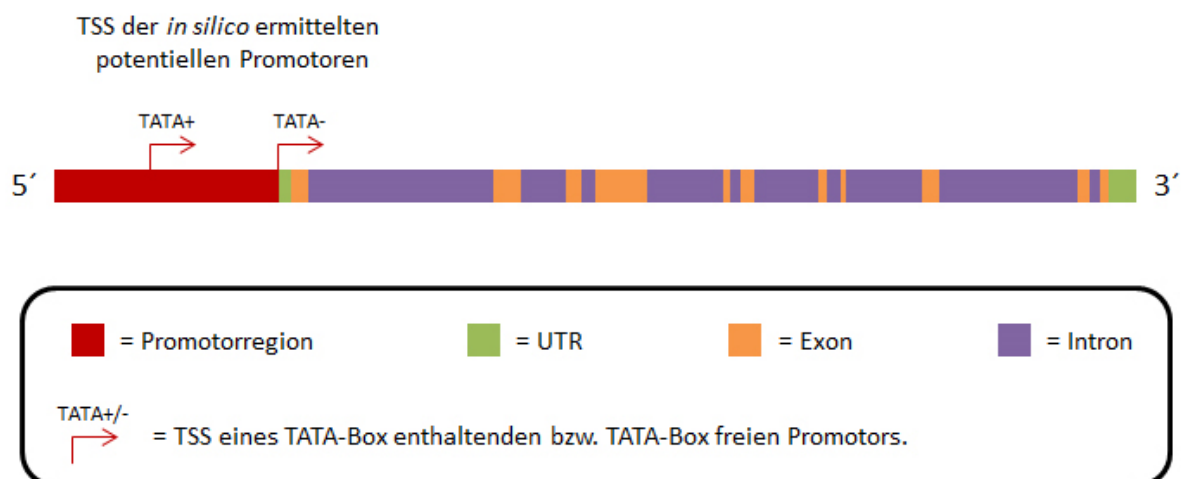
#### 4.3.2 Der endogene $\gamma$ -Tubulin-Promotor

Ein Versuch, die Hintergrundfluoreszenz zu verringern und dadurch die Dokumentation fluoreszierender Strukturen zu erleichtern, bestand darin, das  $\gamma$ -Tubulin-GFP-Fusionskonstrukt unter die Kontrolle des endogenen  $\gamma$ -Tubulin-Promotors zu stellen. Es wurde vermutet, dass durch die



Überexpression sehr viel freies, ubiquitär über das Cytosol verteiltes, Fusionsprotein vorlag, das die tatsächlichen Lokalisationsmuster überdeckte. Zudem könnten, durch ein entsprechendes Konstrukt, später weiterreichende Untersuchungen zu entwicklungsabhängigen, zeitlichen Expressionsmustern des  $\gamma$ -Tubulins angestellt werden. Um in späteren Versuchen möglichst viele Optionen bei der Entwicklung von Klonierungsstrategien zu gewährleisten, wurde darüber hinaus die bereits während der Diplomarbeit (Wolf, 2008) begonnene Sequenzierung der genomischen  $\gamma$ -Tubulin-Vollängensequenz aus *N. tabacum* BY-2 fertiggestellt.

Mittels IPCR und anschließender Sequenzierung durch Primer-Walking war es möglich, 1714 bp *upstream* der bekannten  $\gamma$ -Tubulin-Sequenz zu bestimmen. Die Lage im Genom, relativ zur codierenden  $\gamma$ -Tubulin-Sequenz, wurde durch mehrere PCR-Ansätze, unter Verwendung verschiedener Primer, überprüft und bestätigt. Mit Hilfe der pflanzenspezifischen Promotor-Vorhersage-Software TSSP (Softberry Inc., Mount Kisco, NY, USA) konnten in der ermittelten Sequenz zwei mögliche Promotoren identifiziert werden. Einer von beiden verfügt über eine TATA-Box (TATA+), der andere ist TATA-Box-frei (TATA-). Besonders der letztgenannte ist aufgrund seiner Lage hervorzuheben. Die durch das Programm vorhergesagte *transcription start site* (TSS) liegt in diesem Fall nur 7 bp *upstream* der durch Schröder et al. (2002) ermittelten 5'-UTR. Die Diskrepanz von nur wenigen bp ist möglicherweise auf die Sequenzierung von cDNA zurückzuführen, die aus im 5'-Bereich unvollständiger mRNA resultierte, ein bei der exakten Bestimmung der TSS bekanntes Problem (Kapranov, 2009). Eine schematische Darstellung der genomischen  $\gamma$ -Tubulin-Vollängensequenz inklusive der *in silico* identifizierten Promotoren zeigt Abbildung 4.1.



**Abbildung 4.1:** Schematische Darstellung des  $\gamma$ -Tubulin-Gens und der *in silico* vorhergesagten potentiellen Promotoren.

Mit Hilfe der Software TSSP konnte ein TATA-Box freier und ein über eine TATA-Box verfügender Promotor identifiziert werden. Ihre TSS liegen 7 bp (Promotor ohne TATA-Box) bzw. 987 bp (Promotor mit TATA-Box) *upstream* der durch Schröder et al. (2002) ermittelten 5'-UTR.

#### 4.3.2.1 Die Expression von GFP durch den $\gamma$ -Tubulin-Promotor

Für erste Versuche mit dem putativen  $\gamma$ -Tubulin-Promotor wurde zunächst ein einfaches Konstrukt aus der entsprechenden Sequenz und der CDS für das GFP hergestellt. Nach dem Transfer in *BY-2* Zellen konnte in mikroskopischen Untersuchungen erst durch lange Belichtungszeiten eine Fluoreszenz detektiert werden. Diese war allerdings nicht von einer unter diesen Umständen auch bei nativen Zellen beobachteten Autofluoreszenz zu unterscheiden, ein bei der fluoreszenzmikroskopischen Analyse von GFP in lebenden Pflanzenzellen bekanntes Phänomen (Billinton und Knight, 2001; Harter et al., 2012). Bei  $\gamma$ -Tubulin handelt es sich, unter natürlichen Bedingungen, um ein entwicklungsabhängig deutlich reguliertes Protein mit höheren Expressionsraten in mitotischen gegenüber postmitotischen Zellen (Schröder et al., 2002). Zudem ist die  $\gamma$ -Tubulin-Konzentration in den Zellen, im Verhältnis zu sogenannten Masseproteinen, relativ gering (Ostertag, 2012). Bei dem endogenen  $\gamma$ -Tubulin-Promotor muss es sich also um einen schwächeren, starker Regulation unterliegenden, Promotor handeln. Aufgrund dessen war die Konzentration des frei im Cytosol flotierenden GFP vermutlich so gering, dass eine Detektion mit dem verwendeten Mikroskopsystem nicht möglich war. Immunochemisch konnte die Expression des Proteins in der Zelllinie *BY-2* pPZPnpt\_ $\gamma$ -Tub-Prom\_gfp nachgewiesen werden. Die dabei detektierten Signale waren aber sehr schwach, was die erläuterten Vermutungen stützte. Diese Ergebnisse ließen den Schluss zu, dass die Expressionsrate des chimären Proteins, durch Verwendung des endogenen  $\gamma$ -Tubulin-Promotors, möglicherweise auf ein Maß gesenkt werden kann, bei dem keine störende Hintergrundfluoreszenz auftritt, aber das Fusionsprotein aufgrund seiner kompakten Anordnung in Cytoskelettstrukturen trotzdem fluoreszenzmikroskopisch nachzuweisen ist.

#### 4.3.2.2 Die Expression von GFP-markiertem $\gamma$ -Tubulin durch den $\gamma$ -Tubulin-Promotor

Aufgrund der im vorangehenden Abschnitt beschriebenen Erkenntnisse wurde ein Fusionskonstrukt aus  $\gamma$ -Tubulin und GFP, unter Kontrolle des  $\gamma$ -Tubulin-Promotors, in den Vektor pPZPnpt integriert und anschließend in *BY-2* Zellen transferiert. Auch hier waren bei fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen längere Belichtungszeiten erforderlich. Dabei konnten, neben der bereits beschriebenen Autofluoreszenz, markierte Cytoskelettstrukturen beobachtet werden. Diese waren durch die lokale Akkumulation des GFP deutlich von der mehr oder weniger über das Cytosol verteilten Eigenfluoreszenz zu unterscheiden. Eine entsprechende Region war z.B. der Plasmasaum um den Zellkern von Interphasezellen. Die Kernhülle von Pflanzenzellen wird in bestimmten Phasen dieses Stadiums häufig als Ursprung der Mikrotubuli-Nukleation beschrieben (Hasezawa et al., 1991; Lambert, 1993; Stoppin et al., 1994; Canaday et al., 2000; Rose et al. 2004). Da  $\gamma$ -Tubulin eine wesentliche Rolle in der Mikrotubuli-Nukleation spielt, ist die detektierte Fluoreszenz, zu diesem

Zeitpunkt des Zellzyklus, in dieser Region der Zelle ein Indiz für die Expression des Transgens und die korrekte Lokalisation des Genproduktes. Zudem konnten während der Zellteilung fluoreszierende Strukturen ober- und unterhalb der Teilungsebene beobachtet werden. In diesem Bereich ist  $\gamma$ -Tubulin zunächst am Aufbau der mitotischen Spindel (Liu et al., 1994; Joshi und Palevitz, 1996), später am Phragmoplast beteiligt (Liu et al., 1994; Joshi und Palevitz, 1996). Dagegen konnten in nativen *BY-2* Zellen keine vergleichbar fluoreszierenden Strukturen nachgewiesen werden. Auch diese Beobachtungen lassen auf eine transgensspezifische Fluoreszenz schließen. Diese Annahme unterstützend gelang außerdem der Nachweis einer Transkription des Fusionskonstruktes in der Zelllinie *BY-2 pPZPnpt\_γ-Tub-Prom\_γ-Tub\_gfp*.

Wie bei der Überexpression durch den 35S-Promotor wurde überprüft, ob die Position des GFP-Tags Auswirkungen auf die Fluoreszenzeigenschaften des chimären Proteins hat. Aber auch hier konnte durch Verwendung eines Konstruktes, bei dem die GFP-CDS an das 5'-Ende der  $\gamma$ -Tubulin-CDS kloniert wurde und das unter Kontrolle des  $\gamma$ -Tubulin-Promotors stand, keine Verbesserung der Detektion erzielt werden.

Eine weitere Begründung für die äußerst schwachen Signale könnte auch die sensible Regulation des  $\gamma$ -Tubulins durch die Zellen sein. Ostertag (2012) zeigte, dass bei dessen Überexpression sowohl die Transkriprate als auch die Proteinkonzentration einer deutlichen Gegenregulation unterliegen. Auch in Proteinextrakten der Zelllinie *BY-2 pPZPnpt\_γ-Tub\_gfp*, die das Fusionskonstrukt unter Kontrolle des 35S-Promotors exprimiert, konnten durch immunochemische Untersuchungen entsprechende Degradationsprodukte des chimären Proteins nachgewiesen werden (siehe dazu Taubmann, 2010). Bei einer durch den endogenen Promotor regulierten, ohnehin schwachen Expression des Fusionskonstruktes haben die beschriebenen posttranskriptionellen Regulationen offensichtlich deutlichere Auswirkungen als bei einer konstitutiven Überexpression durch den 35S-Promotor.

Es ist anzumerken, dass durch Verwendung des endogenen Promotors Strukturen, an deren Aufbau  $\gamma$ -Tubulin beteiligt ist, detektiert werden konnten. Die Hintergrundfluoreszenz hatte zwar einen deutlich geringeren Einfluss, dafür wurde die Dokumentation der untersuchten Strukturen durch die schwachen Signale und die beschriebene Eigenfluoreszenz sehr erschwert. Auch wenn das Problem der Dokumentierbarkeit auf diesem Weg nicht gelöst werden konnte, weist die vorgestellte Zelllinie dennoch Potential bezüglich der Studien zu zeitlichen Expressionsmustern auf. Um lange Belichtungszeiten und die daraus resultierende Detektion der Eigenfluoreszenz zu vermeiden, ist dabei die Verwendung eines sensibleren Mikroskopsystems dringend anzuraten.

### 4.3.3 Die Expression von GFP-markiertem $\alpha$ -Tubulin durch den 35S-Promotor

Um später das  $\gamma$ -Tubulin und die Mikrotubuli co-lokalisieren zu können, wurde ein weiteres Fusionsprotein benötigt. Hierfür wurde  $\alpha$ -Tubulin als Bestandteil der Heterodimere, aus denen ein Mikrotubulus aufgebaut ist, ausgewählt. Die Überexpression eines chimären Proteins aus  $\alpha$ -Tubulin und einem N-terminalen GFP-Tag gelang bereits Ueda et al. (1999) in *A. thaliana* und Kumagai et al. (2001) in einer *BY-2* Zelllinie. Auf Grundlage dieser Arbeiten sollte ein entsprechendes Konstrukt erstellt und in *BY-2* übertragen werden. Dabei wurde zunächst das bereits erfolgreich als Tag eingesetzte GFP verwendet. Um die Proteine in späteren Co-Lokalisationsstudien unterscheiden zu können, sollte der Tag, bei erfolgreicher Klonierung und Expression des Transgens in *BY-2*, durch ein vom GFP unterscheidbares FP ausgetauscht werden.

Bei der Sequenzierung der  $\alpha$ -Tubulin-cDNA unserer *BY-2* Zelllinie wurde festgestellt, dass sich diese durch zwei Substitutionen (Position 263, G→A bzw. 1210, C→T) von der bei Kumagai (2000; GenBank: AB052822.1) angegebenen Sequenz unterscheidet. Die Sequenzierung wurde wie in 3.2.6 beschrieben mehrfach mit stets den gleichen Ergebnissen wiederholt. Dies deutet darauf hin, dass es sich um genetische Variationen und nicht um Artefakte handelt. Wie bereits in 4.2 diskutiert wurde, verhalten sich unterschiedliche *BY-2* Zelllinien in verschiedensten Versuchen nicht immer gleich, was evtl. an genetischen Variabilitäten liegen könnte. Die hier vorgestellten Ergebnisse sind ein konkreter Fall einer solchen Variabilität. Ob und welche Auswirkungen sie hat, ist an dieser Stelle nicht zu ergründen. Es ist jedoch anzumerken, dass sie die Vitalität der Zellen offensichtlich nicht beeinflusst.

Nach erfolgreichem Transfer des Konstruktes in *BY-2* Zellen konnte die resultierende Zelllinie *BY-2* pPZPnpt\_gfp\_ $\alpha$ -Tub fluoreszenzmikroskopisch begutachtet werden. Auch hier konnten Strukturen, wie die mitotische Spindel oder der Phragmoplast, durch eine deutliche GFP-Fluoreszenz identifiziert werden. Die Dokumentation wurde wieder durch eine starke Hintergrundfluoreszenz erschwert. Trotzdem gelangen Aufnahmen des feinen kortikalen Mikrotubuli-Netzwerkes. Durch Bildserien, unter manueller Verschiebung der Fokusebene, konnte gezeigt werden, dass das Netzwerk auf den Cortex der Zellen beschränkt war. Aufgrund dieser Ergebnisse war davon auszugehen, dass das Fusionskonstrukt exprimiert und in Strukturen des Cytoskeletts eingebaut wurde.

### 4.3.4 Die Expression von RFP durch den 35S-Promotor

Es konnte gezeigt werden, dass die Expression eines GFP-markierten  $\alpha$ -Tubulins in der verwendeten *BY-2* Zelllinie möglich war. Deshalb sollte, wie bereits beschrieben, der GFP-Tag durch ein anderes FP ersetzt werden. Hierzu wurde TagRFP (Merzlyak et al., 2007) gewählt, ein laut Hersteller (Evrogen JSC, Moscow, Russia) sehr helles und für Fusionsproteine geeignetes FP. Die CDS der verwendeten

Version war an das *codon usage* von *Arabidopsis* angepasst. Bei TagRFP handelt es sich um eine Abwandlung des Wildtyp-RFP der Seeanemone *Entacmaea quadricolor* (Merzlyak et al., 2007). Da wir bis zu diesem Zeitpunkt nur Erfahrungen mit einer Variante des aus *Aequorea victoria* stammenden GFP hatten, musste zunächst überprüft werden, ob prinzipiell auch eine Expression von TagRFP in der zur Verfügung stehenden *BY-2* Zelllinie möglich war. Ein Konstrukt aus der TagRFP-CDS unter Kontrolle des 35S-Promotors wurde kloniert und via *Agrobacterium* in *BY-2* transferiert. Bei fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen konnte eine deutliche RFP-Fluoreszenz beobachtet werden, die analog zu freiem GFP ubiquitär über das Cytosol verteilt war. Somit wurde nachgewiesen, dass eine Überexpression von TagRFP in der zur Verfügung stehenden *BY-2* Zelllinie möglich war. Bevor weitere Klonierungen vorgenommen wurden, waren Untersuchungen zur parallelen Darstellung beider Fluoreszenzen auf einem Objektträger erforderlich. Dazu wurden die beiden Zellkulturen *BY-2* pPZPnpt\_gfp und *BY-2* pPZPnpt\_rfp 1:1 gemischt. Bei fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen, unter Verwendung des jeweiligen Anregungslichtes, zeigte sich, dass alle Zellen jeweils in einer Farbe fluoreszierten. In keiner der untersuchten Zellen trat Hintergrundfluoreszenz der anderen Farbe oder ähnliche bei einer Co-Lokalisation störende Effekte auf. Durch eine Überlagerung der Bilder *in silico* konnte gezeigt werden, dass eine parallele Darstellung beider Fluoreszenzen störungsfrei möglich war.

#### 4.3.5 Versuche zur Expression von RFP-markiertem $\alpha$ -Tubulin

Da TagRFP erfolgreich in *BY-2* überexprimiert werden konnte und gleiches bereits auch mit einem chimären Protein aus GFP und  $\alpha$ -Tubulin gelang, sollte ein Fusionskonstrukt aus RFP und  $\alpha$ -Tubulin erstellt werden. Da es für spätere Co-Lokalisationsstudien in die Zelllinie *BY-2* pPZPnpt\_y-Tub\_gfp transferiert werden sollte, musste für die Selektion ein anderes als das *nptII*-Gen gewählt werden. Deshalb erfolgte die Integration des Konstruktes in den binären Vektor pPZPbar. Dieser trägt das *bar*-Gen zwischen den Bordersequenzen, welches bei Pflanzen eine Resistenz gegen PPT vermittelt. Es sollte bei doppeltransfizierten Zellen als zweites Resistenzgen dienen. Eine erfolgreiche Selektion von *BY-2* Zellen, die mit der GFP-CDS unter Kontrolle des 35S-Promotors und dem *bar*-Gen co-transfiziert wurden, konnte bereits gezeigt werden (siehe 3.1.3).

Ein entsprechender Vektor pPZPbar\_rfp\_ $\alpha$ -Tub wurde kloniert und die korrekte Nukleotidsequenz relevanter Bereiche durch Sequenzierungen überprüft. Nach Transfer in *A. tumefaciens* LBA4404 wurden Transfektionsversuche an den Zelllinien *BY-2*, *BY-2* pPZPnpt\_y-Tub\_gfp und *BY-2* pPZPnpt\_gfp\_y-Tub vorgenommen. Bei allen drei Ansätzen konnte Kalluswachstum auf Selektionsmedium beobachtet werden. Eine RFP-spezifische Fluoreszenz war jedoch auch nach

Resuspension der Kalli in LS-Flüssigmedium mikroskopisch nicht zu bestimmen. Der Versuch, das Konstrukt in *BY-2* Zellen zu transferieren, wurde mehrfach mit stets dem beschriebenen Ausgang wiederholt.

Ein wesentlicher Unterschied zu den bereits erfolgreich transferierten und in *BY-2* überexprimierten Konstrukten ( $\gamma$ -Tubulin\_gfp, gfp\_ $\gamma$ -Tubulin, gfp\_ $\alpha$ -Tubulin) bestand im verwendeten Selektionsgen. Bis zu diesem Zeitpunkt wurden sämtliche, zur Transfektion eingesetzten Fusionskonstrukte in den Vektor pPZPnpt integriert. Binka et al. (2011) verglichen in Transfektionsversuchen an unterschiedlichen Getreiden die Resistenzgene *nptII* und *bar* unter der Kontrolle verschiedener Promotoren. Dabei zeigten sie, dass die Transfektionseffizienz sowohl von der verwendeten Selektionskassette (Promotor + Resistenzgen) als auch dem Vektor, in dem sie sich befand, beeinflusst wurde. Im Allgemeinen ermittelten sie höhere Transfektionsraten bei Verwendung des *nptII*-Gens. Darüber hinaus konnten sie in einigen ihrer Versuche mit dem *bar*-Gen überhaupt keine transgenen Pflanzen selektieren. Um einen Einfluss der verwendeten Selektionskassette auf den Transfektionserfolg zu überprüfen, wurde das Konstrukt auch in pPZPnpt integriert. Der resultierende Vektor pPZPnpt\_rfp\_ $\alpha$ -Tub wurde wiederum in *A. tumefaciens LBA4404* transferiert. Auch hier konnte bei Transfektionsversuchen an *BY-2* zwar Kalluswachstum, aber keine RFP-spezifische Fluoreszenz beobachtet werden. Der verwendete Vektor konnte also als Ursache für die ausbleibende Transgen-Expression ausgeschlossen werden.

Anschließend wurde die Integration des Fusionskonstruktes in das Genom der Zellkultur *BY-2* pPZPbar\_rfp\_ $\alpha$ -Tub mittels PCR überprüft. Durch die Verwendung zweier Primerpaare konnte entsprechendes bestätigt werden. Im Gegensatz dazu war durch RNA-Isolation, mit anschließender cDNA-Synthese und PCR-Analyse, keine Transkription des Fusionskonstruktes in der Zelllinie nachweisbar. Die Integrität der cDNA wurde dabei durch ein  $\alpha$ -Tubulin spezifisches Primerpaar gezeigt. Auch in diesem Fall könnten *gene silencing* Effekte für das Ausbleiben einer detektierbaren Transkription verantwortlich sein. Da die Überexpression eines Fusionsproteins aus GFP und  $\alpha$ -Tubulin wie auch die des TagRFP in *BY-2* Zellen darstellbar war, mussten die starken regulatorischen Effekte durch die Kombination des Fusionskonstruktes aus der TagRFP- und der  $\alpha$ -Tubulin-CDS bedingt sein. Die beiden als Tag verwendeten FP stammen ursprünglich aus unterschiedlichen Organismen. Da GFP in der vorliegenden Arbeit mehrfach mit Erfolg als Tag eingesetzt wurde, wird vermutet, dass die beschriebenen *gene silencing* Effekte, bei Verwendung eines GFP-Derivates einer anderen Farbe anstelle des TagRFP, schwächer ausgeprägt sein könnten. An dieser Stelle wird darauf hingewiesen, dass sämtliche *BY-2* Zelllinien, die ein Fusionskonstrukt aus GFP und einem Cytoskelettprotein exprimierten, eine schwächere Fluoreszenz zeigten als die Zelllinie *BY-2* pPZPnpt\_gfp. *Gene silencing* fand wohl auch hier statt, allerdings mit schwächerer Ausprägung

als bei Verwendung des TagRFP. Im Allgemeinen schien die Expression chimärer Proteine durch die *BY-2* Zellen strenger reguliert zu werden als die von Fluoreszenzproteinen ohne Fusionspartner. Dies könnte darin begründet sein, dass die Cytoskelettproteine endogene Proteine von *BY-2* sind und auch unter natürlichen Bedingungen der Regulation durch die Zellen unterliegen. Sollte *post-transcriptional gene silencing* (PTGS) der Grund für die ausbleibende Expression des Transgens in *BY-2* pPZPbar\_rfp\_α-Tub sein, könnte durch Co-Transfektion mit einem *gene silencing* Suppressor die Expressionsrate verbessert werden. Ostertag (2012) zeigte entsprechendes in Versuchen transienter Transfektion an Blättern von *Nicotiana benthamiana*, dabei verwendete er die CDS des PTGS-Suppressorproteins p19.

#### **4.3.6 Versuche zur Reduktion der Hintergrundfluoreszenz**

Da in den Zelllinien *BY-2* pPZPnpt\_γ-Tub\_gfp, *BY-2* pPZPnpt\_gfp\_γ-Tub und *BY-2* pPZPnpt\_gfp\_α-Tub Strukturen des Cytoskeletts beobachtet werden konnten, diese aber aufgrund der starken Hintergrundfluoreszenz schwierig zu dokumentieren waren, sollte eine alternative Methode ermittelt werden, die die Darstellung der entsprechenden Strukturen erleichtert. Wie bereits diskutiert, konnte die Hintergrundfluoreszenz bei der Expression eines Fusionskonstruktes aus γ-Tubulin und GFP, durch den Einsatz des endogenen γ-Tubulin-Promotors, deutlich reduziert werden. Allerdings wurde die Expressionsrate dadurch so weit herabgesetzt, dass die Signale der Strukturen nur durch sehr lange Belichtungszeiten, bei denen bereits Eigenfluoreszenz der Zellen auftrat, detektiert werden konnten. Die fluoreszenzmikroskopische Dokumentation wurde also *de facto* nicht verbessert.

##### **4.3.6.1 Ein induzierbarer Promotor zur Reduktion der Hintergrundfluoreszenz?**

Um eine adäquate Expressionsrate zu erreichen, die zwischen der des endogenen und der des 35S-Promotors lag, sollte das induzierbare und über die Konzentration bzw. Inkubationszeit des Inducers regulierbare XVE-Promotorsystem verwendet werden. Auch hier wurde mit einem einfachen Konstrukt zunächst überprüft, ob die induzierte Expression eines Zielgens, in der zur Verfügung stehenden *BY-2* Zelllinie, prinzipiell möglich war. Entsprechend wurde der binäre Vektor pMDC7\_GFP verwendet, der eine GFP-CDS unter Kontrolle des XVE-Promotorsystems trägt. Der Vektor lag bereits in den *A. tumefaciens* Stämmen *LBA4404* und *C58C1* vor, beide wurden durch Michael Ostertag zur Verfügung gestellt. Mit beiden Stämmen wurden Versuche zur Transfektion von *BY-2* Zellen durchgeführt. Trotz zahlreicher Wiederholungen konnte keine *BY-2* Zelllinie mit induzierbarer GFP-Expression etabliert werden. In einem Versuch mit dem Stamm *C58C1*

pMDC7\_GFP kam es zur Bildung eines einzelnen Kallus. Die Integration des Konstruktes in das Genom der Zelllinie *BY-2* pMDC7\_GFP wurde mittels PCR überprüft und bestätigt. Jedoch war keine induzierte GFP-Expression nachweisbar, weder fluoreszenzmikroskopisch noch durch einen immunochemischen Proteinnachweis unter Verwendung des primären Antikörpers „Anti-GFP“. Ostertag (2012) konnte mit beiden *A. tumefaciens* Kulturen Blätter von *N. benthamiana* transient transfizieren und die Expression von GFP induzieren. Um die Qualität und Funktion der zur Verfügung gestellten *A. tumefaciens* Kulturen zu testen, wurden diese Versuche, nach Anleitung von M. Ostertag, wiederholt. Mit beiden *A. tumefaciens* Kulturen gelang eine transiente Transfektion von *N. benthamiana* Blättern, in denen anschließend auch eine östradiolvermittelte GFP-Expression induziert werden konnte, was die Funktion des eingesetzten Konstruktes bestätigte. Die Tatsache, dass keine nachweisbare GFP-Expression in der Zelllinie *BY-2* pMDC7\_GFP induziert werden konnte, ist wahrscheinlich auch hier in *gene silencing* Effekten begründet. Da GFP unter Kontrolle des 35S-Promotors bereits in *BY-2* Zellen erfolgreich überexprimiert werden konnte, greifen die regulatorischen Mechanismen wahrscheinlich nicht direkt in die GFP-Expression ein. Wie bereits in 3.3.1 beschrieben, ist das Produkt der ersten Transkriptionseinheit des XVE-Systems essenziell für die induzierte Transkription des Zielgens. Unterliegt die Expression dieses XVE-Transkriptionsaktivators PTGS, wäre auch die GFP-Expression indirekt beeinflusst. Im Gegensatz zur stabilen Transfektion von *BY-2* Zellen wurden die Blätter bei der transienten Transfektion gleichzeitig mit dem *A. tumefaciens* Stamm *C58C1*-p19 infiziert. Dieser überträgt die CDS für das p19-Protein, ein PTGS-Suppressor, auf die transfizierten Pflanzenzellen. In diesem Fall ist die gleichzeitige Transfektion mit *C58C1* zwar nicht zwingend erforderlich, verbessert aber die Transkriptionsrate wesentlich (mündliche Mitteilung M. Ostertag). Dies ist ein weiteres Indiz dafür, dass PTGS einen Einfluss auf die Expression des Zielgens hat. Das völlige Ausbleiben einer zu detektierenden GFP-Expression in den stabil transfizierten *BY-2* Zellen ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass sich die beschriebenen Effekte in diesem Fall noch drastischer als bei transient transfizierten Tabakblättern auswirken. Es wird vermutet, dass ein ähnlich starker PTGS Effekt, in der Zelllinie *BY-2* pPZPbar\_rfp\_α-Tub, für die Unterdrückung der Transgenexpression verantwortlich ist. Aufgrund der äußerst geringen Transfektionsrate und der Tatsache, dass die einzige nachweislich transfizierte Zelllinie keine induzierbare Expression des Zielgens zeigte, wurde eine effizientere Lösung für das Problem angestrebt.

#### 4.3.6.2 Ausblenden der Hintergrundfluoreszenz durch Dekonvolutionsmikroskopie

Bis zu dieser Phase war es ausreichend, ein Standard-Fluoreszenzmikroskop für die Analyse der transgenen Zelllinien zu verwenden. Die korrekte Lokalisation der chimären Proteine konnte



zweifelsfrei gezeigt werden. Bei der Dokumentation feinerer Bereiche der Cytoskelettstrukturen offenbarten sich jedoch die Grenzen bezüglich der Auflösung des eingesetzten Systems. Diese konnten, wie bereits beschrieben, auch nicht durch das *genetic engineering* überwunden werden. Deshalb sollte verifiziert werden, ob mittels einer alternativen Technik der Fluoreszenzmikroskopie bessere Ergebnisse zu erzielen waren. Hier standen zwei Methoden zur Auswahl, die Dekonvolutionsmikroskopie und die Konvokale Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM). Aufgrund einer schnelleren Durchführbarkeit und der Bestätigung, dass im vorliegenden Fall keine wesentlich besseren Ergebnisse durch CLSM zu erwarten wären (mündliche Mitteilung Dr. C. Freese), wurde die Dekonvolutionsmikroskopie bevorzugt. Durch die Verwendung von Dekonvolutions-Software bei der Bearbeitung von Bildern der digitalen Fluoreszenzmikroskopie wird eine Steigerung des Signal-Rausch-Verhältnisses ermöglicht (Biggs, 2004). Voraussetzung ist der Einsatz spezieller Mikroskope, die die Aufnahme von Bildserien entlang der Z-Achse eines Objektes unter regelmäßiger Verschiebung der Fokusebene ermöglichen. Entsprechende computergestützte Mikroskopsysteme wurden dankenswerterweise durch die AG Wolfrum bzw. die AG Kirkpatrick zur Verfügung gestellt.

Es erfolgten mikroskopische Untersuchungen der Zelllinien *BY-2 pPZNpt\_gfp\_α-Tub* und *BY-2 pPZNpt\_γ-Tub\_gfp*. Dabei zeigte sich, dass die Hintergrundfluoreszenz in beiden Fällen, durch Anwendung des Dekonvolutionsalgorithmus, reduziert wurde. Außerdem konnten Strukturen wie mitotische Spindel und Phragmoplast in beiden Zelllinien schärfer und kontrastreicher dargestellt werden. So war z.B. der Spalt zwischen dem Doppelring der Phragmoplasten deutlich als solcher zu erkennen (Abb. 3.25a bzw. 3.28a). Bei Aufsicht zeigte sich sogar die durch den Aufbau aus Mikrotubuli bedingte faserige Struktur (Abb. 3.25b). Ähnliches war auch bei der Darstellung einer mitotischen Spindel der Zelllinie *BY-2 pPZNpt\_γ-Tub\_gfp* zu beobachten (Abb. 3.28b). Auch hier wurde durch die verbesserte Auflösung die faserige Natur deutlicher sichtbar.

Im Falle elongierter *BY-2 pPZNpt\_gfp\_α-Tub* Zellen wurde eine detailreiche Darstellung des kortikalen Mikrotubuli-Netzwerkes ermöglicht. So waren beispielsweise, in der Literatur häufig erwähnte, Y-förmige Verzweigungen zu dokumentieren (Abb. 3.26a und b). Ob es sich hierbei um Bündelungsphänomene in Form von *zippering* (Dixit und Cyr, 2004; Pastuglia und Bouchez, 2007; Ehrhardt, 2008) oder um Mikrotubuli abhängige Mikrotubuli-Nukleation handelt (Murata et al., 2005; Chan et al., 2009), ist anhand der Aufnahmen nicht mit Sicherheit zu bestimmen. Die Tatsache, dass solch feine Strukturen des Cytoskeletts darstellbar waren, eröffnet jedoch ein breites Spektrum an Möglichkeiten für zukünftige fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen. Beispielsweise könnte durch Zeitrafferaufnahmen das dynamische Verhalten des kortikalen Netzwerkes beobachtet werden. Hier wäre die Co-Expression eines FP-markierten Mikrotubuli-Plus-Ende bindenden Proteins von Vorteil (Siehe z.B. Mathur et al., 2003 oder Dixit et al., 2006). Dabei könnten z.B. auch

weiterreichende Untersuchungen bezüglich der beschriebenen Verzweigungen angestellt werden. Durch die Aufnahme von Bildserien unter Verschiebung der Fokusebene konnte die Lage der Mikrotubuli innerhalb der Zelle gezeigt werden. Dabei war deutlich zu erkennen, dass es sich um cortikale Mikrotubuli handelt (Abb. 3.26c). Durch eine Projektion aller Aufnahmen eines Z-Stapels auf eine Ebene konnte die Orientierung der Mikrotubuli noch besser analysiert werden. Im gezeigten Beispiel (Abb. 3.27) ist eine transversale Orientierung deutlich zu erkennen. Diese ist typisch für Zellen, die sich im Streckungswachstum befinden (Lloyd, 1994; Dixit und Cyr, 2004).

Die vorgestellten Ergebnisse zeigen, dass durch die Dekonvolutionsmikroskopie detailliertere Darstellungen der Mikrotubuli möglich waren. Dies gilt im Besonderen für das cortikale Netzwerk. Es bleibt anzumerken, dass beim Mikroskopieren elongierter *BY-2 pZPNpt\_γ-Tub\_gfp* Zellen keine Fluoreszenz im Cortex nachgewiesen werden konnte. Die in der Literatur beschriebenen Ergebnisse, bezüglich der Verteilung des  $\gamma$ -Tubulins innerhalb des cortikalen Mikrotubuli-Netzwerkes, basieren in der Regel auf immunfluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen (z.B. Liu et al., 1993; Murata et al., 2005). Dabei wird meist eine indirekte Immunfluoreszenzfärbung, also ein System aus zwei Antikörpern, verwendet. Der primäre Antikörper bindet an das Antigen (in diesem Fall  $\gamma$ -Tubulin) und mehrere sekundäre Antikörper, die mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert sind, binden an den primären Antikörper. Auf diese Weise kommt es zu einer Signalverstärkung. Trotzdem sind die mit den cortikalen Mikrotubuli assoziierten  $\gamma$ -Tubulin-Signale bei Murata et al. (2005) schwach. Da es im Falle einer GFP-Markierung zu keiner vergleichbaren Signalverstärkung kommt, ist anzunehmen, dass die Signale, falls vorhanden, noch wesentlich schwächer sind. Eventuell war das Detektionssystem (Kamera) nicht empfindlich genug für entsprechend schwache Signale. Der Einsatz einer modernen, lichtsensitiveren Mikroskopkamera (z.B. AxioCam HRm, Zeiss) könnte den Nachweis schwacher Fluoreszenz verbessern. Denkbar wäre außerdem die Verwendung eines alternativen Mikroskopsystems, wie z.B. ein Laser-Scanning-Mikroskop (LSM). Gerade in Bezug auf die Sensitivität wurden hier in den letzten Jahren deutliche Fortschritte erzielt (z.B. LSM 780, Zeiss). Durch neue Methoden der Nanoskopie, wie etwa die Spectrale Präzisionsdistanzmikroskopie (SPDM), ist es bereits möglich, einzelne fluoreszenzmarkierte Moleküle in ganzen Zellen mit einer effektiven optischen Auflösung im 10 nm-Bereich zu vermessen (Cremer, 2009). Weitere fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen mit einem sensitiveren System sind an dieser Stelle dringend zu empfehlen.

## 5 Zusammenfassung

Bei den Pflanzen sind viele Fragen bezüglich der Organisation und Regulation des bei der Zellteilung und –differenzierung wichtigen Auf-, Ab- und Umbaus des Mikrotubuli-Netzwerkes noch immer offen, insbesondere was die Rolle des  $\gamma$ -Tubulins betrifft. Ziel der vorliegenden Arbeit war die Etablierung von *BY-2* Modell-Zelllinien (*Nicotiana*), die verschiedene mit fluoreszierenden Proteinen (FP) markierte Elemente des Cytoskeletts exprimieren, um eine fluoreszenzmikroskopische Detektion *in vivo* zu ermöglichen.

Zunächst musste eine zuverlässige Methode zur *A. tumefaciens* vermittelten stabilen Transfektion von *BY-2* Zellen etabliert werden. Dabei wurden in der Arbeitsgruppe verwendete und auf einer grundlegenden Publikation basierende Protokolle vereinheitlicht und weiterentwickelt. Durch die vorgenommenen Anpassungen konnte eine effizientere Methode erarbeitet werden, die Grundlage für alle weiteren Versuche war.

Für das vorrangige Ziel der Arbeit, die Expression von FP-markierten Cytoskelettproteinen in *BY-2* Zellen, wurden entsprechende Fusionskonstrukte kloniert und via *A. tumefaciens* in *BY-2* Zellen transferiert. So gelang zunächst die Herstellung transgener Zelllinien, die GFP-markiertes  $\alpha$ - bzw.  $\gamma$ -Tubulin exprimierten. Diese sollten später als Basis für die Untersuchung des dynamischen Mikrotubuli-Netzwerkes bzw. dessen Regulation dienen. In beiden Zelllinien standen die Konstrukte zunächst unter Kontrolle eines doppelten 35S-Promotors, was zu einer starken Expression der Transgene führte. Fluoreszenzmikroskopisch konnten Strukturen, an deren Aufbau Mikrotubuli beteiligt sind, detektiert werden. Aufgrund einer starken Hintergrundfluoreszenz war die Darstellung feinerer Bereiche, wie sie im Cytoskelett häufig auftreten, jedoch äußerst schwierig. Dies war vermutlich ein Resultat aus der starken Überexpression der Transgene durch den 35S-Promotor. Deshalb wurde eine schwächere bzw. adäquate Expressionsrate angestrebt.

Versuche mit einem durch Östradiol dosiert induzierbaren Promotorsystem (XVE) wurden durchgeführt. In der Arbeitsgruppe konnten mit diesem System bereits Blätter einer anderen *Nicotiana* Spezies zumindest transient transfiziert werden. Trotz dieser vielversprechenden Erfolge war in stabil transfizierten *BY-2* Zellen die induzierte Expression allein von GFP schon nicht darstellbar. Da bereits gezeigt wurde, dass die verwendete *BY-2* Kultur eine Überexpression von GFP toleriert, wurde möglicherweise das XVE-System selbst durch *gene silencing* inaktiviert.

Adäquate Expressionsraten sollten vor allem durch den endogenen  $\gamma$ -Tubulin-Promotor ermöglicht werden. Da die entsprechende Sequenz noch unbekannt war, musste sie zunächst bestimmt und

dann auch integriert werden. Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen der resultierenden Zelllinie ließen auf eine stark reduzierte Expressionsrate schließen. Tatsächlich war die Detektion von Cytoskelettstrukturen, wenn überhaupt, erst bei deutlich längeren Belichtungszeiten möglich. Bedingt durch die langen Belichtungszeiten wurde die Dokumentation durch eine latente pflanzentypische Autofluoreszenz der Zellen erschwert. Auch wenn hier keine detailreicheren Aufnahmen der Cytoskelettstrukturen möglich waren, wird darauf hingewiesen, dass die Zellkultur für weiterführende Untersuchungen potentiell geeignet ist. So könnte sie z.B. in Studien bezüglich des zeitlichen Expressionsmusters des  $\gamma$ -Tubulins Anwendung finden. Der Einsatz eines sensibleren Mikroskopsystems ist allerdings erforderlich.

Da der molekulargenetische Ansatz nur bedingt zum Ziel führte, wurde der Einsatz eines alternativen Mikroskopsystems getestet. Auf Empfehlung einer kooperierenden Arbeitsgruppe wurde zunächst das Dekonvolutionsprinzip eingesetzt. Strukturen wie der Phragmoplast oder die mitotische Spindel, aber vor allem das cortikale Mikrotubuli-Netzwerk, waren schärfer und wesentlich detailreicher darstellbar.

Um klären zu können, inwieweit  $\gamma$ -Tubulin mit den Mikrotubuli co-lokalisiert, waren Zelllinien erforderlich, bei denen die entsprechenden Elemente unterschiedlich markiert waren. Zu diesem Zweck wurde der Einsatz von RFP-markiertem Tubulin getestet. Eine deutliche Überexpression von RFP alleine war möglich. Trotz mehrfacher Wiederholung der Versuche war aber keine Expression von RFP-markiertem  $\alpha$ -Tubulin in *BY-2* Zellen zur Visualisierung der Mikrotubuli detektierbar. Die DNA-Sequenzen waren im Genom nachweisbar, eine Transkription jedoch nicht. Möglicherweise spielten auch hier wieder *gene silencing* Effekte eine Rolle. Das verwendete RFP (TagRFP) und GFP stammten aus unterschiedlichen Organismen, aus einer Seeanemone bzw. einer Qualle. Eine Lösung könnte der Austausch des TagRFP durch ein Quallen-Derivat, das in einer von grün unterscheidbaren Farbe fluoresziert, bringen. Da bereits *BY-2* Zelllinien vorliegen, die GFP-markiertes  $\alpha$ - bzw.  $\gamma$ -Tubulin exprimieren, sollte es, nach Klonieren eines entsprechenden Konstruktes, zeitnah möglich sein, eine doppelt transfizierte Zelllinie herzustellen.

## 6 Literaturverzeichnis

**Abdel-Banat BMA, Adam SEH, Takahashi M, Sakamoto A, Shoun H, and Morikawa H.** "A Fungal Cytochrome P-450nor Confers Denitrifying Ability to Tobacco BY-2 Cells". *Biotechnology*, 7(2):250-257, 2008.

**Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P.** *Molecular Biology of the Cell*. Taylor & Francis Group, 5th edition, 2008.

**An G.** "High Efficiency Transformation of Cultured Tobacco Cells". *Plant Physiology*, 79:568-670, 1985.

**Ashby AM, Watson MD, Loake GJ, and Shaw CH.** "Ti Plasmid-Specified Chemotaxis of *Agrobacterium tumefaciens* C58C<sup>1</sup> toward *vir*-Inducing Phenolic Compounds and Soluble Factors from Monocotyledonous and Dicotyledonous Plants". *Journal of Bacteriology*, 170(9):4181-4187, 1988.

**Bannigan A, Lizotte-Waniewski M, Riley M, and Baskin TI.** "Emerging Molecular Mechanisms that Power and Regulate the Anastral Mitotic Spindle of Flowering Plants". *Cell Motility and the Cytoskeleton*, 65:1-11, 2008.

**Biggs DSC.** "Clearing Up Deconvolution". *Biophotonics International*<sup>®</sup>, Laurin Publishing Co. Inc., February 2004.

**Billinton N and Knight AW.** "Seeing the Wood through the Trees: A Review of Techniques for Distinguishing Green Fluorescent Protein from Endogenous Autofluorescence". *Analytical Biochemistry*, 291:175-197, 2001.

**Binarová P, Hause B, Doležel J, and Dráber P.** "Association of  $\gamma$ -tubulin with kinetochore/centromeric region of plant chromosomes". *The Plant Journal*, 14(6):751-757, 1998.

**Bińka A, Orczyk W, and Nadolska-Orczyk A.** "The *Agrobacterium*-mediated transformation of common wheat (*Triticum aestivum* L.) and triticale (x *Triticosecale* Wittmack): role of the binary vector system and selection cassettes". *Journal of Applied Genetics*, Published online: 28 September 2011.

**Bolton GW, Nester EW, and Gordon MP.** "Plant Phenolic Compounds Induce Expression of the *Agrobacterium tumefaciens* Loci Needed for Virulence". *Science*, 232:983-985, May 1986.

**Bradford MM.** "A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding". *Analytical Biochemistry*, 72:248-254, 1976.

**Buchanan BB, Gruissem W, and Jones RL.** *Biochemistry and molecular biology of plants*. American Society of Plant Physiologists, Rockville, MD, 2000.

**Campbell AM, Tok JB, Zhang J, Wang Y, Stein M, Lynn DG, and Binns AN.** "Xenognosin sensing in virulence: is there a phenol receptor in *Agrobacterium tumefaciens*?" *Chemistry & Biology*, 7(1):65-76, 2000.

- Canaday J, Stoppin-Mellet V, Mutterer J, Lambert A-M, and Schmit A-C.** "Higher Plant Cells: Gamma-Tubulin and Microtubule Nucleation in the Absence of Centrosomes". *Microscopy Research and Technique*, 49:487-495, 2000.
- Carminati JL and Stearns T.** "Microtubules Orient the Mitotic Spindle in Yeast through Dynein-dependent Interactions with the Cell Cortex". *The Journal of Cell Biology*, 138(3):629-641, August 1997.
- Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, Ward WW, and Prasher DC.** "Green Fluorescent Protein as a Marker for Gene Expression". *Science*, 263:802-805, February 1994.
- Chan J, Sambade A, Calder G, and Lloyd C.** "Arabidopsis Cortical Microtubules Are Initiated along, as Well as Branching from, Existing Microtubules". *The Plant Cell*, 21:2298-2306, August 2009.
- Chen GJ, Qiu N, Karrer C, Caspers P, and Page MGP.** "Restriction Site-Free Insertion of PCR Products Directionally into Vectors". *BioTechniques*, 28(3):498-505, March 2000.
- Christie PJ.** "Type IV secretion: the *Agrobacterium* VirB/D4 and related conjugation systems". *Biochimica et Biophysica Acta*, 1694:219-234, 2004.
- Ciska M and Moreno Díaz de la Espina S.** "The intriguing plant nuclear lamina". *Frontiers in Plant Science*, 5(166):1-13, 2014.
- Cohen SN, Chang ACY, and Hsu L.** "Nonchromosomal Antibiotic Resistance in Bacteria: Genetic Transformation of *Escherichia coli* by R-Factor DNA". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 69(8):2110-2114, August 1972.
- Cremer C.** "Lichtoptische Nanoskopie". *Biospektrum*, 1/2009:27-30, 2009.
- Crowell EF, Bischoff V, Desprez T, Rolland A, Stierhof Y-D, Schumacher K, Gonneau M, Höfte H, and Vernhettes S.** "Pausing of Golgi Bodies on Microtubules Regulates Secretion of Cellulose Synthase Complexes in *Arabidopsis*". *The Plant Cell*, 21:1141-1154, April 2009.
- Cubitt AB, Heim R, Adams SR, Boyd AE, Gross LA, and Tsien RY.** "Understanding, improving and using green fluorescent proteins". *Trends in Biochemical Sciences*, 20(11):448-455, November 1995.
- Curtis MD and Grossniklaus U.** "A Gateway Cloning Vector Set for High-Throughput Functional Analysis of Genes in Planta". *Plant Physiology*, 133:462-469, October 2003.
- Cyr R.** "How and why plant microtubules branch". *Nature Cell Biology*, 7(10):927-929, October 2005.
- David KM and Perrot-Rechenmann C.** "Characterization of a Tobacco Bright Yellow 2 Cell Line Expressing the Tetracycline Repressor at a High Level for Strict Regulation of Transgene Expression". *Plant Physiology*, 125:1548-1553, April 2001.
- Davidson MW.** "Deconvolution in Optical Microscopy". <http://micro.magnet.fsu.edu/primer/digitalimaging/deconvolution/deconvolutionhome.html> (abgerufen am 18.02.2014), last modification: November 2008.

- Deblaere R, Bytebier B, De Greve H, Deboeck F, Schell J, Van Montagu M, and Leemans J.** "Efficient octopine Ti plasmid-derived vectors for *Agrobacterium*-mediated gene transfer to plants". *Nucleic Acids Research*, 13(13):4777-4788, 1985.
- Deinum EE and Mulder BM.** "Modelling the role of microtubules in plant cell morphology". *Current Opinion in Plant Biology*, 16:688-692, 2013.
- de Keijzer J, Mulder BM, and Janson ME.** "Microtubule networks for plant cell division". *Systems and Synthetic Biology*, 8(3):187-194, September 2014.
- Delmotte FM, Delay D, Cizeau J, Guerin B, and Leple J-C.** "Agrobacterium Vir-inducing Activities of Glycosylated Acetosyringone, Acetovanillone, Syringaldehyde and Syringic Acid Derivatives". *Phytochemistry*, 30(11):3549-3552, 1991.
- Dixit R and Cyr R.** "Encounters between Dynamic Cortical Microtubules Promote Ordering of the Cortical Array through Angle-Dependent Modifications of Microtubule Behavior". *The Plant Cell*, 16(12):3274-3284, December 2004.
- Dixit R, Chang E, and Cyr R.** "Establishment of Polarity during Organization of the Acentrosomal Plant Cortical Microtubule Array". *Molecular Biology of the Cell*, 17:1298-1305, March 2006.
- Dryková D, Cenklová V, Sulimenko V, Volc J, Dráber P, and Binarová P.** "Plant  $\gamma$ -Tubulin Interacts with  $\alpha\beta$ -Tubulin Dimers and Forms Membrane-Associated Complexes". *The Plant Cell*, 15:465-480, February 2003.
- Eckardt NA.** "Function of  $\gamma$ -Tubulin in Plants". *The Plant Cell*, 18:1327-1329, June 2006.
- Ehrhardt DW.** "Straighten up and fly right-microtubule dynamics and organization of non-centrosomal arrays in higher plants". *Current Opinion in Cell Biology*, 20:107-116, 2008.
- Ehrhardt DW and Shaw SL.** "Microtubule Dynamics and Organization in the Plant Cortical Array". *Annual Review of Plant Biology*, 57:859-875, 2006.
- Eichler K.** "Optimierung eines Transfektionssystems zur Promotoranalyse eines pflanzlichen  $\gamma$ -Tubulins". Diplomarbeit, Fachbereich Biologie, Johannes Gutenberg Universität Mainz, 2009.
- Erickson HP.** " $\gamma$ -tubulin nucleation: template or protofilament?". *Nature Cell Biology*, 2:93-96, June 2000.
- Fan J, Griffiths AD, Lockhart A, Cross RA, and Amos LA.** "Microtubule Minus Ends can be Labelled with a Phage Display Antibody Specific to Alpha-Tubulin". *Journal of Molecular Biology*, 259(3):325-330, June 1996.
- Fishel EA and Dixit R.** "Role of nucleation in cortical microtubule array organization: variations on a theme". *The Plant Journal*, 75:270-277, 2013.
- Focus BRL.** "BRL pUC Host: *E. coli* DH5 $\alpha$  Competent Cells". *Bethesda Research Laboratories Focus*, 8(2):9, 1986.

- Fuchs U, Moepps B, Maucher HP, and Schraudolf H.** "Isolation, characterization and sequence of a cDNA encoding  $\gamma$ -tubulin protein from the fern *Anemia phyllitidis* L. Sw.". *Plant Molecular Biology*, 23:595-603, 1993.
- Gatz C and Lenk I.** "Promoters that respond to chemical inducers". *Trends in Plant Science*, 3(9):352-358, September 1998.
- Geelen DNV and Inzé DG.** "A Bright Future for the Bright Yellow-2 Cell Culture". *Plant Physiology*, 127:1375-1379, December 2001.
- Gelvin SB.** "Agrobacterium-Mediated Plant Transformation: the Biology behind the "Gene-Jockeying" Tool". *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 67(1):16-37, March 2003.
- Gelvin SB.** "Plant Proteins Involved in Agrobacterium-Mediated Genetic Transformation". *Annual Review of Phytopathology*, 48:45-68, 2010.
- Goddard RH, Wick SM, Silflow CD, and Snustad DP.** "Microtubule Components of the Plant Cell Cytoskeleton". *Plant Physiology*, 104(1):1-6, January 1994.
- Granger CL and Cyr RJ.** "Microtubule reorganization in tobacco BY-2 cells stably expressing GFP-MBD". *Planta*, 210:502-509, 2000.
- Grant SGN, Jessee J, Bloom FR, and Hanahan D.** "Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation-restriction mutants". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87(12):4645-4649, June 1990.
- Greb C.** "Dekonvolution – Bildverarbeitung in der Weitfeldmikroskopie". <http://www.laborpraxis.vogel.de/analytik/mikroskopie/roentgenstruktur/articles/405583/> (abgerufen am 20.02.2014), May 2013.
- Hajdukiewicz P, Svab Z, and Maliga P.** "The small, versatile pPZP family of Agrobacterium binary vectors for plant transformation". *Plant Molecular Biology*, 25:989-994, 1994.
- Hanahan D.** "Studies on Transformation of *Escherichia coli* with Plasmids". *Journal of Molecular Biology*, 166(4):557-580, June 1983.
- Harter K, Meixner AJ, and Schleifenbaum F.** "Spectro-Microscopy of Living Plant Cells". *Molecular Plant*, 5(1):14-26, January 2012.
- Haseloff J and Amos B.** "GFP in plants". *Trends in Genetics*, 11(8):328-329, August 1995.
- Haseloff J, Siemering KR, Prasher DC, and Hodge S.** "Removal of a cryptic intron and subcellular localization of green fluorescent protein are required to mark transgenic *Arabidopsis* plants brightly". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94:2122-2127, March 1997.
- Hasezawa S and Syōno K.** "Hormonal Control of Elongation of Tobacco Cells Derived from Protoplasts". *Plant & Cell Physiology*, 24(1):127-132, January 1983.
- Hasezawa S, Marc J, and Palevitz BA.** "Microtubule Reorganization During the Cell Cycle in Synchronized BY-2 Tobacco Suspensions". *Cell Motility and the Cytoskeleton*, 18:94-106, 1991.



- Hasezawa S, Ueda K, and Kumagai F.** "Time-Sequence Observations of Microtubule Dynamics throughout Mitosis in Living Cell Suspensions of Stable Transgenic *Arabidopsis* – Direct Evidence for the Origin of Cortical Microtubules at M/G<sub>1</sub> Interface –". *Plant Cell Physiology*, 41(2):244-250, 2000.
- Hashimoto T.** "A ring for all:  $\gamma$ -tubulin-containing nucleation complexes in acentrosomal plant microtubule arrays". *Current Opinion in Plant Biology*, 16:698-703, 2013.
- Heim R, Cubitt AB, and Tsien RY.** "Improved green fluorescence". *Nature*, 373:663-664, February 1995.
- Hellens R and Mullineaux P.** "A guide to *Agrobacterium* binary Ti vectors". *Trends in Plant Science*, 5(10):446-451, October 2000.
- Höfgen R and Willmitzer L.** "Storage of competent cells for *Agrobacterium* transformation". *Nucleic Acids Research*, 16(20):9877, 1988.
- Hoekema A, Hirsch PR, Hooykaas PJJ, and Schilperoort RA.** "A binary plant vector strategy based on separation of *vir*- and T-region of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti-plasmid". *Nature*, 303:179-180, May 1983.
- Holsters M, de Waele D, Depicker A, Messens E, van Montagu M, and Schell J.** "Transfection and Transformation of *Agrobacterium tumefaciens*". *Molecular Genetics and Genomics*, 163(2):181-187, 1978.
- Horio T and Hotani H.** "Visualization of the dynamic instability of individual microtubules by dark-field microscopy". *Nature*, 321:605-607, June 1986.
- Joshi HC, Palacios MJ, McNamara L, and Cleveland DW.** " $\gamma$ -Tubulin is a centrosomal protein required for cell cycle-dependent microtubule nucleation". *Nature*, 356:80-83, March 1992.
- Joshi HC and Palevitz BA.** " $\gamma$ -Tubulin and microtubule organization in plants". *Trends in Cell Biology*, 6:41-44, February 1996.
- Joubert P, Beaupère D, Lelièvre P, Wadouachi A, Sangwan RS, and Sangwan-Norreel BS.** "Effects of phenolic compounds on *Agrobacterium vir* genes and gene transfer induction – a plausible molecular mechanism of phenol binding protein activation". *Plant Science*, 162:733-743, 2002.
- Kapranov P.** "From transcription start site to cell biology". *Genome Biology*, 10(4):217, 2009.
- Kato K, Matsumoto T, Koiwai S, Mizusaki S, Nishida K, Noguchi M, and Tamaki E.** "Liquid suspension culture of tobacco cells". In *Fermentation Technology Today* (ed. G. Terui), Society of Fermentation Technology (Osaka), pp 689-695, 1972.
- Kim Y-K, Cha Y-K, Jun H-Y, Kim J-D, Choi J-S, Kim H-R, and Han I-S.** "Nucleotide Sequence of a cDNA (OstubG2) (Accession No. AF036957) Encoding a  $\gamma$ -Tubulin in the Rice Plant" (PGR 99-186). *Plant Physiology*, 121:1384, December 1999.
- Klockner N.** "N-terminale Markierung von pflanzlichem  $\gamma$ -Tubulin mit grün fluoreszierendem Protein: Erstellung eines Genkonstruktes und Analyse der Expression in transfizierten *Nicotiana* Zellen". Diplomarbeit, Fachbereich Biologie, Johannes Gutenberg Universität Mainz, 2011.

- Kollman JM, Merdes A, Mourey L, and Agard DA.** "Microtubule nucleation by  $\gamma$ -tubulin complexes". *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 12:709-721, November 2011.
- Krebs A, Goldie KN, and Hoenger A.** "Structural rearrangements in tubulin following microtubule formation". *EMBO reports*, 6(3):227-232, 2005.
- Kumagai F.** GenBank: AB052822.1, submitted December 2000.
- Kumagai F, Yoneda A, Tomida T, Sano T, Nagata T, and Hasezawa S.** "Fate of Nascent Microtubules Organized at the M/G<sub>1</sub> Interface, as Visualized by Synchronized Tobacco BY-2 Cells Stably Expressing GFP-Tubulin: Time-Sequence Observations of the Reorganization of Cortical Microtubules in Living Plant Cells". *Plant Cell Physiology*, 42(7):723-732, 2001.
- Kumagai F, Nagata T, Yahara N, Moriyama Y, Horio T, Naoi K, Hashimoto T, Murata T, and Hasezawa S.** " $\gamma$ -Tubulin distribution during cortical microtubule reorganization at the M/G<sub>1</sub> interface in tobacco BY-2 cells". *European Journal of Cell Biology*, 82:43-51, January 2003.
- Kyhse-Andersen J.** "Electroblotting of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose". *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 10:203-209, 1984.
- Laemmli UK.** "Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4". *Nature*, 227:680-685, August 1970.
- Lambert A-M.** "Microtubule-organizing centers in higher plants". *Current Opinion in Cell Biology*, 5:116-122, 1993.
- Lee Y-W, Jin S, Sim W-S, and Nester EW.** "Genetic evidence for direct sensing of phenolic compounds by the VirA protein of *Agrobacterium tumefaciens*". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92:12245-12249, December 1995.
- Lee L-Y and Gelvin SB.** "T-DNA Binary Vectors and Systems". *Plant Physiology*, 146:325-332, February 2008.
- Lee Y-RJ and Liu B.** "The rise and fall of the phragmoplast microtubule array". *Current Opinion in Plant Biology*, 16:757-763, 2013.
- Linsmaier EM and Skoog F.** "Organic Growth Factor Requirements of Tobacco Tissue Cultures". *Physiologia Plantarum*, 18:100-127, 1965.
- Liu B, Marc J, Joshi HC, and Palevitz BA.** "A  $\gamma$ -tubulin-related protein associated with the microtubule arrays of higher plants in a cell cycle-dependent manner". *Journal of Cell Science*, 104:1217-1228, 1993.
- Liu B, Joshi HC, Wilson TJ, Silflow CD, Palevitz BA, and Snustad DP.** " $\gamma$ -Tubulin in Arabidopsis: Gene Sequence, Immunoblot, and Immunofluorescence Studies". *The Plant Cell*, 6:303-314, February 1994.
- Lloyd C.** "Why Should Stationary Plant Cells Have Such Dynamic Microtubules?". *Molecular Biology of the Cell*, 5:1277-1280, December 1994.

- Lloyd C and Chan J.** "Microtubules and the shape of plants to come". *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 5:13-23, January 2004.
- Loake GJ, Ashby AM, and Shaw CH.** "Attraction of *Agrobacterium tumefaciens* C58C<sup>1</sup> towards Sugars Involves a Highly Sensitive Chemotaxis System". *Journal of General Microbiology*, 134:1427-1432, 1988.
- Lopez I, Khan S, Sevik M, Cande WZ, and Hussey PJ.** "Isolation of a Full-Length cDNA Encoding *Zea mays*  $\gamma$ -Tubulin". *Plant Physiology*, 107:309-310, 1995.
- Mandel M and Higa A.** "Calcium-dependent Bacteriophage DNA Infection". *Journal of Molecular Biology*, 53(1):159-162, October 1970.
- Mathias RJ and Boyd LA.** "Cefotaxime Stimulates Callus Growth, Embryogenesis and Regeneration in Hexaploid Bread Wheat (*Triticum aestivum* L em. Thell)". *Plant Science*, 46:217-223, 1986.
- Mathur J, Mathur N, Kernebeck B, Srinivas BP, and Hülkamp M.** "A Novel Localization Pattern for an EB1-like Protein Links Microtubule Dynamics to Endomembrane Organization". *Current Biology*, 13:1991-1997, November 2003.
- Matsuoka K.** "Agrobacterium-mediated transformation". *Riken PSC*. <http://mrg.psc.riken.go.jp/strc/BY-2tran.htm> (abgerufen am 20.01.2009), 2003.
- McCullen CA and Binns AN.** "Agrobacterium tumefaciens and Plant Cell Interactions and Activities Required for Interkingdom Macromolecular Transfer". *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 22:101-127, 2006.
- McKean PG, Vaughan S, and Gull K.** "The extended tubulin superfamily". *Journal of Cell Science*, 114(15):2723-2733, 2001.
- McMichael CM and Bednarek SY.** "Cytoskeletal and membrane dynamics during higher plant cytokinesis". *New Phytologist*, 197:1039-1057, 2013.
- Menzel D.** "Chasing coiled coils: Intermediate filaments in plants". *Botanica acta*, 106(4):294-300, 1993.
- Merzlyak EM, Goedhart J, Shcherbo D, Bulina ME, Shcheglov AS, Fradkov AF, Gaintzeva A, Lukyanov KA, Lukyanov S, Gadella TWJ, and Chudakov DM.** "Bright monomeric red fluorescent protein with an extended fluorescence lifetime". *Nature Methods*, 4(7):555-557, July 2007.
- Mitchison T and Kirschner M.** "Dynamic instability of microtubule growth". *Nature*, 312:237-142, November 1984.
- Mitchison TJ.** "Localization of an Exchangeable GTP Binding Site at the Plus End of Microtubules". *Science*, 261:1044-1047, August 1993.
- Mizuno K.** "Microtubule-nucleation sites on nuclei of higher plant cells". *Protoplasma*, 173:77-85, 1993.
- Moritz M, Braunfeld MB, Guénebaut V, Heuser J, and Agard DA.** "Structure of the  $\gamma$ -tubulin ring complex: a template for microtubule nucleation". *Nature Cell Biology*, 2:365-370, June 2000.

- Moritz M and Agard DA.** “ $\gamma$ -Tubulin complexes and microtubule nucleation”. *Current Opinion in Structural Biology*, 11:174-181, 2001.
- Mülhardt C.** “Der Experimentator Molekularbiologie/Genomics”. *Spektrum Akademischer Verlag*, 5. Auflage, 2006.
- Munk K.** “Taschenlehrbuch Biologie: Mikrobiologie”. *Thieme Verlag*, 1. Auflage, 2008.
- Murata T, Sonobe S, Baskin TI, Hyodo S, Hasezawa S, Nagata T, Horio T, and Hasebe M.** “Microtubule-dependent microtubule nucleation based on recruitment of  $\gamma$ -tubulin in higher Plants”. *Nature Cell Biology*, 7(10):961-968, October 2005.
- Murphy SM and Stearns T.** “Cytoskeleton: Microtubule nucleation takes shape”. *Current Biology*, 6(6):642-644, 1996.
- Mußmann V, Serek M, und Winkelmann T.** “Interaktion von *Agrobacterium tumefaciens* mit der Selektionswirkung von Phosphinothricin”. *Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit*, 1:134-139, 2006.
- Nagata T, Nemoto Y, and Hasezawa S.** “Tobacco BY-2 cell line as the “HeLa” cell in the biology of higher plants”. *International Review of Cytology*, 132:1-30, 1992.
- Nakamura M, Ehrhardt DW, and Hashimoto T.** “Microtubule and katanin-dependent dynamics of microtubule nucleation complexes in the acentrosomal *Arabidopsis* cortical array”. *Nature Cell Biology*, 12(11):1064-1070, November 2010.
- Nocarova E and Fischer L.** “Cloning of transgenic tobacco BY-2 cells; an efficient method to analyse and reduce high natural heterogeneity of transgene expression”. *BMC Plant Biology*, 9:44, April 2009.
- Nogales E and Wang H-W.** “Structural intermediates in microtubule assembly and disassembly: how and why?”. *Current Opinion in Cell Biology*, 18:179-184, 2006.
- Oakley CE and Oakley BR.** “Identification of  $\gamma$ -tubulin, a new member of the tubulin superfamily encoded by *mipA* gene of *Aspergillus nidulans*”. *Nature*, 338:662-664, April 1989.
- Oakley BR, Oakley CE, Yoon Y, and Jung MK.** “ $\gamma$ -Tubulin is a Component of the Spindle Pole Body That is Essential for Microtubule Function in *Aspergillus nidulans*”. *Cell*, 61:1289-1301, June 1990.
- Oakley BR.** “ $\gamma$ -Tubulin: the microtubule organizer?”. *Trends in Cell Biology*, 2:1-5, January 1992.
- Ochman H, Gerber AS, and Hartl DL.** “Genetic Applications of an Inverse Polymerase Chain Reaction”. *Genetics*, 120:621-623, November 1988.
- Ostertag MR.** “Charakterisierung einer pflanzlichen Variante des Cytoskelettproteins  $\gamma$ -Tubulin durch Strukturmodellierung, Überexpression und Analyse der Interaktionspartner”. PhD thesis, Fachbereich Biologie, Johannes Gutenberg Universität Mainz, 2012.
- Panteris E, Apostolakos P, Gräf R, and Galatis B.** “Gamma-tubulin colocalizes with microtubule arrays and tubulin paracrystals in dividing vegetative cells of higher plants”. *Protoplasma*, 210:179-187, 2000.

- Paradez A, Wright A, and Ehrhardt DW.** "Microtubule cortical array organization and plant cell morphogenesis". *Current Opinion in Plant Biology*, 9:571-578, 2006.
- Paredez AR, Somerville CR, Ehrhardt DW.** "Visualization of Cellulose Synthase Demonstrates Functional Association with Microtubules". *Science*, 312:1491-1495, June 2006.
- Pastuglia M, Azimzadeh J, Goussot M, Camilleri C, Belcram K, Evrard J-L, Schmit A-C, Guerche P, and Bouchez D.** " $\gamma$ -Tubulin Is Essential for Microtubule Organization and Development in *Arabidopsis*". *The Plant Cell*, 18:1412-1425, June 2006.
- Pastuglia M and Bouchez D.** "Molecular encounters at microtubule ends in the plant cell cortex". *Current Opinion in Plant Biology*, 10:557-563, 2007.
- Permyakova NV, Shumnyi VK, and Deineko EV.** "*Agrobacterium*-Mediated Transformation of Plants: Transfer of Vector DNA Fragments in the Plant Genome". *Russian Journal of Genetics*, 45(3):266-275, 2009.
- Pollard TD and Cooper JA.** "Actin, a Central Player in Cell Shape and Movement". *Science*, 326:1208-1212, November 2009.
- Pope B and Kent HM.** "High efficiency 5 min transformation of *Escherichia coli*". *Nucleic Acids Research*, 24(3):536-537, 1996.
- Raynaud-Messina B and Merdes A.** " $\gamma$ -tubulin complexes and microtubule organization". *Current Opinion in Cell Biology*, 19:24-30, 2007.
- Rehm H.** "Der Experimentator Proteinbiochemie/Proteomics". *Spektrum Akademischer Verlag*, 5. Auflage, 2006.
- Reichel C, Mathur J, Eckes P, Langenkemper K, Koncz C, Schell J, Reiss B, and Maas C.** "Enhanced green fluorescence by the expression of an *Aequorea victoria* green fluorescent protein mutant in mono- and dicotyledonous plant cells". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93:5888-5893, June 1996.
- Rempel HC and Nelson LM.** "Analysis of conditions for *Agrobacterium*-mediated transformation of tobacco cells in suspension". *Transgenic Research*, 4:199-207, 1995.
- Rose A, Patel S, Meier I.** "The plant nuclear envelope". *Planta*, 218:327-336, 2004.
- Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, and Arnheim N.** "Enzymatic Amplification of  $\beta$ -Globin Genomic Sequences and Restriction Site Analysis for Diagnosis of Sickle Cell Anemia". *Science*, 230:1350-1354, December 1985.
- Sambrook J and Russell DW.** "Molecular Cloning: A Laboratory Manual". *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, 3. edition, 2001.
- Sanger F, Nicklen S, and Coulson AR.** "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74(12):5463-5467, December 1977.

- Scheel J.** "Etablierung eines Systems zur stabilen Transformation von Pflanzenzellen der BY-2 Zellkultur". Diplomarbeit, Fachbereich Biologie, Johannes Gutenberg Universität Mainz, 2008.
- Schröder J, Kautz K, and Wernicke W.** "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(2):224-229, 2002.
- Shaner NC, Campbell RE, Steinbach PA, Giepmans BNG, Palmer AE, and Tsien RY.** "Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein". *Nature Biotechnology*, 22(12):1567-1572, December 2004.
- Shaner NC, Steinbach PA, and Tsien RY.** "A guide to choosing fluorescent proteins". *Nature Methods*, 2(12):905-909, December 2005.
- Shaner NC, Patterson GH, and Davidson MW.** "Advances in fluorescent protein technology". *Journal of Cell Science*, 120(24):4247-4260, 2007.
- Shaner NC, Lin MZ, McKeown MR, Steinbach PA, Hazelwood KL, Davidson MW, and Tsien RY.** "Improving the photostability of bright monomeric orange and red fluorescent proteins". *Nature Methods*, 5(6):545-551, June 2008.
- Shaw CH, Ashby AM, Brown A, Royal C, Loake GJ, and Shaw CH.** "virA and virG are the Ti-plasmid functions required for chemotaxis of *Agrobacterium tumefaciens* towards acetosyringone". *Molecular Microbiology*, 2(3):413-417, 1988.
- Shaw CH.** "Swimming Against the Tide: Chemotaxis in *Agrobacterium*". *BioEssays*, 13(1):25-29, January 1991.
- Shaw SL, Kamyar R, and Ehrhardt DW.** "Sustained Microtubule Treadmilling in *Arabidopsis* Cortical Arrays". *Science*, 300:1715-1718, June 2003.
- Shaw SL.** "Reorganization of the plant cortical microtubule array". *Current Opinion in Plant Biology*, 16:693-697, 2013.
- Shimamura M, Brown RC, Lemmon BE, Akashi T, Mizuno K, Nishihara N, Tomizawa K-I, Yoshimoto K, Deguchi H, Hosoya H, Horio T, and Mineyuki Y.** "γ-Tubulin in Basal Land Plants: Characterization, Localization, and Implication in the Evolution of Acentriolar Microtubule Organizing Centers". *The Plant Cell*, 16:45-59, January 2004.
- Shimomura O, Johnson FH, and Saiga Y.** "Extraction, Purification and Properties of Aequorin, a Bioluminescent Protein from the Luminous Hydromedusan, *Aequorea*". *Journal of Cellular and Comparative Physiology*, 59(3):223-239, 1962.
- Sippel C.** "Entwicklung eines Zellkultursystems zur Analyse der Funktion pflanzlicher Mikrotubuli während der Zellteilung und Zelldifferenzierung". Staatsexamensarbeit, Fachbereich Biologie, Johannes Gutenberg Universität Mainz, 2002.
- Song Y-N, Shibuya M, Ebizuka Y, and Sankawa U.** "Identification of Plant Factors Inducing Virulence Gene Expression in *Agrobacterium tumefaciens*". *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 39(9):2347-2350, September 1991.

- Stachel SE, Messens E, Van Montagu M, and Zambryski P.** "Identification of the signal molecules produced by wounded plant cells that activate T-DNA transfer in *Agrobacterium tumefaciens*". *Nature*, 318:624-629, December 1985.
- Staufenbiel C.** "Methoden zur Klonierung transgener BY-2 Zellen". Diplomarbeit, Fachbereich Biologie, Johannes Gutenberg Universität Mainz, 2009.
- Stearns T, Evans L, and Kirschner M.** " $\gamma$ -Tubulin Is a Highly Conserved Component of the Centrosome". *Cell*, 65:825-836, May 1991.
- Stewart RC and Dahlquist FW.** "Molecular Components of Bacterial Chemotaxis". *Chemical Reviews*, 87(5):997-1025, 1987.
- Stoppin V, Vantard M, Schmit A-C, and Lambert A-M.** "Isolated Plant Nuclei Nucleate Microtubule Assembly: The Nuclear Surface in Higher Plants Has Centrosome-like Activity". *The Plant Cell*, 6(8):1099-1106, August 1994.
- Stoppin-Mellet V, Peter C, and Lambert AM.** "Distribution of  $\gamma$ -Tubulin in Higher Plant Cells: Cytosolic  $\gamma$ -Tubulin is Part of High Molecular Weight Complexes". *Plant Biology*, 2(3):290-296, May 2000.
- Sullivan M.** "BY-2 Cell Transformation with *Agrobacterium*". <http://ag.udel.edu/research/pamgreen/by2.htm> (zuletzt abgerufen am 02.12.2014), 1994.
- Taubmann A.** "Überexpression eines Fusionskonstruktes aus  $\gamma$ -Tubulin und grün fluoreszierendem Protein in *Nicotiana tabacum* BY2-Zellen". Diplomarbeit, Fachbereich Biologie, Johannes Gutenberg Universität Mainz, 2010.
- Triglia T, Peterson MG, and Kemp DJ.** "A procedure for *in vitro* amplification of DNA segments that lie outside the boundaries of known sequences". *Nucleic Acids Research*, 16(16):8186, 1988.
- Tsien RY.** "The Green Fluorescent Protein". *Annual Review of Biochemistry*, 67:509-544, 1998.
- Tzfira T.** "On tracks and locomotives: the long route of DNA to the nucleus". *Trends in Microbiology*, 14(2):61-63, February 2006.
- Tzfira T and Citovsky V.** "*Agrobacterium*-mediated genetic transformation of plants: biology and biotechnology". *Current Opinion in Biotechnology*, 17:147-154, 2006.
- Ueda K, Matsuyama T, and Hashimoto T.** "Visualization of microtubules in living cells of transgenic *Arabidopsis thaliana*". *Protoplasma*, 206:201-206, 1999.
- Unger T, Jacobovitch Y, Dantes A, Bernheim R, and Peleg Y.** "Applications of the Restriction Free (RF) cloning procedure for molecular manipulations and protein expression". *Journal of Structural Biology*, 172:34-44, 2010.
- van den Ent F and Löwe J.** "RF cloning: A restriction-free method for inserting target genes into plasmids". *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 67:67-74, 2006.

- Vervliet G, Holsters M, Teuchy H, Van Montagu M, and Schell J.** "Characterization of Different Plaque-forming and Defective Temperate Phages in *Agrobacterium* Stains". *Journal of General Virology*, 26(1):33-48, January 1975.
- Voigt B, Timmers ACJ, Šamaj J, Müller J, Baluška F, and Menzel D.** "GFP-FABD2 fusion construct allows in vivo visualization of the dynamic actin cytoskeleton in all cells of *Arabidopsis* seedlings". *European Journal of Cell Biology*, 84:595-608, 2005.
- Wade RH.** "On and Around Microtubules: An Overview". *Molecular Biotechnology*, 43:177-191, 2009.
- Wadenpohl I and Bramkamp M.** "Fluoreszierende Proteine als Werkzeuge in der Mikrobiologie". *Biospektrum*, 1/2010:51-53, 2010.
- Wadsworth P, Lee W-L, Murata T, and Baskin TI.** "Variations on theme: spindle assembly in diverse cells". *Protoplasma*, 248:439-446, 2011.
- Wagner TA, Sack FD, Oakely BR, Oakely CE, and Schwuchow J.** GenBank: AF142098.1, submitted April 1999.
- Walker KL, Müller S, Moss D, Ehrhardt DW, and Smith LG.** "*Arabidopsis* TANGLED Identifies the Division Plane throughout Mitosis and Cytokinesis". *Current Biology*, 17:1827-1836, November 2007.
- Wallden K, Rivera-Calzada A, and Waksman G.** "Type IV secretion systems: versatility and diversity in function". *Cellular Microbiology*, 12(9):1203-1212, 2010.
- Wasteneys GO.** "Microtubule organization in the green kingdom: chaos or self-order?". *Journal of Cell Science*, 115(7):1345-1354, 2002.
- Wasteneys GO and Yang Z.** "New Views on the Plant Cytoskeleton". *Plant Physiology*, 136:3884-3891, December 2004.
- Wasteneys GO and Ambrose JC.** "Spatial organization of plant cortical microtubules: close encounters of the 2D kind". *Trends in Cell Biology*, 19(2):62-71, February 2009.
- Weinstein B and Solomon F.** "Phenotypic Consequences of Tubulin Overproduction in *Saccharomyces cerevisiae*: Differences between Alpha-Tubulin and Beta-Tubulin". *Molecular and Cellular Biology*, 10(10):5295-5304, October 1990.
- Wiese C and Zheng Y.** "Microtubule nucleation:  $\gamma$ -tubulin and beyond". *Journal of Cell Science*, 119(20):4143-4153, 2006.
- Winans SC.** "An *Agrobacterium* two-component regulatory system for the detection of chemicals released from plant wounds". *Molecular Microbiology*, 5(10):2345-2350, October 1991.
- Winans SC.** "Two-Way Chemical Signaling in *Agrobacterium*-Plant Interactions". *Microbiological Reviews*, 56(1):12-31, March 1992.
- Winter S.** "Transfektion von BY-2-Zellen mit GFP unter Kontrolle des induzierbaren XVE-Promotorsystems". Staatsexamensarbeit, Fachbereich Biologie, Johannes Gutenberg Universität Mainz, 2012.



- Wolf M.** "Versuche zur Isolation genomischer  $\gamma$ -Tubulin Sequenzen und Expression entsprechender cDNA von *Nicotiana tabacum* in einem bakteriellen System". Diplomarbeit, Fachbereich Biologie, Johannes Gutenberg Universität Mainz, 2008.
- Yoneda A, Kutsuna N, Higaki T, Oda Y, Sano T, and Hasezawa S.** "Recent progress in living cell imaging of plant cytoskeleton and vacuole using fluorescent-protein transgenic lines and three-dimensional imaging". *Protoplasma*, 230:129-139, 2007.
- Yoshioka Y, Takahashi Y, Matsuoka K, Nakamura K, Koizumi J, Kojima M, and Machida Y.** "Transient Gene Expression in Plant Cells Mediated by *Agrobacterium tumefaciens*: Application for the Analysis of Virulence Loci". *Plant Cell Physiology*, 37(6):782-789, 1996.
- Yu T-A, Yeh S-D, and Yang J-S.** "Effects of carbenicillin and cefotaxime on callus growth and somatic embryogenesis from adventitious roots of papaya". *Botanical Bulletin of Academia Sinica*, 42:281-286, 2001.
- Zechner EL, Lang S, and Schildbach JF.** "Assembly and mechanisms of bacterial type IV secretion machines". *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 367:1073-1087, 2012.
- Zhang H and Dawe RK.** "Mechanisms of plant spindle formation". *Chromosome Research*, 19(3):335-344, April 2011.
- Zheng Y, Jung MK, and Oakley BR.** " $\gamma$ -Tubulin Is Present in *Drosophila melanogaster* and *Homo sapiens* and Is Associated with the Centrosome". *Cell*, 65:817-823, May 1991.
- Zheng Y, Wong ML, Alberts B, and Mitchison T.** "Nucleation of microtubule assembly by a  $\gamma$ -tubulin-containing ring complex". *Nature*, 378:578-583, December 1995.
- Zimmer M.** "Green Fluorescent Protein (GFP): Applications, Structure, and Related Photophysical Behavior". *Chemical Reviews*, 102(3):759-781, 2002.
- Zuo J and Chua N-H.** "Chemical-inducible systems for regulated expression of plant genes". *Current Opinion in Biotechnology*, 11:146-151, 2000.
- Zuo J, Niu Q-W, and Chua N-H.** "An estrogen receptor-based transactivator XVE mediates highly inducible gene expression in transgenic plants". *The Plant Journal*, 24(2):265-273, 2000.

## 7 Anhang

### 7.1 Nährmedien, Puffer und Lösungen

#### LS-Stammlösungen

Stammlösung I	10x	KNO <sub>3</sub>	19,0	g * l <sup>-1</sup>
		NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	16,5	g * l <sup>-1</sup>
		CaCl <sub>2</sub> * 2 H <sub>2</sub> O	4,4	g * l <sup>-1</sup>
		MgSO <sub>4</sub> * 7 H <sub>2</sub> O	3,7	g * l <sup>-1</sup>
		KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3,7	g * l <sup>-1</sup>
Stammlösung II	100x	MnSO <sub>4</sub> * H <sub>2</sub> O	1690,0	mg * l <sup>-1</sup>
		ZnSO <sub>4</sub> * 7 H <sub>2</sub> O	860,0	mg * l <sup>-1</sup>
		H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	620,0	mg * l <sup>-1</sup>
		KI	83,0	mg * l <sup>-1</sup>
		Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> * 2 H <sub>2</sub> O	25,0	mg * l <sup>-1</sup>
		CoCl <sub>2</sub> * 6 H <sub>2</sub> O	2,5	mg * l <sup>-1</sup>
		CuSO <sub>4</sub> * 5 H <sub>2</sub> O	2,5	mg * l <sup>-1</sup>
Stammlösung III	1000x	Thiamin HCl	1,0	g * l <sup>-1</sup>
Stammlösung IV	100x	FeSO <sub>4</sub> * 7 H <sub>2</sub> O	2,78	g * l <sup>-1</sup>
		Na <sub>2</sub> EDTA * 2 H <sub>2</sub> O	3,73	g * l <sup>-1</sup>

---

## LS-Medium

---

Stammlösung I	10,0	Vol.-%
Stammlösung II	1,0	Vol.-%
Stammlösung III	0,1	Vol.-%
Stammlösung IV	1,0	Vol.-%
myo-Inosit	100,0	mg * l <sup>-1</sup>
Saccharose	30,0	g * l <sup>-1</sup>
2,4-D	0,2	mg * l <sup>-1</sup>

---

pH = 6,0

Zur Verfestigung:

Gelrite	4,0	g * l <sup>-1</sup>
---------	-----	---------------------

---

---

## LB-Medium

---

Bacto-Trypton	10,0	g * l <sup>-1</sup>
Bacto-Hefeextrakt	5,0	g * l <sup>-1</sup>
NaCl	10,0	g * l <sup>-1</sup>

---

pH = 7,0

Zur Verfestigung:

Bacto-Agar	15,0	g * l <sup>-1</sup>
------------	------	---------------------

---

---

**YEB-Medium**

---

Fleischextrakt	5,0	$\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$
Bacto-Hefeextrakt	1,0	$\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$
Bacto-Pepton	5,0	$\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,3	$\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$
Saccharose	5,0	$\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$

---

pH = 7,2

Zur Verfestigung:

Bacto-Agar	15,0	$\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$
------------	------	--------------------------------

---

---

**TFB I**

---

Kalium-Acetat	30,0	mM
RbCl	100,0	mM
$\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	50,0	mM
$\text{CaCl}_2$	10,0	mM
Glycerol	15,0	Vol.-%

---

pH 5,8

---

**TFB II**

---

Pipes	10,0	mM
$\text{CaCl}_2$	75,0	mM
RbCl	10,0	mM
Glycerol	15,0	Vol.-%

---

pH 6,5

---

**TE-Puffer**

---

Tris	10,0	mM
EDTA	1,0	mM

---

pH 7,5

---

---

**0,5x TBE-Puffer**

---

Tris	44,5	mM
Borat	44,5	mM
EDTA	2,0	mM

---

pH 8,0

---

---

**5x Orange-G-Dye**

---

Orange G	0,20	Gew.-%
Xylene Cyanol	0,05	Gew.-%
EDTA	60,0	mM
Glycerol	60,0	Vol.-%

---

---

**Denaturierungspuffer**

---

Tris	62,5	mM
SDS	2,0	Gew.-%
β-Mercaptoethanol	5,0	Vol.-%

---

pH 6,8

---

---

**Tris-HCl-Puffer 1,5 M**

---

Tris	1,5	M
------	-----	---

---

pH 8,8

---

---

**Tris-HCl-Puffer 0,5 M**

---

Tris	0,5	M
------	-----	---

---

pH 6,8

---

---

**Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung**

---

Acrylamid	29,2	Gew.-%
Bisacrylamid	0,8	Gew.-%

---

---

### SDS-Lösung

---

SDS	10,0	Gew.-%
-----	------	--------

---

---

### APS-Lösung

---

APS	10,0	Gew.-%
-----	------	--------

---

---

### Laufpuffer

---

Tris	25,0	mM
Glycin	192,0	mM
SDS	0,1	Gew.-%

---

pH 8,3

---

---

### 5x Probenpuffer

---

Tris	312,5	mM
SDS	10,0	Gew.-%
$\beta$ -Mercaptoethanol	25,0	Vol.-%
Bromphenolblau	0,06	Gew.-%
Glycerol	50,0	Vol.-%

---

---

### Coomassie Fixier-/Färbelösung

---

Ethanol	30,0	Vol.-%
Essigsäure	10,0	Vol.-%
Coomassie-Brilliantblau	0,1	Gew.-%

---

---

### Vortrocknerlösung

---

Methanol	25,0	Vol.-%
2-Propanol	10,0	Vol.-%
Glycerol	2,0	Vol.-%

---

---

### Transferpuffer

---

Tris	48,0	mM
Glycin	39,0	mM
Methanol	20,0	Vol.-%
SDS	0,0375	Gew.-%

---

---

### Ponceau-Rot-Färbelösung

---

Ponceau S	0,4	Gew.-%
Trichloressigsäure	3,0	Vol.-%

---



---

**TBST-Puffer**

---

Tris	20,0	mM
NaCl	137,0	mM
Tween 20	0,1	Vol.-%

---

pH 7,6

---

---

**TBST-Milchpulver-Puffer**

---

TBST-Puffer		
Milchpulver	5,0	Gew.-%

---

---

**Amidoschwarz-Färbelösung**

---

Amidoschwarz	0,5	Gew.-%
Isopropanol	25,0	Vol.-%
Essigsäure	10,0	Vol.-%

---

## 7.2 Verwendete Sequenzen

### 7.2.1 $\gamma$ -Tubulin-Promotorsequenz

Dargestellt ist die in der vorliegenden Arbeit bestimmte  $\gamma$ -Tubulin-Promotorsequenz inklusive der 5'-UTR und dem Startcodon des  $\gamma$ -Tubulins. Die für die Sequenzierung verwendeten Primer sind Tabelle 7.1 zu entnehmen.

**Tabelle 7.1: Primer zur Sequenzierung des  $\gamma$ -Tubulin-Promotors.**

Die Position der Primer wird relativ zum Startcodon angegeben. Tm gibt die Schmelztemperatur der Primer an.

Primer	Position	Orientierung	Länge [bp]	Tm [°C]
Promo_fw_106	-1653	Forward	25	53,1°C
Prom_fw_l	-1082	Forward	20	55,3°C
Prom_rev_l	-415	Reverse	25	54,8°C
GT_1898_rev	140	Reverse	22	56,5°C

- Die 5'-UTR wurde gelb unterlegt.
- Das Startcodon wurde grün unterlegt.

```

      .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          10      20      30      40      50
gTub-Promotor  GGGGATACGT AGCATCTCTA GATATATAGT TCAGGATCCC GATTACTAGT

      .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          60      70      80      90     100
gTub-Promotor  GTTTTTATTA TGTAACTCTT GTTGTTTTGT GAAAAGTTGA AAAAACTAAT

      .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          110     120     130     140     150
gTub-Promotor  TTCTCATTAA AGACAAAAGC ATATACTCTT TTAAC TTAA ATGATAAAAC

      .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          160     170     180     190     200
gTub-Promotor  ATCCTAATAA AAATGTATAT TTATCAAAC ATCACCACCTT TATAGATAAG

      .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          210     220     230     240     250
gTub-Promotor  AACTAAACTT GTTTATTATG CAATAAGACC AAACGTTTCA TAAACTTATT

      .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          260     270     280     290     300
gTub-Promotor  ATCTCTCTAT TTCTTGAATA TTTTATATAT AATTGGAAAA TAATTTTTTT

```

```
.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      310      320      330      340      350
gTub-Promotor TAACAATAAT CTCCCACAAT TAAAATTTAA ATCGCTCACT AATTTTAATA

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      360      370      380      390      400
gTub-Promotor GTACTAATTG TAAATGAAAT TTTTGCATGT TTATTCGTAA TTTGATATCT

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      410      420      430      440      450
gTub-Promotor AATAGCCTTC TTTTTGTATA ATGTTAGCTA AACAAATTGC TTTTATAATC

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      460      470      480      490      500
gTub-Promotor GTAAGAAAAA AGTTTTGAAC AAAAGTGTGA ATATATTCGT GAATAGTGCA

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      510      520      530      540      550
gTub-Promotor AAAATTGTAA TTCATACTCT TTTGTTAAAA GTTAATTTCA AAGTTGTCAT

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      560      570      580      590      600
gTub-Promotor CTCGTTACAC AATTGTTTGA CATATACTTT TATTTTCCAA CTCAACAAAT

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      610      620      630      640      650
gTub-Promotor AATCACGTGA AAACATATTT TAATTATTGA CACGTGAATC TTGTGAAATC

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      660      670      680      690      700
gTub-Promotor CAATATCAGC ACGTCATCAT AATATTCTTC GTCTCTTCAA GATCTCACGG

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      710      720      730      740      750
gTub-Promotor TATATATATT CTTCGTCTCT TCACCGTATT TTTTCTACCT CCATCATTCG

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      760      770      780      790      800
gTub-Promotor CAGAGGTGGA TTTAGGGGCG CAAGGGGTTA CTCGAACCCC CTTCGTCGAA

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      810      820      830      840      850
gTub-Promotor AAAATACACT GTATATATAA GGTAATAATTT ATTTTTTGCC TCTATATATT

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      860      870      880      890      900
gTub-Promotor AAATTTTGAA CCTCCTTAAC ACAATTCAAA AGTGTAGTTT AATGGTTAAG
```

```

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          910          920          930          940          950
gTub-Promotor GGAGTTCAAA ATCTACATAA GGTCATGAGT TCAATTCCCA CTAGATACAA

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          960          970          980          990          1000
gTub-Promotor TTTTTTTTGA ACCCCTTCGT GGAGATCCTG AGCCACCACA CCAAACATAA

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          1010         1020         1030         1040         1050
gTub-Promotor ACATCATTTT CCCTGCCTTT TCCACCTATA CCAATTCCAA GCTAGCATAC

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          1060         1070         1080         1090         1100
gTub-Promotor CAATATGGAA ACATCGTCTT CTCCTCTACC ACTTTTTTTA GAAAAAGATT

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          1110         1120         1130         1140         1150
gTub-Promotor AACATTAATA ATGCTACTAA AGCATGTGAT CATATATTTT AATAAGATGA

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          1160         1170         1180         1190         1200
gTub-Promotor TGATTGGTCG GTGTTAGATA AGAATTTTTA TATGGACACT CGAATTTAAA

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          1210         1220         1230         1240         1250
gTub-Promotor TATGCTAAAG AAACCCAGT AGCTCATTTT TTGGCTATCT TTATTAAGTT

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          1260         1270         1280         1290         1300
gTub-Promotor TCATACGAAT TTATTCAAAT AGAATTTGTG AAACAAATTA CTGATCAATA

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          1310         1320         1330         1340         1350
gTub-Promotor AGAAAGACTG ATGTTGCAAC AACAAAAGAA GTCAAGACCC AATGTTGTAA

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          1360         1370         1380         1390         1400
gTub-Promotor AGTGGAAGAC AAAGTTGACT TAACAAAACC ATCTATATTG ACTATTGAGT

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          1410         1420         1430         1440         1450
gTub-Promotor TGGAAAATAG AGGCATTTGT GATGTAATTG GGAAATGATT AGGGTATTTT

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          1460         1470         1480         1490         1500
gTub-Promotor TGAAGTGAAC TTAAATAGA GGCACGAAT ACTAATTTCA TAAAGTGTAT

```

```
.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      1510      1520      1530      1540      1550
gTub-Promotor GGGTAAATTT AGACAAAGAA ACAAGTTGGA AAATGAAAGA GTTTGAAGGT

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      1560      1570      1580      1590      1600
gTub-Promotor ATTCCACTCA CGGCTTATGT TAGCGCCGTT CAATCAAAAC ATAATTAAGC

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      1610      1620      1630      1640      1650
gTub-Promotor CGGCAGACTC GCCCCACAGT TACAACAGAG AGTGAGAGAG CTCATAATTT

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      1660      1670      1680      1690      1700
gTub-Promotor CCCTCTTTCT TTTTAAAC CCTTACTGG CTACGCGCAC AAGCAGCCAT

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      1710      1720      1730      1740      1750
gTub-Promotor AACCCAAAGT AGAAGGAAAT TCTCTTTTCC TCTGGCAGAT CGATAACGTC

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      1760      1770      1780      1790      1800
gTub-Promotor TGCAGTTTAC TCCTGATATT GTCAAGTGCG CGAGGGAACC AACCAAGGAA

.....|.....| .....|...
      1810
gTub-Promotor AACAGCAAAG GAAATG
```

## 7.2.2 Die genomische $\gamma$ -Tubulin-Vollängensequenz

Dargestellt ist die genomische  $\gamma$ -Tubulin-Vollängensequenz aus der *N. tabacum* BY-2 Zelllinie. In der vorliegenden Arbeit wurde die bereits während der Diplomarbeit (Wolf, 2008) begonnene Sequenzierung fertiggestellt. Die dafür verwendeten Primer sind Tabelle 7.2 zu entnehmen.

**Tabelle 7.2: Primer zur Sequenzierung der  $\gamma$ -Tubulin-Vollängensequenz.**

Die Position der Primer wird relativ zum Startcodon angegeben. Tm gibt die Schmelztemperatur der Primer an.

Primer	Position	Orientierung	Länge [bp]	Tm [°C]
G-TUB-H-579	3986	Forward	25	58,1°C
G-TUB-H-1238	4645	Forward	25	61,3°C
G-TUB-H-1580	4987	Forward	25	58,1°C
G-TUB-H-2649	6056	Forward	25	61,3°C
Anti2_Nt_genom	6219	Reverse	22	62,1°C

- 5'- und 3'-UTR wurden gelb unterlegt.
- Das Startcodon wurde grün unterlegt.
- Das Stopcodon wurde pink unterlegt.
- Die CDS ist in blauer Schrift dargestellt.

```

      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      10      20      30      40      50
TUBG1_Nt  GGAAATTCTC TTTTCCTCTG GCAGATCGAT AACGTCTGCA GTTACTCCT

      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      60      70      80      90     100
TUBG1_Nt  GATATTGTCA AGTGC GCGAG GGAACCAACA AGGGAAAACA GCAAAGGAAA

      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      110     120     130     140     150
TUBG1_Nt  CCGAGAG AAATTATAAC ACTGCAAGTT GGACAATGCG GGAACCAGAT

      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      160     170     180     190     200
TUBG1_Nt  CGGAATGGAG TTCTGGAAAC AGCTGTGCTT CGAACACGGT ATCAGTAAAG

      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      210     220     230     240     250
TUBG1_Nt  AAGGCATTCT TGAAGATTTT GCTACTCAGG TTCTGTAACT TCTTCGCTTT

      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      260     270     280     290     300
TUBG1_Nt  TGTCATGTTT TCAGTGTGTG GGTATGCAGT TATTAAAGTA GTATTGCGCT

      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      310     320     330     340     350
TUBG1_Nt  TCGTATTTCA TTTTGACTTG CGTGTTATGC TTTATTTTTG TACTTATTGA

```

```
.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          360          370          380          390          400
TUBG1_Nt AATGTTTTAC CTTGCAAGTT TTTTTTCCAC TGTTTGGTTG GGTATAAAAA

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          410          420          430          440          450
TUBG1_Nt GTCAGTGACG AACATTCTGG TAGGAGGAGC AATATAGGTC ATATAGATAG

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          460          470          480          490          500
TUBG1_Nt TGGTTGGTGA AATTTTTAGT TATTAAATGT TGATAATAGT GTTGTTTGAA

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          510          520          530          540          550
TUBG1_Nt GTAAGTGAGG AAATTTATTT TCACTATTTT GTGAAAATTA ATTTCCCTGG

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          560          570          580          590          600
TUBG1_Nt AGAAAACATT TTCTACAATT CACTTAACCA AACACAAAAT TTCAGAACAT

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          610          620          630          640          650
TUBG1_Nt TTTCCAGGAA TCAAACACGC CCTAGGAGTG TTATGCTGTT AAAGCTCCTG

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          660          670          680          690          700
TUBG1_Nt ATTTTACCTG TTAAGGTATA TGCTTATCTG AACTGTACTT ATTTTCATCAC

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          710          720          730          740          750
TUBG1_Nt CTTTTTAGGG AAAAACCTTA CTATTAGGTT TCCTGGGTTA TTTTTTTTTT

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          760          770          780          790          800
TUBG1_Nt GGGGGTTTAT TTTGAAATTA AAGCCGTCTA GACGATATTG TTTTACAATT

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          810          820          830          840          850
TUBG1_Nt GATTTACTCG TTTCAATTGG GCTAGTTTTG GGGCGTTTTG TTGTTCCTTT

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          860          870          880          890          900
TUBG1_Nt TCTGCAGAAG GAAATTGATT GCTTAAACGA TGGAAAATGA AATGTGAATC

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          910          920          930          940          950
TUBG1_Nt TTAGAGAAAA GGGGCTAATA TTAAAGTACC GTTTTCATCG CAGAGGTAGT
```

```
.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          960          970          980          990          1000
TUBG1_Nt TAGATCTATT TTCTTTTTTGG TGTTTCAGCAT AAAATGCAAA TGGTGATAGT

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          1010         1020         1030         1040         1050
TUBG1_Nt TACAAGTGAC AAGTCAGAAG AGGATTAGTT GTTAGATCAT GTAGCAGGTA

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          1060         1070         1080         1090         1100
TUBG1_Nt GGTAGCAAGC GTTTTAGTTG AGTTATCTCT ATGGCAATTA ACTTTAGTGA

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          1110         1120         1130         1140         1150
TUBG1_Nt CTCTGAGATC TACATGGGAA GCTAAACATC CCTCCAAAGT CCATACCAAA

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          1160         1170         1180         1190         1200
TUBG1_Nt GACGCATCAC ATTGTAAGTA AAACATCTGA CTATTACCAC GATGATCCTT

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          1210         1220         1230         1240         1250
TUBG1_Nt TCTATCCAAA TTATTGGTCC TTGTTTCAGTT ATACACTTAT ACTACAGCAC

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          1260         1270         1280         1290         1300
TUBG1_Nt TACGTGGTTT ACTTTTGAAA TATTACATGG TTTTGCTTGG AATTTTTTGT

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          1310         1320         1330         1340         1350
TUBG1_Nt GCTGGACTTT TCAGAAAATG ATAAACGTGT TGTTTCTAAG AAATTAATTT

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          1360         1370         1380         1390         1400
TUBG1_Nt GAGGGAGCTT GAAACAGGAT TTGTCTGCAA CTTATAGATA TGATTCTTTC

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          1410         1420         1430         1440         1450
TUBG1_Nt ATTTTCTGAT CTGATTTATG CTACCTAGTG ACCATGGATG TTTATAACATG

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          1460         1470         1480         1490         1500
TUBG1_Nt TACATACAAC ACTGCCATTG AGCCACATGC ATGTGAATGG TTGATCTACA

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          1510         1520         1530         1540         1550
TUBG1_Nt GGTCCATGTC TACTTAGACA GAAGGTTCTT ATTTGTTTTA CACACTTGCT
```



```
.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      1560      1570      1580      1590      1600
TUBG1_Nt TGTGTGTGAT TAAGTGTGGT TATTTTCATC TTAAGACCAC TCTTTTATAC

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      1610      1620      1630      1640      1650
TUBG1_Nt TACATGAATA ACCTACATTA CTTTATTGTG TTGTTTATGT AATGCTGCAG

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      1660      1670      1680      1690      1700
TUBG1_Nt GGAGGTGATA GAAAAGATGT ATTTTCTAT CAAGCGGACG ACCAACACTA

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      1710      1720      1730      1740      1750
TUBG1_Nt CATACTCGA GCATTATTGA TGGATCTAGA GCCCAGAGTG ATTAACGTA

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      1760      1770      1780      1790      1800
TUBG1_Nt TACAAAATGG TGAATATAGG AATCTCTACA ATCATGAGAA TGTATTTCATT

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      1810      1820      1830      1840      1850
TUBG1_Nt GCAGATCATG GAGGAGGTGC TGGAAATAAT TGGGCAAGCG GATATCATCA

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      1860      1870      1880      1890      1900
TUBG1_Nt GGTCTATTTA TTTTCTTAGA TCTTTGTTTC AGTTTGGTAA AGATGAGTAC

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      1910      1920      1930      1940      1950
TUBG1_Nt TTTTCTAATC AAGATATGTA GTTATTTATA GAAAAAGATT AATCATAGGT

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      1960      1970      1980      1990      2000
TUBG1_Nt AGGAACAAAG TAATGTCATT GCATACATAT AAATATTCTC TGTTAGTTTC

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      2010      2020      2030      2040      2050
TUBG1_Nt TGGATTACCC TTTATTAAGA ATTCCATCTT CTCAAATATG CTCCATCAAT

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      2060      2070      2080      2090      2100
TUBG1_Nt GTTATGTATG CTTTCTCTGT GATGGTCACT GGAATTACAT CTTTCAAGAG

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      2110      2120      2130      2140      2150
TUBG1_Nt GTCTGCAAA T AAGCTTGCTT TTCTTTGCTG TCCGTTTCAT TTTGTTGCC
```

```
.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      2160      2170      2180      2190      2200
TUBG1_Nt TTAGAGCTTG GATTGGTAGT TTCTGACTAA TTTGGTAAAA TCATTTCCTT

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      2210      2220      2230      2240      2250
TUBG1_Nt TTATCAGGGT AAGCAATATG AGGAGGATCT AATGGACATG ATTGATAGGG

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      2260      2270      2280      2290      2300
TUBG1_Nt AAGCAGATGG AAGCGATAGT CTCGAGGGTT TTGTTCTATG CCATTCAATT

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      2310      2320      2330      2340      2350
TUBG1_Nt GCCGGTGGAA CTGGCTCAGG TTGACTCCTA TTACCAAGTT CGTGCAGATT

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      2360      2370      2380      2390      2400
TUBG1_Nt GTGATAACGT CAGAAAATGA GTGACTCAGA ATTTGGTGTG GATATTCAAC

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      2410      2420      2430      2440      2450
TUBG1_Nt TATTATGTTG CTAATCACTG TTTATATGCA GGCATGGGCT CATATATATT

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      2460      2470      2480      2490      2500
TUBG1_Nt GGAAACTCTG AATGATCGCT ACAGCAAAAA GCTTGTCAA ACCTACAGCG

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      2510      2520      2530      2540      2550
TUBG1_Nt TTTTTCCTAA CAAAATGAG ACAAGTGATG TGGTTGTACA ACCTTATAAT

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      2560      2570      2580      2590      2600
TUBG1_Nt TCCCTTTTGA CACTCAAGCG TCTGACATTG AATGCGGATT GTGTAGTTGT

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      2610      2620      2630      2640      2650
TUBG1_Nt ACTTGATAAT ACCGCACTCA ATAGAATTGC TGTGGAACGC CTGCATATTA

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      2660      2670      2680      2690      2700
TUBG1_Nt CAACTCCAC TTTTGCTCAA ACAAATTCAT TAGTCTCTAC TGTAATGTCA

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      2710      2720      2730      2740      2750
TUBG1_Nt GCAAGTACAA CCACACTACG TTACCCAGGA TACATGAATA ACGACTTGGT
```

```
.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      2760      2770      2780      2790      2800
TUBG1_Nt TGGCCTCCTT GCTTCGTTGA TACCTACACC AAGATGCCAT TTTCTTATGA

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      2810      2820      2830      2840      2850
TUBG1_Nt CCGGGTATAC TCCACTCACT GTGGAACGTC AAGTAAGATT TCTGCTCTTA

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      2860      2870      2880      2890      2900
TUBG1_Nt TCTTGTCAGT GTTCGGTTTT TTTAAGTGTT TTAAATATAA CTGTATTGGC

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      2910      2920      2930      2940      2950
TUBG1_Nt AATTGCTGAT TATTATTCTT TATATAATGT GCTTTCCTAA TAGCTCAGTT

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      2960      2970      2980      2990      3000
TUBG1_Nt ATTTTTTTCC TAGAGAAGCA GAAGTCCAAT GTGGACTTAA GTGACCCATA

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      3010      3020      3030      3040      3050
TUBG1_Nt TTCATGCTGT CCACTGATCA ATTGTGCATA CCAGTTTATT TCTTTTTAAC

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      3060      3070      3080      3090      3100
TUBG1_Nt TCCATGGGAT GAGAGAAAAT GTTGCCTGAT TCATGTGCTC CCATGAATAA

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      3110      3120      3130      3140      3150
TUBG1_Nt AAAAAACAGAA TTTAAAATAT ATAATCCTAA TTAATGGAGA TCAATTTATC

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      3160      3170      3180      3190      3200
TUBG1_Nt TTGGTGCAAT TCATTTTGTG AAGCTTGTC CAGTTTCTC TGCTATACCT

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      3210      3220      3230      3240      3250
TUBG1_Nt TTATAACTGC CCTACTATCG AGAAACAGAG AATGACAAAT TGGCCATCTC

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      3260      3270      3280      3290      3300
TUBG1_Nt AATAAATGGG TGGTTATTTT TTTTACTCC ACCCTCCCAC GTTCTATCCA

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      3310      3320      3330      3340      3350
TUBG1_Nt CTATCGCCTT TCTTTTTTCC CTTTCTGTTT ATTGGTAAAA TTGTATCATG
```

```
.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      3360      3370      3380      3390      3400
TUBG1_Nt TGGCATGTCT GTGACCCATT CACTAGTGAC AACTGAAGCA GTGCTACTAA

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      3410      3420      3430      3440      3450
TUBG1_Nt TCATTTTTGC AGGCTAATGT AATTCGGAAG ACAACTGTAC TTGATGTCAT

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      3460      3470      3480      3490      3500
TUBG1_Nt GAGAAGGCTC CTTCAGGTCT GGAAACCTGT TATTTAGGTT GTTCTATTGA

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      3510      3520      3530      3540      3550
TUBG1_Nt AAGTATTTGC AGATATACTT AGGGACTTTC ACTTTGCAGA CCAAGAATAT

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      3560      3570      3580      3590      3600
TUBG1_Nt CATGGTTTCC TCCTATGCTC GAACAAAGGA AGCCAGTCAG GCTAAATACA

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      3610      3620      3630      3640      3650
TUBG1_Nt TATCCATATT AAACATTATT CAGGGAGAAG TTGATCCCAC TCAGGTATTC

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      3660      3670      3680      3690      3700
TUBG1_Nt TTGATACTTC TTAACAACCTT TTGTGGAGTT ATTCCTTTTT TTTTCTATTG

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      3710      3720      3730      3740      3750
TUBG1_Nt CTCCTGCAAT AGAAAGTCTG ACTGTTTGAA GTGTATTTAT CCCAAATTGA

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      3760      3770      3780      3790      3800
TUBG1_Nt GGCATCTGTT TAAAATATT CAAGTTCTTT CTGAAGTCCA TTTGATGGAA

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      3810      3820      3830      3840      3850
TUBG1_Nt ATTTCTTTGA ATTCAGTGAA AATGGTTCTA GATAGGTTCT GAATTTGAAT

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      3860      3870      3880      3890      3900
TUBG1_Nt TTTTGAAAT CAACCACACC GCGGGAGTCA TGTTTCTGAA ATTTAAATCA

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      3910      3920      3930      3940      3950
TUBG1_Nt CAAACCTGTT CTTTTTAGTT TATCATCTAA TCCTTTACTT GCACAGTTGC
```

```
.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          3960          3970          3980          3990          4000
TUBG1_Nt GCTTAAGGAG TTTCGAGATT ATTTCTTTTG CAACTTAGAC ATAGCTTTAT

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          4010          4020          4030          4040          4050
TUBG1_Nt CACCTAACCA CCAAGGGGG AATTGTTTTT CCATTCATG CATTAAACTT

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          4060          4070          4080          4090          4100
TUBG1_Nt ATGCATACAT ATGAATGCAC TTCTGACAAA ACATATCATT CAGCTGTCTT

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          4110          4120          4130          4140          4150
TUBG1_Nt TGACTCATTT GATGTTTCTG AAATCAGGTC CATGAAAGCC TGCAGAGAAT

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          4160          4170          4180          4190          4200
TUBG1_Nt AAGGGAAAGA AAGCTTGTTA ATTTTATTGA CTGGGGCCCT GCTAGCATTG

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          4210          4220          4230          4240          4250
TUBG1_Nt AGGCATGTGT TTTGGTCATA ATGGACATTG AGATTTAATT TTTTTTATC

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          4260          4270          4280          4290          4300
TUBG1_Nt CTATTGCTGC TGAAGTAGTG AACTTTGACT TTGCACTACC TTCCTTGACA

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          4310          4320          4330          4340          4350
TUBG1_Nt GGTTGCTTTA TCTAGGAAGT CTCCTTATGT CCAGACGGCT CATAGGGTGA

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          4360          4370          4380          4390          4400
TUBG1_Nt GATTGATTAT AAGTCTACTT GTTTAATCTT TTATGCTGAA GCGTAATCT

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          4410          4420          4430          4440          4450
TUBG1_Nt GATTTGTACT GCTTGGAAC TGCTTAAATG CCTTTCTATG AAATTAAGGA

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          4460          4470          4480          4490          4500
TUBG1_Nt GGCTCAGTAA TGTAAGGTT AAAGCTTGTA GTCCAGTAGT TCGGCTCACC

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          4510          4520          4530          4540          4550
TUBG1_Nt AACAAATAAA CTAAATTATG GGACTCATAA ATTTAAAGTT TTGATAGCAC
```

```
.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      4560      4570      4580      4590      4600
TUBG1_Nt GAAGTAATGG CTCTTTTCGT TTTTGGAAAC TGATACTTGA TCGACCGGAT

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      4610      4620      4630      4640      4650
TUBG1_Nt GATGTTTCTG AATCTAAAGG GTTTACAAAG TTTATATTG AACTTTAAAA

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      4660      4670      4680      4690      4700
TUBG1_Nt ACGGACCTAT AACACAGGTT TTTGAAGTTG CAAACATAAC AAATGCTTAT

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      4710      4720      4730      4740      4750
TUBG1_Nt AACTTACTCA TGTTTGAAAA GCGCATTTTT TTACAATGGG CAATATAAAC

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      4760      4770      4780      4790      4800
TUBG1_Nt TCTACGACAC TAGCTGACGT GATCACTAAA ATGCATCAGT TGAGGCAAGC

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      4810      4820      4830      4840      4850
TUBG1_Nt CAGATTAGTT TGCCTATCTT CGTCTCCACA TTTTACTGTA AATCTGCTTT

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      4860      4870      4880      4890      4900
TUBG1_Nt CCTGAAAGTT GTTTGGAGTA AAGCTGTTTC TTTCCCGAAG ATATGTAATA

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      4910      4920      4930      4940      4950
TUBG1_Nt TTACTGTGTG ATTTTCAATG TGTCAGGTTA GTGGTCTCAT GCTCGCTAGC

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      4960      4970      4980      4990      5000
TUBG1_Nt CATACTGGCA TCCGGCACTT ATTCAGCAAG TGTTTGAGCC AGTACGATAA

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      5010      5020      5030      5040      5050
TUBG1_Nt ATTGAGAAAG AGACAAGCCT TCCTTGACAA CTATAGGAAT CATCCAACGT

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      5060      5070      5080      5090      5100
TUBG1_Nt TTGCCGTAAG TTCTTGTTCA ACTGTCTTTC AGATATTATC TAACTACGAA

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      5110      5120      5130      5140      5150
TUBG1_Nt TAAAAGGTGG CATAGTGTAT AGTTTAATTA TTGGTCAGTC AGTGCCCAT
```

```
.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          5160      5170      5180      5190      5200
TUBG1_Nt CCGACCAGAG GATTTAGTTT TAATGTCTAA ATCTGCTTGC ACACTTGAGA

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          5210      5220      5230      5240      5250
TUBG1_Nt GAGTGAAAAA GAAAACAGAG CAGACATTTG TCATGCTCCA TGGTTTCTGC

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          5260      5270      5280      5290      5300
TUBG1_Nt AAAAGTGAAG CTGAATCTGG AGATTTCTCC ATTGAAATCT ATCTATGTCT

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          5310      5320      5330      5340      5350
TUBG1_Nt ATAAGAAACT ATGACATTCT TTCTCCTTTC ATATTGCTGT CATTATAAAG

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          5360      5370      5380      5390      5400
TUBG1_Nt AGCATCTCTG TTTATAACTG AAGTTCAGAG TCTTAACTAA GATTTAATTG

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          5410      5420      5430      5440      5450
TUBG1_Nt ATGAATATGC GAAGCTGATA TTCTATAAATT AACCAGCTGC ATAATAAAAT

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          5460      5470      5480      5490      5500
TUBG1_Nt AATATTATTT CTCATTGTAA GAATGTATGG TCTTTAGAAG ACAAAGAGA

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          5510      5520      5530      5540      5550
TUBG1_Nt ACACTTGAGT GTGAAATGTC CTTGATGGCG GATACTAACA GACAAGTTAT

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          5560      5570      5580      5590      5600
TUBG1_Nt TAGAAAGTGT TCGATTGATG CATTTTTGTT AATTATCATA GGATTACTTT

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          5610      5620      5630      5640      5650
TUBG1_Nt GTCATGAGAT ACTTCTCTTC TTAAAGAACA AATATAGCTG TATGTGTAAT

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          5660      5670      5680      5690      5700
TUBG1_Nt GGAGAAACAA GGAGCTAAAT TCAAAAAGTA ATATGAGGTT TTTCTGAGAT

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          5710      5720      5730      5740      5750
TUBG1_Nt ACAACTCTCC AAAATCTTGA GAATATAACA GTGTTCTTTG TTATCTTTTG
```

```
.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      5760      5770      5780      5790      5800
TUBG1_Nt ACTTGTGGGG ATGGGATGTA CGGTGAACCT CAAAATTGTC CTTATTTGAG

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      5810      5820      5830      5840      5850
TUBG1_Nt GAGTTAAAT CCTCAGCAAT AGATAAGCTT GGCGATTGA AGAAAAGATT

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      5860      5870      5880      5890      5900
TUBG1_Nt GCATGCATCA ATCTGTCAAT GTTGACAGCG AAGACGGTGT ATTGTTGCT

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      5910      5920      5930      5940      5950
TUBG1_Nt GATCTCCAGT TTGAGTGTTC TGCTCCCAGT TGAGCTCCTT GCTTTTATCT

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      5960      5970      5980      5990      6000
TUBG1_Nt TGTGCAACTA GTAACGATTT GTCAAAGCGG GGTCCAAGAA CCCAGCTTT

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      6010      6020      6030      6040      6050
TUBG1_Nt AAGTAGCATG CACTTTCTTG TAGAAGCTTT TGTCAGTTGC GTTGTAACAT

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      6060      6070      6080      6090      6100
TUBG1_Nt AATGTTTCTG TATTTGCTCA AGCCTTTTTC CTCTTTCTTA TATTATCATG

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      6110      6120      6130      6140      6150
TUBG1_Nt CATAATGGGC AGGACAATGA CCTATCAGAA TTTGACGAAT CTAGAGATGT

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      6160      6170      6180      6190      6200
TUBG1_Nt GATTGAAAGT CTAGTTGACG AGTACAAGGC TTGTGAGTCC CCAGATTACA

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      6210      6220      6230      6240      6250
TUBG1_Nt TCAAATGGGG AATGGAGGTA AGTGCTAGTA CTAGTCTGTA TTGCTTTTAA

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      6260      6270      6280      6290      6300
TUBG1_Nt TTTGATGTGC TGCATCACAA ATGAGCTATA TCTATTTGTG CAGGATCCCG

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      6310      6320      6330      6340      6350
TUBG1_Nt ACCATGTTCT AACAGGCGAA GGAAATGCTA GTGGGACAGT TGATCCCAAG
```



.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|  
                  6360                  6370                  6380                  6390                  6400  
**TUBG1\_Nt**      TTATCTTTAT GAGCAAGCTT ACTATTCTGT ATTTTAATTT TGCAGAACAA

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|  
                  6410                  6420                  6430                  6440                  6450  
**TUBG1\_Nt**      AAAGGAGAAT TTATTCGATG TAATTATCTC TGCAATTTAA CCCTGATTAG

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|  
                  6460                  6470                  6480                  6490                  6500  
**TUBG1\_Nt**      TTTTCTGTAT GTGATTCAAT TTGGGGCTCA ACTTATTTGT TAGGGTCGTA

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|  
                  6510                  6520                  6530                  6540                  6550  
**TUBG1\_Nt**      TGGTTTATGG TTACCGGTAG TATCAGTGAA AATAGTCTTG TCTTGTTAAA

.....|.....| .....|.  
                  6560  
**TUBG1\_Nt**      AAAAAAAAAA AAAAAA

### 7.2.3 Die $\alpha$ -Tubulin-CDS

Die in der vorliegenden Arbeit sequenzierte und verwendete  $\alpha$ -Tubulin-CDS aus der *N. tabacum* BY-2 Zelllinie wurde der durch Kumagai (2000; GenBank: AB052822.1) veröffentlichten Sequenz gegenübergestellt. Dargestellt ist der Bereich von Start- bis Stopcodon.

- Das Startcodon wurde grün unterlegt.
- Das Stopcodon wurde pink unterlegt.
- Substitutionen wurden rot unterlegt.

```

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
              10          20          30          40          50
aTub Kumagai  ATGAGAGAGT GCATATCGAT CCACATTGGT CAGGCCGGTA TTCAGGTCGG
aTub Wernicke ATGAGAGAGT GCATATCGAT CCACATTGGT CAGGCCGGTA TTCAGGTCGG

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
              60          70          80          90          100
aTub Kumagai  AAATGCATGC TGGGAAC TTT ACTGCCTCGA GCATGGCATT CAGCCTGATG
aTub Wernicke AAATGCATGC TGGGAAC TTT ACTGCCTCGA GCATGGCATT CAGCCTGATG

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
              110         120         130         140         150
aTub Kumagai  GCCAGATGCC AGGTGACAAG ACAGTTGGAG GAGGTGATGA TGCATTCAAC
aTub Wernicke GCCAGATGCC AGGTGACAAG ACAGTTGGAG GAGGTGATGA TGCATTCAAC

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
              160         170         180         190         200
aTub Kumagai  ACCTTCTTCA GTGAAACTGG GGCAGGAAAA CACGTCCCTC GTGCTGTCTT
aTub Wernicke ACCTTCTTCA GTGAAACTGG GGCAGGAAAA CACGTCCCTC GTGCTGTCTT

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
              210         220         230         240         250
aTub Kumagai  TGTGGATCTT GAGCCTACTG TCATTGACGA AGTCAGGACT GGAACATACA
aTub Wernicke TGTGGATCTT GAGCCTACTG TCATTGACGA AGTCAGGACT GGAACATACA

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
              260         270         280         290         300
aTub Kumagai  GGCAGCTCTT TCCCCCTGAG CAGCTTATCA GTGGCAAAGA AGATGCAGCC
aTub Wernicke GGCAGCTCTT TCAACCCTGAG CAGCTTATCA GTGGCAAAGA AGATGCAGCC

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
              310         320         330         340         350
aTub Kumagai  AACAACTTTG CCCGCGGACA TTATACAATT GGGAAAGAGA TAGTTGATCT
aTub Wernicke AACAACTTTG CCCGCGGACA TTATACAATT GGGAAAGAGA TAGTTGATCT

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
              360         370         380         390         400
aTub Kumagai  CTGCTTGGAT CGCATCAGGA AGCTTGCAGA TAACTGTACT GGTCTTCAAG
aTub Wernicke CTGCTTGGAT CGCATCAGGA AGCTTGCAGA TAACTGTACT GGTCTTCAAG

```

```

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          410          420          430          440          450
aTub Kumagai  GTTTTCTGGT TTTCAATGCT GTTGGTGGTG GAACTGGTTC AGGTCTAGGG
aTub Wernicke GTTTTCTGGT TTTCAATGCT GTTGGTGGTG GAACTGGTTC AGGTCTAGGG

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          460          470          480          490          500
aTub Kumagai  TCACTTCTGC TGGAGCGTCT CTCTGTGGAC TACGGCAAGA AATCAAAACT
aTub Wernicke TCACTTCTGC TGGAGCGTCT CTCTGTGGAC TACGGCAAGA AATCAAAACT

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          510          520          530          540          550
aTub Kumagai  TGGTTTCACC ATTTATCCAT CACCACAGGT CTCAACCTCT GTGGTGGAAC
aTub Wernicke TGGTTTCACC ATTTATCCAT CACCACAGGT CTCAACCTCT GTGGTGGAAC

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          560          570          580          590          600
aTub Kumagai  CTTACAACAG TGTCCTGTCA ACCCACTCCC TTCTTGAGCA CACTGATGTT
aTub Wernicke CTTACAACAG TGTCCTGTCA ACCCACTCCC TTCTTGAGCA CACTGATGTT

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          610          620          630          640          650
aTub Kumagai  GCAGTTCTTC TTGACAATGA GGCCATTTAT GACATTTGCA GACGCTCATT
aTub Wernicke GCAGTTCTTC TTGACAATGA GGCCATTTAT GACATTTGCA GACGCTCATT

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          660          670          680          690          700
aTub Kumagai  GGACATTGAG CGACCCACAT ACACCAATCT GAACCGACTT ATTTACAGG
aTub Wernicke GGACATTGAG CGACCCACAT ACACCAATCT GAACCGACTT ATTTACAGG

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          710          720          730          740          750
aTub Kumagai  TCATTTCTTC GTTGACTGCT TCGTTGAGGT TTGATGGGGC ACTGAAATGTT
aTub Wernicke TCATTTCTTC GTTGACTGCT TCGTTGAGGT TTGATGGGGC ACTGAAATGTT

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          760          770          780          790          800
aTub Kumagai  GATGTGAATG AATTCCAGAC CAACCTTGTT CCCTACCCCA GGATTCATT
aTub Wernicke GATGTGAATG AATTCCAGAC CAACCTTGTT CCCTACCCCA GGATTCATT

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          810          820          830          840          850
aTub Kumagai  TATGCTTTCC TCCTATGCTC CTGTCATTTT AGCTGAGAAG GCCTACCATG
aTub Wernicke TATGCTTTCC TCCTATGCTC CTGTCATTTT AGCTGAGAAG GCCTACCATG

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          860          870          880          890          900
aTub Kumagai  AGCAGCTCTC AGTTGCAGAG ATCACCAACA GTGCTTTTGA GCCATCTTCC
aTub Wernicke AGCAGCTCTC AGTTGCAGAG ATCACCAACA GTGCTTTTGA GCCATCTTCC

```

```

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          910          920          930          940          950
aTub Kumagai ATGATGGTTA AGTGTGATCC TCGCCATGGC AAGTACATGG CGTGCTGCCT
aTub Wernicke ATGATGGTTA AGTGTGATCC TCGCCATGGC AAGTACATGG CGTGCTGCCT

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          960          970          980          990          1000
aTub Kumagai TATGTTCCGT GGTGATGTTG TGCCAAAGGA TGCAATGCT GCTGTGGCTA
aTub Wernicke TATGTTCCGT GGTGATGTTG TGCCAAAGGA TGCAATGCT GCTGTGGCTA

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          1010         1020         1030         1040         1050
aTub Kumagai CCATCAAGAC TAAGCGCACC ATCCAATTTG TTGACTGGTG CCCTACCGGA
aTub Wernicke CCATCAAGAC TAAGCGCACC ATCCAATTTG TTGACTGGTG CCCTACCGGA

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          1060         1070         1080         1090         1100
aTub Kumagai TTCAAGTGTG GTATCAACTA TCAGCCACCA ACTGTTGTTT CTGGAGGTGA
aTub Wernicke TTCAAGTGTG GTATCAACTA TCAGCCACCA ACTGTTGTTT CTGGAGGTGA

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          1110         1120         1130         1140         1150
aTub Kumagai TCTTGCCAAG GTGCAAAGGG CTGTATGTAT GATATCCAAC TCAACCAGTG
aTub Wernicke TCTTGCCAAG GTGCAAAGGG CTGTATGTAT GATATCCAAC TCAACCAGTG

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          1160         1170         1180         1190         1200
aTub Kumagai TTGCTGAGGT CTTCTCACGC ATTGACCACA AGTTCGATCT TATGTATGCC
aTub Wernicke TTGCTGAGGT CTTCTCACGC ATTGACCACA AGTTCGATCT TATGTATGCC

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          1210         1220         1230         1240         1250
aTub Kumagai AAACGTGCTC TCGTGCACTG GTATGTTGGT GAGGGTATGG AGGAAGGTGA
aTub Wernicke AAACGTGCTT TCGTGCACTG GTATGTTGGT GAGGGTATGG AGGAAGGTGA

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          1260         1270         1280         1290         1300
aTub Kumagai GTTCAGTGAA GCGCGTGAAG ATCTGGCTGC TCTGGAAAAG GATTACGAGG
aTub Wernicke GTTCAGTGAA GCGCGTGAAG ATCTGGCTGC TCTGGAAAAG GATTACGAGG

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          1310         1320         1330         1340         1350
aTub Kumagai AAGTTGGTGC TGAATTGGAG GAAGGAGAAG AGGATGATCA TGAGGAATAC
aTub Wernicke AAGTTGGTGC TGAATTGGAG GAAGGAGAAG AGGATGATCA TGAGGAATAC

...

aTub Kumagai TAA
aTub Wernicke TAA

```

### 7.3 Verwendete Primer

Primer	Sequenz	T <sub>m</sub> [°C]
265_inv	5' - TAT GTA GTG TTG GTC GTC C - 3'	54,5
35S+gTub_fw	5' - CAT TTA CGA ACG ATA GCC ATG CCG AGA GAA ATT ATA ACA C - 3'	69,5
Anti2_Nt_genom	5' - TCG CCT GTT AGA ACA TGG TCG G - 3'	62,1
Anti_Intron 4	5' - GGA GCA CAT GAA TCA GGC AAC A - 3'	60,3
aTub_cDNA_fwI	5' - GCC GGC ATG AGA GAG TGC ATA TC - 3'	64,2
aTub_cDNA_revI	5' - GAA CAA CCA AAG AAA AAT ACA ATC - 3'	54,2
aTub_CDS_fwI	5' - TCT GTG GAC TAC GGC AAG AAA TC - 3'	60,6
aTub_CDS_revI	5' - CAG GAG CAT AGG AGG AAA GCA TAA - 3'	61,0
aTub+RFP_UH_fw	5' - CTA GGT CAC AAA TTG AAC GCC GGC ATG AGA GAG TGC - 3'	72,9
aTub+UEH_fwI	5' - CAT GGA TGA ACT ATA CAA AGC CGG CAT GAG AGA GTG C - 3'	71,7
aTub+UEH_revI	5' - GAC TCT AGA GGA TCC TTA GTA TTC CTC ATG ATC ATC CTC - 3'	70,5
BY2_g_tub_fw1_inv	5' - TCT CGG CAT TTT CCT TTG - 3'	51,4
CAT_Lin_rev+TEV	5' - GCC CTG AAA ATA AAG ATT CTC TTT GTA TAG TTC ATC CAT GCC - 3'	69,4
Fu-PC-rev+TEV	5' - GCC CTG AAA ATA AAG ATT CTC TAA AGA TAA CTT GGG ATC AAC TGT C - 3'	70,3
GFP-Amp-fw-I	5' - TCA TTA GGC ACC CCA GGC TT - 3'	59,4
GFP-Amp-rev-I	5' - TGC GGG CCT CTT CGC TAT T - 3'	58,8
GFP-Amp-rev-2298	5' - TAT AAA AAT AGG CGT ATC ACG AGG C - 3'	59,7
GFP_cDNA_revI	5' - ATG TGG TCT CTC TTT TCG TTG - 3'	55,9
GFP_fw+TEV	5' - GAG AAT CTT TAT TTT CAG GGC ATG GGT AAA GGA GAA GAA CT - 3'	69,4
GFP_fw_XhoI	5' - ATG ATC CTC GAG AAA ATG GGT AAA GGA GAA GAA CTT TT - 3'	67,3
GFP-nA-fw-910	5' - GAA AAC AGC AAA GGA AAA TGG GTA AAG GAG AAG AAC T - 3'	67,2
GFP-nA-rev-2140	5' - CCG GTG TCG GGG CT - 3'	50,0
GFP_rev_SpeI	5' - ATG ATC ACT AGT TTA TTT GTA TAG TTC ATC CAT GCC ATG T - 3'	66,4
GT_1898_rev	5' - AGT TAC AGA ACC TGA GTA GCA A - 3'	56,5
GT_2140_rev	5' - CTC CTA CCA GAA TGT TCG TCA - 3'	57,9
GT_cDNA_fw_7	5' - TCT CTT TTC CTC TGG CAG - 3'	53,7
GT_cDNA_rev_1710	5' - AAC AAG ACA AGA CTA TTT TCA CT - 3'	53,5
gTub_ATG+TEV	5' - GAG AAT CTT TAT TTT CAG GGC ATG CCG AGA GAA ATT ATA ACA - 3'	68,5
gTub_fw_265	5' - GGA CGA CCA ACA CTA CAT A - 3'	54,5
G-TUB-H-579	5' - TCA TTC AGC TGT CTT TGA CTC ATT T - 3'	58,1
G-TUB-H-1238	5' - ATA AAC TCT ACG ACA CTA GCT GAC G - 3'	61,3
G-TUB-H-1580	5' - TAT CTA ACT ACG AAT AAA AGG TGG C - 3'	58,1
G-TUB-H-2649	5' - AAA GTC TAG TTG ACG AGT ACA AGG C - 3'	61,3
gTub_Stop+UEH	5' - CGG ACT CTA GAG GAT CCT CAT AAA GAT AAC TTG GGA TC - 3'	70,5
nA_Fu_PG_fw_376	5' - ACA AAT TGC TTT AAG CTT CGT AAG A - 3'	56,4
Nt_fw_1336	5' - GGA TGT TTA TAC ATG TAC ATA CAA CAG TGC CA - 3'	64,4
Nt_rev_461	5' - AAT TGA GCT AAC TAC CTC TGC GAT G - 3'	61,3
pCAT-35S+gT_fw	5' - GAC AAT GCG GGA ACC AG - 3'	55,2
pCAT-35S+gT_rev	5' - GCG TAA TCA TGG TCA TAG C - 3'	54,5
pCATgfp_Lin_fw	5' - GGA TCC TCT AGA GTC CGC - 3'	58,2
pCATgfp_Lin_rev	5' - TTT GTA TAG TTC ATC CAT GCC - 3'	54,0
pCATgfp_rev_912	5' - CAT GGC TAT CGT TCG TAA ATG G - 3'	58,4
pCATrfp_Lin_rev	5' - GTT CAA TTT GTG ACC TAG CTT - 3'	54,0
pMDC7_fw_MCS	5' - TAA GAT TAG ATA TGG ATA TGT ATA TGG AT - 3'	56,8
pMDC7_rev_MCS	5' - TTT ATT AAC TCT TAT CCA TCC ATT TGC - 3'	57,4
PROM_CAT	5' - TAT GAC CAT GAT TAC GCC CTG CAG GAA TGT ATA TTT ATC AAA CTA TCA CC - 3'	71,9
Prom_fw_I	5' - TTC TAC CTC CAT CAT TGC CA - 3'	55,3
Promo_fw_57	5' - ATT ATG TAA CTC TTG TTG TTT TGT G - 3'	54,8
Promo_fw_106	5' - AAT GTA TAT TTA TCA AAC TAT CAC C - 3'	53,1
Prom_rev_I	5' - ACT CAA TAG TCA ATA TAG ATG GTT T - 3'	54,8

---

Prom_rev_1760	5' - ATT TTC CTT TGC TGT TTT C - 3'	48,0
Prom_rev_1825	5' - TCC AGA ACT CCA TTC CGA TC - 3'	57,3
RFP_ATG+UEH_fw	5' - TTA CGA ACG ATA GCC ATG GTG AGT AAA GGT GAA GAG - 3'	69,5
RFP_CDS_fwI	5' - GGA GAG GGT TAC CAC TTA CGA - 3'	59,8
RFP_CDS_revI	5' - TCT TTG TCT GCT TCT TTT ATC CT - 3'	55,3
RFP_STOP+UEH_rev	5' - GGA CTC TAG AGG ATC CTC AGT TCA ATT TGT GAC CTA G - 3'	70,6

**Abbildungsverzeichnis**

	Seite
1.1 Dynamische Instabilität der Mikrotubuli .....	3
1.2 Die mitotische Spindel in tierischen und pflanzlichen Zellen .....	5
1.3 Die Organisation der Mikrotubuli während des pflanzlichen Zellzyklus.....	6
1.4 Mikrotubuli-Nukleation am $\gamma$ -TuRC .....	8
1.5 Modelle der über die Zelle verteilten Mikrotubuli-Nukleation in Pflanzen.....	10
1.6 Die <i>Bright Yellow-2</i> Zellkultur.....	15
2.1 Vektorkarte von pCATgfp.....	21
2.2 Vektorkarte von <i>Gateway® TagRFP-AS-N entry clone</i> .....	22
2.3 Vektorkarte von pJET1.2 blunt cloning vector .....	23
2.4 Vektorkarte von pGEM®-T Easy Vector.....	24
2.5 Vektorkarte von pZPNpt.....	25
2.6 Vektorkarte von pZPbar .....	26
2.7 Vektorkarte von pMDC7_GFP .....	27
2.8 Schematische Darstellung einer IPCR .....	33
2.9 Schematische Darstellung einer RF-Klonierung.....	41
3.1 Schematische Darstellung des Vektors pZPNpt_gfp .....	54
3.2 Schematische Darstellung des Vektors pZPbar_gfp.....	55
3.3 GFP-Fluoreszenz einer mittels <i>LBA4404</i> +pZPNpt_gfp transfizierten <i>BY-2</i> Zelllinie .....	56
3.4 Selektion transfizierter <i>BY-2</i> Zellen auf LS-Festmedium .....	62
3.5 Schematische Darstellung der Vektoren pZPNpt_ $\gamma$ -Tub_gfp und pZPNpt_gfp_ $\gamma$ -Tub.....	65
3.6 Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der Zelllinien <i>BY-2</i> pZPNpt_ $\gamma$ -Tub_gfp und <i>BY-2</i> pZPNpt_gfp_ $\gamma$ -Tub.....	67
3.7 Gelelektrophoretische Auftrennung der Amplifikate aus der IPCR.....	68
3.8 Gelelektrophoretische Auftrennung der Amplifikate aus der PCR zur Verifizierung der Lage des putativen $\gamma$ -Tubulin-Promotors, relativ zum codierenden Bereich des $\gamma$ -Tubulin-Gens .....	70

---

3.9	Schematische Darstellung des Vektors pPZPnpt_γ-Tub-Prom_gfp .....	73
3.10	GFP-Expression in den Zelllinien <i>BY-2</i> pPZPnpt_γ-Tub-Prom_gfp A2 und <i>BY-2</i> pPZPnpt_γ-Tub-Prom_gfp B14/3 .....	74
3.11	Schematische Darstellung des Vektors pPZPnpt_γ-Tub-Prom_γ-Tub_gfp .....	77
3.12	Fluoreszenzmikroskopischer Vergleich der Zelllinien <i>BY-2</i> (nativ) und <i>BY-2</i> pPZPnpt_γ-Tub-Prom_γ-Tub_gfp.....	79
3.13	Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Ansätze zur Überprüfung der Transkription des Fusionskonstruktes in der Zelllinie <i>BY-2</i> pPZPnpt_γ-Tub-Prom_γ-Tub_gfp.....	80
3.14	Schematische Darstellung des Vektors pPZPnpt_gfp_α-Tub.....	83
3.15	Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der Zelllinie <i>BY-2</i> pPZPnpt_gfp_α-Tub .....	85
3.16	Fluoreszenzmikroskopischer Nachweis cortikaler Mikrotubuli in elongierten Zellen der Linie <i>BY-2</i> pPZPnpt_gfp_α-Tub .....	87
3.17	Schematische Darstellung des Vektors pPZPnpt_rfp.....	89
3.18	Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der Zelllinie <i>BY-2</i> pPZPnpt_rfp .....	90
3.19	Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung einer Mischkultur der Zelllinien <i>BY-2</i> pPZPnpt_gfp und <i>BY-2</i> pPZPnpt_rfp.....	91
3.20	Schematische Darstellung des Vektors pPZPbar_rfp_α-Tub .....	93
3.21	Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Ansätze zur Verifizierung einer erfolgten Transfektion bei <i>BY-2</i> pPZPbar_rfp_α-Tub .....	95
3.22	Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Ansätze zur Überprüfung der Transkription des Fusionskonstruktes in <i>BY-2</i> pPZPbar_rfp_α-Tub.....	96
3.23	Schematische Darstellung des XVE-Promotorsystems .....	97
3.24	Transfektionsversuche mit dem induzierbaren XVE-Promotorsystem.....	100
3.25	Dekonvolutionsmikroskopische Aufnahmen der Zelllinie <i>BY-2</i> pPZPnpt_gfp_α-Tub.....	102
3.26	Dekonvolutionsmikroskopische Aufnahmen des cortikalen Mikrotubuli-Netzwerkes einer elongierten Zelle der Zelllinie <i>BY-2</i> pPZPnpt_gfp_α-Tub .....	103
3.27	Dreidimensionale Darstellung des cortikalen Mikrotubuli-Netzwerkes.....	104
3.28	Dekonvolutionsmikroskopische Aufnahmen der Zelllinie <i>BY-2</i> pPZPnpt_γ-Tub_gfp .....	105
4.1	Schematische Darstellung des γ-Tubulin-Gens und der <i>in silico</i> vorhergesagten potentiellen Promotoren.....	112



**Tabellenverzeichnis**

	Seite
2.1 Standard-PCR-Ansatz für die GoTaq® Flexi DNA Polymerase .....	30
2.2 Standard-PCR-Ansatz für die Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase .....	30
2.3 Zur PCR mit der GoTaq® Flexi DNA Polymerase verwendetes Cyclersprogramm .....	31
2.4 Zur PCR mit der Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase verwendetes Cyclersprogramm .....	31
2.5 RT-PCR-Ansatz für das Verso™ cDNA Kit .....	34
2.6 Zur RT-PCR mit dem Verso™ cDNA Kit verwendetes Cyclersprogramm .....	34
2.7 Restriktionsansatz für FastDigest® Enzyme .....	37
2.8 Zur Restriktion mit FastDigest® Enzymen verwendetes Cyclersprogramm .....	37
2.9 Ligationsansatz für das Enzym T4 DNA Ligase .....	38
2.10 PCR-Ansatz einer RF-Reaktion .....	42
2.11 Zusammensetzung der Polyacrylamidgele .....	46
2.12 Verwendete Antikörper .....	49
2.13 Zusammensetzung der ECL-Lösung .....	49
3.1 Verwendete Primer zur Verifizierung der Lage des putativen $\gamma$ -Tubulin-Promotors im Genom .....	69
7.1 Primer zur Sequenzierung des $\gamma$ -Tubulin-Promotors .....	IX
7.2 Primer zur Sequenzierung der $\gamma$ -Tubulin-Volllängensequenz .....	XIII

